



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

**"VALORACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA  
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS DE RIÑA"**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar por el grado académico de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**AUTOR: CARLOS ALFREDO ZAMBRANO ZAMBRANO.**

**DIRECTOR: ING. EDGAR WASHINGTON HERNÁNDEZ CEVALLOS.**

Riobamba – Ecuador

2020

© 2020 Carlos Alfredo Zambrano Zambrano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, **Carlos Alfredo Zambrano Zambrano**, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de enero de 2020

---

**Carlos Alfredo Zambrano Zambrano**

**0604951921.**

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

**CERTIFICACIÓN**

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: el trabajo de investigación: tipo experimental "**VALORACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE GALLOS DE RIÑA**" de responsabilidad del señor egresado **Carlos Alfredo Zambrano Zambrano**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	<b>Firma</b>	<b>Fecha</b>
<b>Ing. Pablo Rigoberto Andino Nájera</b> <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	_____	_____
<b>Ing. Edgar Washington Hernández Cevallos.</b> <b>DIRECTOR DEL TRABAJO</b> <b>DE TITULACIÓN</b>	_____	_____
<b>Ing. Nelson Antonio Duchi Duchi PhD.</b> <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	_____	_____

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo se lo dedico a mi madre y a mis hermanos por ser un pilar fundamental e incondicional de este sueño alcanzado, en especial a mi madre, por brindarme su amor incondicional y su apoyo en los momentos más felices al igual que en los momentos más duros que enfrenté durante la trayectoria estudiantil.

A los docentes por todos los conocimientos transmitidos y consejos que a lo largo de la carrera sirvieron para alcanzar esta meta.

Carlos Alfredo Zambrano Z.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco en especial a Dios por haberme dado la vida y guiarme por el buen camino, por la salud y la sabiduría que ha puesto en mí para no desistir en pensamiento y acciones.

A toda mi familia en especial a mis tías que de una u otra manera me brindaron su apoyo incondicional hacia mi persona sin dejar en tela de duda a mis capacidades, misma que permitieron cumplir esta meta. A mis docentes al Ing. Edgar Hernández, Dr. Nelson Duchi y al Ing. Andrés Mancheno por brindarme su ayuda y sus conocimientos.

Confiado siempre en Dios:

**Carlos Alfredo Zambrano Z.**

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

### CAPÍTULO I

1.	<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>3</b>
1.1.	<b>Gallos de combate.....</b>	<b>3</b>
1.2.	<b>Características de los gallos de pelea .....</b>	<b>3</b>
1.3.	<b>Manejo.....</b>	<b>4</b>
1.4.	<b>Sistema reproductivo masculino del gallo .....</b>	<b>5</b>
1.4.1.	<i>Testículos .....</i>	<i>5</i>
1.4.2.	<i>Conductos deferentes.....</i>	<i>6</i>
1.4.3.	<i>Órgano copulador.....</i>	<i>6</i>
1.5.	<b>Espermatogénesis .....</b>	<b>7</b>
1.5.1.	<i>Organización de los túbulos seminíferos .....</i>	<i>7</i>
1.5.2.	<i>Transporte, maduración y supervivencia de los espermatozoides en las vías deferentes .....</i>	<i>7</i>
1.5.3.	<i>Características del semen de los gallos .....</i>	<i>8</i>
1.5.4.	<i>Morfología y Fisiología del espermatozoide de aves .....</i>	<i>8</i>
1.6.	<b>Principales hormonas relacionadas con la reproducción .....</b>	<b>9</b>
1.6.1.	<i>Masculinas .....</i>	<i>9</i>
1.7.	<b>Métodos de obtención del semen .....</b>	<b>10</b>
1.7.1.	<i>Recolección del semen .....</i>	<i>10</i>
1.7.1.1.	<i>Obtención del semen mediante masaje .....</i>	<i>11</i>
1.7.1.2.	<i>Obtención del semen con ayuda de una hembra estimuladora .....</i>	<i>11</i>
1.7.2.	<i>Manejo del Semen fresco .....</i>	<i>11</i>
1.7.3.	<i>Manejo del Semen diluido.....</i>	<i>12</i>
1.8.	<b>Consideraciones para la extracción de semen y la inseminación .....</b>	<b>12</b>

1.8.1.	<i>Consideraciones en el macho</i> .....	12
1.9.	<b>Conservación de semen de gallos</b> .....	13
1.9.1.	<i>Conservación de semen.</i> .....	13
1.9.2.	<i>Dilución del semen fresco</i> .....	13
1.9.3.	<i>Características de los diluyentes</i> .....	14
1.9.4.	<i>Diluyentes de semen</i> .....	14
1.9.5.	<i>Tasa de dilución</i> .....	15
1.9.6.	<i>Conservación en fresco</i> .....	15
1.9.7.	<i>Métodos de criopreservación de semen</i> .....	16
1.9.8.	<i>Protocolos de congelación</i> .....	16
1.9.9.	<i>Descongelación de semen</i> .....	17

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>18</b>
2.1.	<b>Localización y duración del experimento</b> .....	18
2.2.	<b>Unidades experimentales</b> .....	18
2.3.	<b>Materiales, equipos e instalaciones</b> .....	18
2.3.1.	<i>Materiales de campo</i> .....	18
2.3.2.	<i>Materiales de laboratorio (Calidad del semen)</i> .....	19
2.3.3.	<i>Equipos</i> .....	20
2.4.	<b>Tratamiento y diseño experimental</b> .....	20
2.4.1.	<i>Esquema del experimento</i> .....	21
2.5.	<b>Mediciones experimentales</b> .....	22
2.5.1.	<i>Económicos</i> .....	22
2.6.	<b>Técnicas Estadísticas</b> .....	23
2.7.	<b>Procedimiento Experimental</b> .....	23
2.7.1.	<i>Selección de los gallos por medio de las características fenotípicas</i> .....	23
2.7.2.	<i>Producción de semen de gallos</i> .....	23
2.7.3.	<i>Recolección de semen y evaluación</i> .....	24
2.7.4.	<i>Criopreservación del semen</i> .....	25
2.7.5.	<i>Descongelación del semen</i> .....	26
2.7.6.	<i>Costo por tratamiento</i> .....	26
2.8.	<b>Metodología de Evaluación</b> .....	26
2.8.1.	<i>Semen fresco</i> .....	26
2.8.1.1.	<i>Volumen de eyaculado (ml)</i> .....	26



2.8.1.2.	<i>Concentración espermática (spz/ml)</i> .....	26
2.8.1.3.	<i>Medición de Ph</i> .....	27
2.8.1.4.	<i>Color</i> .....	27
2.8.1.5.	<i>Células vivas (%)</i> .....	27
2.8.1.6.	<i>Células muertas</i> .....	28
2.8.1.7.	<i>Motilidad masal (%)</i> .....	28
2.8.1.8.	<i>Motilidad individual</i> .....	28
2.8.1.9.	<i>Morfología</i> .....	28
2.8.1.10.	<i>Viabilidad</i> .....	29
2.8.2.	<i>Post-descongelación</i> .....	29
2.8.2.1.	<i>Motilidad masal, (%)</i> .....	30
2.8.2.2.	<i>Motilidad individual, (puntos)</i> .....	30
2.8.2.3.	<i>Viabilidad espermática (%)</i> .....	30

### **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
3.1.1.	<b>Respuesta animal al entrenamiento para extracción de semen</b> .....	<b>31</b>
3.1.2.	<b>Evaluación de las características macroscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil</b> .....	<b>32</b>
3.1.2.1.	<i>Volumen (ml)</i> .....	32
3.1.2.2.	<i>pH</i> .....	32
3.1.2.3.	<i>Color</i> .....	33
3.1.3.	<b>Evaluación de las características microscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil</b> .....	<b>33</b>
3.1.3.1.	<i># de espermatozoides vivos (millones/ml)</i> .....	33
3.1.3.2.	<i>Células vivas / muertas (%)</i> .....	34
3.1.3.3.	<i>Morfología</i> .....	35
3.1.3.4.	<i>Motilidad Masal (%)</i> .....	36
3.1.3.5.	<i>Motilidad Individual (pts.)</i> .....	36

3.1.4.	<b>Evaluación de las características seminales en la criopreservación, frente a la utilización de tres diluyentes seminales.....</b>	<b>37</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Razas de aves de combate. ....	4
<b>Tabla 2-1:</b>	Volumen y contenido en espermatozoides de los eyaculados de diferentes especies de aves domésticas. ....	8
<b>Tabla 3-2:</b>	Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba. ....	18
<b>Tabla 4-2:</b>	Esquema del Experimento. ....	21
<b>Tabla 5-2:</b>	Esquema de ADEVA. ....	22
<b>Tabla 6-3:</b>	Respuesta al entrenamiento de extracciones seminales de los gallos de raza Asil .....	31
<b>Tabla 7-3:</b>	Características macroscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil. ....	32
<b>Tabla 8-3:</b>	Características microscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil. ....	34
<b>Tabla 9-3:</b>	Características microscópicas al post descongelamiento tras el efecto de tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de raza Asil. ....	38
<b>Tabla 10-3:</b>	Análisis Económico por tratamiento utilizado para la crioconservación seminal de gallos de riña. ....	42

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-3.** Comportamiento de la motilidad masan %, al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil. .... 37
- Gráfico 2-3.** Comportamiento de la motilidad individual pts., al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil. .... 39
- Gráfico 3-3.** Comportamiento de la viabilidad espermática %, al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil. .... 40

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1-2.</b> Ecuación lineal .....	21
<b>Ecuación 2-2.</b> Fórmula para determinar las células vivas .....	27
<b>Ecuación 3-2.</b> Fórmula para determinar las células muertas .....	28
<b>Ecuación 4-2.</b> Fórmula para determinar la motilidad masal .....	28
<b>Ecuación 5-2.</b> Fórmula para determinar la viabilidad espermática .....	29
<b>Ecuación 6-2.</b> Fórmula para determinar la viabilidad espermática .....	30

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A EVALUACIÓN INICIAL DEL VOLUMEN EN MUESTRAS SEMINALES FRESCAS.
- ANEXO B EVALUACIÓN INICIAL DEL PH DEL SEMEN FRESCO DE LOS GALLOS ASIL.
- ANEXO C EVALUACIÓN INICIAL DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO D EVALUACIÓN INICIAL DE CÉLULAS VIVAS /MUERTAS (%) DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO E EVALUACIÓN INICIAL DE LA MORFOLOGÍA (%) DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO F EVALUACIÓN INICIAL DE LA MOTILIDAD MASAL (%) DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO G EVALUACIÓN INICIAL DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL / PUNTOS DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO H EVALUACIÓN INICIAL DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN FRESCO.
- ANEXO I MOTILIDAD MASAL (%), POR EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS DE RIÑA.
- ANEXO J MOTILIDAD INDIVIDUAL (PUNTOS), POR EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS DE RIÑA.
- ANEXO K VIABILIDAD, POR EFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE GALLOS DE RIÑA

## RESUMEN

Se valoró tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de riña, aplicando técnicas de reproducción asistida. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias perteneciente la ESPOCH, ubicada en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, con una metodología experimental, bajo un Diseño Completamente al Azar, empleándose 3 tratamientos con 6 repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por 1 gallo, con una duración de 90 días. La evaluación de la motilidad masal post descongelamiento de las dosis seminales reportaron diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos a ( $P < 0,01$ ), registrando un mayor valor para el dilutor 1+10 % de glicerol con 51,83% a diferencia del dilutor 2+15% de glicerol con el cual se obtuvo el menor porcentaje al descongelar las pajuelas con 10,33%, para la variable motilidad individual reportando el mayor valor con el dilutor 1+10 % de glicerol, obteniendo 3 puntos, a diferencia del menor valor el cual se registró para el dilutor 3 Andromed con 0,58 puntos, en cuanto a la viabilidad espermática, se registraron diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos a ( $P < 0,01$ ), reportando la mayor viabilidad espermática al utilizar el dilutor 1+10 % de glicerol con 47,5 %, a diferencia del menor valor el cual fue registrado con el dilutor comercial Andromed con el 13,33%, lo cual nos permite deducir que los diluyentes utilizados en el proceso de criopreservación de semen en gallos de riña influyeron sobre la calidad seminal. Concluyendo que las mejores características microscopias se presentaron al utilizar el dilutor 1, con una motilidad masal de 51,83%, individual de 3pts., y una viabilidad espermática de 47,5%, recomendando utilizar como base esta investigación, para la conservación seminal en aves, especialmente en especies en peligro de extinción.

**Palabras clave:** <CRIOPRESERVACIÓN>, <DILUTOR>, <PAJUELAS (DOSIS SEMINAL)>, <ASIL (RAZA)>, <MOTILIDAD MASAL>, <MOTILIDAD INDIVIDUAL>. <VIABILIDAD, <RIOBAMBA (CANTON)>.

## SUMMARY

Three dilutors were evaluated in the preservation of semen from kidney cocks, applying assisted reproduction techniques. This research was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of the Faculty of Animal Sciences belonging to ESPOCH, located in the province of Chimborazo, Riobamba canton. With an experimental methodology, under a Completely Random Design, using 3 treatments with 6 repetitions, the experimental unit consisted of 1 rooster, with a duration of 90 days. The evaluation of post-defrosting mass motility of seminal doses reported highly significant differences between treatment means at ( $P < 0.01$ ), registering a higher value for the 1 +10% glycerol dilutor with 51.83% unlike the 2 + 15% glycerol dilutor with which the lowest percentage was obtained by defrosting the straws with 10.33%, for the motility variable individual reporting the highest value with the 1 + 10% glycerol dilutor, obtaining 3 points, unlike the lower value which was registered for the 3 Andromed dilutor with 0.58 points, in terms of sperm viability, highly significant differences were recorded between treatment averages ( $P < 0.01$ ). reporting the greatest sperm viability when using the dilutor 1-10% glycerol with 47.5%. unlike the lower value which was registered with the commercial dilutor Andromed with 13.33%, which allows us to deduce that the diluents used in the process of semen cryopreservation in kidney cocks influenced seminal quality. Concluding that the best microscopy characteristics were presented when using dilutor 1. with a mass motility of 51.83%, individual 3pts, and a sperm viability of 47.5%, recommending using this research as a basis for seminal conservation in birds, especially in endangered species.

KEYWORDS: <CRIOPRESERVATION>, <DILUTOR>, <PAJUELAS (SEMINAL DOSE)>, <ASIL (RACE)>, <MASAL MOTILITY> <INDIVIDUAL MOTILITY <VIABILITY, <RIOBAMBA (CANTON)>.



## INTRODUCCIÓN

En las aves no pueden utilizarse las técnicas convencionales aplicadas a los espermatozoides de mamíferos. La fisiología de los gallos y la escasa repercusión que tuvo la inseminación artificial en general en la explotación de las aves, ha provocado la existencia de pocas investigaciones referentes a la crio conservación de los espermatozoides de las aves; por ello es necesario la realización de ensayos que mejoren los actuales métodos de crio congelación del semen en aves.

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones.

La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores, ésta técnica permite su almacenamiento de manera indefinida en nitrógeno líquido permitiendo la creación de un banco de genes, para posterior tener una mejor facilidad en el manejo.

La criopreservación es significativamente letal para los espermatozoides, además produce alteraciones morfológicas y fisiológicas que interfieren con su capacidad fertilizante, por lo que se requiere adaptar esta técnica para cada especie, con protocolos eficientes para conservar la integridad del espermatozoide.

Existen publicaciones de estudios sobre criopreservación del semen de gallo de pelea, sin embargo, todavía no están dilucidadas dichas técnicas.

En la actualidad se está practicando la inseminación artificial y se difunde cada vez más en el sector avícola, permitiéndonos alcanzar mejores niveles productivos que no podrían conseguirse sin ella y optimizar el trabajo de reproductor y del personal de trabajo de la explotación.

La criopreservación tiene por finalidad mantener la viabilidad espermática durante un ciclo de congelación, descongelación y almacenamiento indefinido en nitrógeno líquido. Los Pioneros en la reproducción avícola asistida fueron Burrows y Quinn (1937), ellos desarrollaron el método de masaje dorso abdominal en gallos para la extracción y recolección de semen.

En cuanto al impacto que pudiera causar esta biotecnología de la reproducción en el medio donde se desarrolle, no hay ninguna afectación negativa, más bien esta técnica es de gran importancia por su aplicación, ayuda en el mejoramiento genético y la recuperación y el mantenimiento de especies en peligro de extinción.

Este tipo de reproducción asistida, requiere no más de la aplicación técnica sustentada en valores éticos de un profesional con miras al desarrollo económico, social y el respeto ecológico en el medio ambiente dentro de un país, por lo mencionado anteriormente nos hemos planteado los siguientes objetivos:

General:

Aplicar técnicas de reproducción asistida en gallos de riña

Específicos:

- Seleccionar gallos de mejor valor fenotípico y características de riña.
- Entrenar gallos como donadores de semen.
- Valorar la calidad del semen de gallos pre y pos congelamiento.
- Preparar diferentes tipos de diluyente para conservación y transporte de semen de gallos.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Gallos de combate

En la actualidad se tiene conocimiento de las peleas de gallos desde 3000 años AC. En la India, Persia, Grecia, Egipto y Japón existiendo antiguos documentos de la gran afición de la humanidad por las peleas de gallos. (Mañas, 1996 ,p. 12)

El gallo de pelea pertenece a la especie *Gallusdomesticus* y se postula que tuvo su origen en dos raíces principales: *GallusBankiva* y *GallusSonerati*, ambas especies silvestres que vivían en estado salvaje en Asia (Larbaletrier et al, 1957, p .9).

En América del Sur aún no está definido si los primeros galliformes se dice que fueron introducidos por los conquistadores o ya existían, afirmación avalada en cartas de Cristóbal Colón dirigida a los reyes de España, en que señala que vio gallinas como las de Castilla, más grandes y con plumas como lana (Lasheras, 1960, p. 7).

### 1.2. Características de los gallos de pelea

En la actualidad se reconoce a cuatro especies extintas de gallos silvestres que son las que dieron origen a las razas actuales y son las siguientes: El gallo colorado (*Gallusgallus*), el gallo de Ceylán (*Galluslafayettei*), el gallo de Sonnerat (*Gallussonnerati*) y el gallo verde de Java (*Gallusvarius*) (Bundy,et al, 1960, p .6).

El gallo colorado (*Gallus gallus*) está caracterizado por tener una golilla larga que va del color dorado al rojo vivo. Las alas son verde metálico, el pecho negro, la cola negra. Por lo general es polígamo, el color de las orejas es blanco o rojo y los huevos son de color blanco. Sus ojos varían entre naranja o rojo, el pico es amarillo. Las patas pueden ser de color gris, verdes y amarillas. El tipo de cresta puede ser crestisierra o crestirosa con base simple. (Bixler, 1996, p. 4).

**Tabla 1-1:** Razas de aves de combate.

<b>Occidentales</b>	<b>Orientales</b>
English Game	Shamo
BatamGame	Aseel
Española de combate	Calcuta
American Tipe	Modern Game
Raza canaria	Tuzo
Clarethatch	
Kelso	
Rould head	

**Fuente:** Mañas, 1996.

Los gallos orientales de combate presentan ciertas características que los hacen diferentes de los gallos occidentales, también conocidos como europeos. Estos gallos orientales se caracterizan por no tener barbas, por la escasez de su plumaje el cual es opaco y menos llamativo, las alas cortas, la cola rala e inclinada hacia el suelo formando un ángulo de 180° con la línea del tronco. Su cresta de cojinete o trilobulada, son más corpulentos y musculosos. (Bixler, 1996, p. 4)

### **1.3. Manejo**

El manejo técnico los gallos de pelea es muy diferente a otras aves de interés zootécnico, debido a su temperamento tan agresivo. Por ese motivo de los 7 a 8 meses de edad se seleccionan y separan, ubicándolos en jaulas individuales, estos cuentan con corrales o voladeros bien amplios con posaderos para ejercitarse, las jaulas tienen que estar ventiladas, pero sin corrientes de aire, secos y con un piso blando de tierra con paja para que el ave pueda escarbar. (Pérez, 1999, p .8).

A los ocho meses se les corta la cresta y las barbillas A los 10 meses se realiza la primera calificación, la cual consiste en un análisis de la condición física, temperamento, morfología, cualidades combativas y de peso. Este proceso dura aproximadamente 1 meses durante el que se lleva un registro de cada ave (Medina, 2003, p .14).

Las aves que han cumplido las expectativas o requeridos de los criadores se conservaran y regresaran a los voladeros, donde mantienen hasta tener una edad óptima para pelear, la cual en el caso de las aves tipo español es a partir de los 15 meses de edad y en las de tipo oriental, a los 19 meses. (Pérez, 1999, p .8).

En cuanto al manejo de las gallinas es algo distinto, ya que estas se mantienen agrupadas en corrales donde se establece una jerarquía social, sin que se observen mayores conductas de agresividad. Estas se clasifican de acuerdo a la genética y progenie. Ubicándolas con otros gallos de diferente descendencia para evitar consanguinidad o también si sus hermanos son bien calificados son dejadas como futuras reproductoras, (Medina, 2003, p. 14).

Cuando el macho seleccionado ha cumplido con la edad adecuada para pelear, se realiza nuevamente una calificación para determinar si ha mantenido las características que se evaluaron anteriormente. Si esto es así, el gallo será trasladado hacia los corrales donde se realiza el entrenamiento para las peleas. En esta etapa, que dura de 2 a 4 meses puede ser acondicionado por el mismo criador o por una persona que se dedica a prepararlos. (Medina, 2003, p. 15).

El objetivo es observar la condición de salud y ejercitar para mejorar el estado físico y resistencia del ave. En este período se les suministra una dieta balanceada de alimento y vitaminas que ayudan a mejorar la condición del gallo. Posterior a los ejercicios recibe un baño y masajes musculares. El entrenamiento se realiza hasta que el gallero determine que el gallo está en plena forma para poder pelear, previo a una pelea se dejan descansar 7 a 10 días. (Medina, 2003, p. 15).

Los resultados de cada pelea se ingresan a una estadística del registro del propietario. Para ello se hace un análisis de sus aves y basándose en los resultados determina cuales cumplen las condiciones para ser reproductores. Posteriormente, el criador en base a los antecedentes de los padres y familias que están en reproducción determina cual o cuales son los reproductores que están transmitiendo las características combativas y morfológicas apropiadas. (Medina, 2003, p. 16)

#### **1.4. Sistema reproductivo masculino del gallo**

En las aves, el aparato reproductor del macho está constituido por tres unidades morfo funcionales: Los testículos. Las vías deferentes, el órgano copulador. (Ricaurte 2006, p. 22)

##### **1.4.1. Testículos**

Lo testículos son órganos pares, de forma arriñonada, internos, situados entre la base de los pulmones y el segmento intermediario de los riñones. Aunque está próximo a los sacos aéreos, su temperatura es la misma que la temperatura corporal del animal (41 - 43° C). En consecuencia, la espermatogénesis tiene lugar a esa temperatura y no a una inferior, como ocurre en algunos mamíferos. (Ricaurte, 2006, p. 22)

El tubo seminífero desemboca, a través de la vesícula espermática, en el urodeo. Cada una de las dos vesículas espermáticas concluye en una papila eyaculadora con estructura de pene. Podemos definir espermatogénesis como el conjunto de transformaciones sufridas por las células germinales desde las espermatogonias hasta los espermatozoides, procesos que ocurren en el epitelio seminífero. (Ricaurte, 2006, p. 22)

Estas transformaciones se efectúan en estrecha relación con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli y están bajo control de las hormonas gonadotropas hipofisarias. Brevemente, la espermatogénesis tiene lugar en 3 fases consecutivas: divisiones espermatogoniales, meiosis y espermatogénesis (Ricaurte, 2006, p. 22)

#### **1.4.2. Conductos deferentes**

Los espermatozoides una vez liberados a la luz interna de los túbulos seminíferos y por la secreción del líquido en los mismos hace que el conjunto se conduzca hasta la rete testis, de estructura ciliada, lo cual ayuda en la propulsión de los espermatozoides, desde allí a través de los conductos eferentes pasa por el epidídimo y son transportados a los conductos deferentes. (Duchi, 2009 p 22),

El túbulo deferente desemboca, a través de la vesícula espermática, en el urodeo. Cada una de las dos vesículas espermáticas concluye en una papila eyaculadora con estructura de pene. Los espermatozoides testiculares no son móviles ni tienen poder fecundante, el estado de maduración lo adquieren en las vías deferentes. (Duchi, 2009, p. 22).

#### **1.4.3. Órgano copulador**

Esta denominación abarca el conjunto de los repliegues linfáticos de la cloaca, el falo y los cuerpos vasculares para cloacales. Estos últimos son cuerpos ovoides, incrustados en la pared de la cloaca, que se llenan de linfa en el momento de la erección. Dicha linfa transuda en la cloaca, a través de los repliegues linfáticos, en forma de un fluido transparente, que puede mezclarse con el semen. (Peralta, 2002, p. 2)

En el momento de la erección, los repliegues redondeados de la cloaca se hinchan, formando una ligera protuberancia hacia el exterior de la cloaca y constituyen un pequeño canal por donde se evacua el esperma. El falo, vestigial en el gallo y el pavo, está bien desarrollado y provisto de un canal de forma espiral en las palmípedas. En el momento de la cópula, hay un contacto entre las

cloacas del macho y la hembra en el primer caso, mientras que, en el segundo, hay una verdadera penetración. (Peralta, 2002, p .2)

## **1.5. Espermatogénesis**

Este proceso es muy importante, ya que nos permite evaluar y utilizar los machos reproductores y poner a punto métodos de cría y recría, mediante la evaluación y el control de la producción testicular. Sin embargo, existen diferencias de producción en función de la edad, el individuo, el origen genético, las condiciones del medio. (Peralta, 2002, p .2).

### **1.5.1. Organización de los túbulos seminíferos**

Los túbulos seminíferos están limitados por túnica propia, que aísla el epitelio seminífero del compartimiento intertubular y, por lo tanto, de la red arterio-venosa del testículo. Esta pared, responsable de los intercambios entre los compartimientos, está formada por dos capas: externa, que colabora en el transporte de los espermatozoides hacia la salida del testículo, e interna, o membrana basal, que regula los intercambios extra e intratubulares de esta gónada. (Peralta, 2002, p .2)

El epitelio seminífero propiamente dicho, está formado por las células de sértoli y las células germinales, con sus tres categorías principales: espermatogonias, espermatoцитos I y espermátidas. Además, recalca que la organización de las diferentes células germinales en capas concéntricas, que se extienden desde la membrana basal hasta la luz central, llamada ciclo del epitelio seminífero, que ha sido perfectamente delimitado en las distintas especies de mamíferos. (Peralta, 2002, p .2)

### **1.5.2. Transporte, maduración y supervivencia de los espermatozoides en las vías deferentes**

Cuando los espermatozoides son liberados al lumen de los túbulos seminíferos, van a la rete testis. Parecería que el mecanismo que ayuda al avance del semen son las células ciliadas presentes en la pared de las vías deferentes, por un lado, y las células musculares que se contraerían, ayudando al avance del mismo hacia el órgano copulador. ((Peralta, 2002, p. 2)

### 1.5.3. *Características del semen de los gallos*

El volumen de los eyaculados, su contenido en espermatozoides y en consecuencia el número total de espermatozoides por eyaculado varían considerablemente en función de: la especie y la estirpe, el individuo y su estado fisiológico y las condiciones y el método de recolección, este último puede ser por masaje abdominal, o por interrupción de la cópula natural (Peralta, 2002, p .2)

**Tabla 2-1:** Volumen y contenido en espermatozoides de los eyaculados de diferentes especies de aves domésticas.

<b>Especie</b>	<b>Volumen de los eyaculados (ml)</b>	<b>Contenido en espermatozoides del semen (x 10<sup>4</sup>/mL)</b>
<b>Gallo estirpe ligera</b>	0,2 – 0,8	1-4
<b>Gallo estirpe pesada</b>	0,3 – 1,5	3-10
<b>Pavo</b>	0,2 – 1,0	6-12
<b>Pato común</b>	0,2 – 1,2	1-4

**Fuente:** (Sauveur y de Riviers, 1992).

### 1.5.4. *Morfología y Fisiología del espermatozoide de aves*

Las aves por lo general, la célula espermática es larga y cilíndrica y rematada en punta en las dos extremidades, está constituida por tres segmentos, la parte acrosomal y nuclear (cabeza), parte media y la cola; la parte más ancha mide 0,5  $\mu\text{m}$  y con longitud media de 100  $\mu\text{m}$ . (Etches, 1996, p. 12)

El volumen de la célula espermática puede ser de 10  $\mu\text{m}^3$  si se compara que el espermatozoide proviene de una espermatogonia que tiene 6  $\mu\text{m}$  de diámetro y 75  $\mu\text{m}^3$ , el volumen del espermatozoide se reduce. (Etches, 1996, p .12).

El acrosoma se origina del aparato de Golgi de la espermatogonias, contiene enzimas glucolíticas y proteolíticas necesarios para la fertilización. En el núcleo están condensados los cromosomas. La pieza intermedia y la cola derivan de las mitocondrias y el cito esqueleto de la célula de origen, estas estructuras funcionales proporcionan la motilidad al espermatozoide, la porción intermedia está unida a la cabeza por el centriolo proximal. (Etches, 1996, p. 12),

La parte intermedia de la cola contiene alrededor de 30 mitocondrias que se encargan del metabolismo energético del espermatozoide. Los espermatozoides de las aves a nivel de testículos



y conductos deferentes deben sobrevivir sin tener relación con el sistema vascular que le proveerá de elementos requeridos para la respiración y nutrición celular 16 como también utilizar esta vía para la eliminación de desechos del metabolismo. (Etches, 1996, p. 12).

Además, la supervivencia de las células espermáticas en el tracto femenino se ve prolongada en las glándulas colectoras o espermotecas, las mismas que tienen un sistema metabólico especial para mantener la capacidad fecundante del espermatozoide durante su permanencia in vivo. (Etches, 1996, p. 12),

La capacidad de aprovechar sustratos energéticos para el metabolismo energético por parte del espermatozoide es variable en función de la especie avícola. La célula espermática de gallo bajo condiciones anaerobias puede convertir la glucosa a lactato, sin embargo, este mecanismo metabólico es casi nulo en el espermatozoide del pavo. (Sauver, et al, 1992, p .74),

Los espermatozoides salen embebidos en las secreciones de los testículos y conductos secretores que proporcionan sustrato y tampones al medio. Además, al analizar la composición química del líquido seminal y plasma sanguíneo de las aves no se considera la aportación de glucosa del plasma sanguíneo de las aves no se considera la aportación de glucosa del plasma linfático al semen por la baja concentración de glucosa en este. (Duchi, 2009, p. 22).

## **1.6. Principales hormonas relacionadas con la reproducción**

### **1.6.1. Masculinas**

El desarrollo testicular y la espermatogénesis se realiza en dos etapas del ave: prepúber y púber. Las 17 edades en que tiene lugar una y otra etapa, sin embargo, depende de varios factores:

- Condiciones del medio (especialmente la iluminación).
- Origen genético de los gallos, presentándose, además
- Variaciones entre uno y otro individuo. (Peralta, et al 2002, p. 13)

Durante el período prepúber, el acontecimiento más importante es la proliferación activa de las células de Sertoli, y en la línea germinal, divisiones celulares llegando a advertirse sólo espermatozoides I. por lo que se produce un importante aumento en el peso medio de los testículos. Esta etapa dura unas 8-10 semanas. (Peralta, et al 2002, p. 13)

En el período púber, aparecen el resto de las células de la línea germinal, pudiendo advertirse espermatozoides. Por ello se produce un gran aumento en el peso testicular. Esta etapa dura en promedio unas 10 semanas, durante la madurez sexual, el peso testicular y el número de espermatozoides están en su apogeo, produciéndose paralelamente una evolución en la calidad de las gametas su capacidad de fecundación, motilidad y duración de la supervivencia in vitro son mayores. (Peralta, et al 2002, p. 13)

Diferentes estudios realizados en aves, han demostrado la presencia de dos factores liberadores: LHRH I y II, que presentan diferentes características uno de otro. La LHRH I tiene una estructura molecular semejante al GnRH de mamíferos, y permanece mucho tiempo en la circulación, ejerce una acción prolongada sobre las gonadotrofinas (LH y FSH), mientras que la LHRH II es 2,5 veces más potente que la I, ejerciendo una acción rápida sobre la LH y rápidamente es metabolizada. (Peralta, et al 2002, p. 13)

Incluso se han observado distintos efectos en machos respecto de las hembras. Dentro de las gonadotrofinas, la LH controla la producción de esteroides en las células de Leydig, mientras que la FSH modula la función de las células de Sertoli. Entre las hormonas testiculares, la testosterona es la más importante, y junto con otros 18 andrógenos, tienen su acción en el epitelio seminífero, función que culmina con la producción de espermatozoides. (Peralta, et al 2002, p. 13)

A la vez, los andrógenos regulan la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, mediante mecanismos de retroalimentación negativos, así como la actividad de los órganos reproductivos accesorios y los caracteres sexuales secundarios del macho (Peralta, et al 2002, p.13)

## **1.7. Métodos de obtención del semen**

### **1.7.1. *Recolección del semen***

Uno de los métodos más eficaces para la obtención del semen es mediante el masaje dorso-abdominal con ordeño de la cloaca, descrito por Burrows, W. y Quinn, P. (1935) y que en la actualidad es el más común en aves como los gallos, pavos, faisanes, aves rapaces, columbiformes e incluso aves de pequeño porte como fringílicos. (Muñoz 2011, p. 3)

Otro método utilizado en patos y rapaces es el de recogida con vagina artificial siempre que se disponga de una hembra estimuladora o en el caso de las rapaces que el animal esté improntado.

Independientemente de la técnica empleada siempre se debe efectuar un entrenamiento antes de la puesta en práctica. Las técnicas empleadas en la recogida de semen son: (Muñoz 2011, p. 3)

#### *1.7.1.1. Obtención del semen mediante masaje*

Este método requiere de la mano de dos técnicos. Uno realiza el masaje en la región dorso-abdominal al macho y lo sujeta al cabo de dos o tres pasadas de la mano, el ave levanta la cola y muestra la cloaca muy manifiesta con el pene en semieversión, se oprime la región lateral de la cloaca, lugar donde se encuentran las vesículas espermáticas consiguiendo la expulsión del semen. (Muñoz 2011, p. 3)

Es entonces cuando la segunda persona debe recoger el semen por aspiración evitando que se contamine paralelamente con orina, heces, ya que estos fluidos tienen efectos desfavorables sobre la calidad espermática y poder fecundante del semen obtenido. (Muñoz 2011, p. 3)

#### *1.7.1.2. Obtención del semen con ayuda de una hembra estimuladora*

Para la obtención del semen mediante una hembra estimuladora, es el más utilizado en los patos, alojando los machos en jaulas individuales, se les presenta una hembra para estimularlos y si la hembra está receptiva y el macho sexualmente activo, el cortejo se produce rápidamente. Es entonces cuando se va a producir la cópula cuando el operario debe hacer salir el pene haciendo una ligera presión encima de la cloaca con la posterior erección de este y su consecuente salida de semen. (Muñoz 2011, p. 4)

Para poder adiestrar los machos estos deben de iniciarse en el momento en que empiezan a ser sexualmente activos. En el caso de las aves rapaces improntadas el que actúa como estímulo sexual para el macho, es el propio criador, aunque el mecanismo por el cual se produce este estímulo en el ave no está muy claro, la técnica consiste en hacer subir a la rapaz encima de una especie de gorro que se pone en la cabeza del criador y que actúa como mecanismo de recogida del semen. (Muñoz 2011, p. 4)

#### *1.7.2. Manejo del Semen fresco*

Se recomienda realizar las colectas a los gallos de 2 a 3 veces por semana, e inmediatamente se utiliza el semen fresco para inseminar a las gallinas. El volumen promedio de cada gallo es de 0.4 a 0.5 ml/ave, se utiliza 0.1 ml para inocular al ave. (Jácome, 2005, p. 12)

### **1.7.3. Manejo del Semen diluido**

Se recomienda también que el esperma recolectado se diluye en lactato de ringer, con diluciones 1:2, a una temperatura de 40 °C y se debe utilizar el 0.1 ml de semen diluido para inseminar cada ave. (Jácome, 2005, p .12)

## **1.8. Consideraciones para la extracción de semen y la inseminación**

### **1.8.1. Consideraciones en el macho**

Las consideraciones a tomar en cuenta en el macho son:

- Recorte de plumaje alrededor de la cloaca.
- Deben ser entrenados.
- Masajeados de 7-10 días para facilitar la eyaculación.
- Alimentar después de la colección de semen para reducir la contaminación fecal.
- Control del peso corporal. (Santiago, 2010, p .7).

A veces se presenta la dificultad de conseguir la erección del órgano copulador en gallos asustados y en los que son demasiado jóvenes, también se debe a la falta de inexperiencia y práctica de la persona que debe hacerlo. Por ende, es mejor empezar a practicar con gallos que se encuentren aptos reproductivamente y hayan estado con gallinas. Al cabo de uno o dos días de haberlos colocado en las jaulas ya podemos iniciar las extracciones. (Santiago, 2010, p. 7).

Después de poco tiempo los gallos se habitúan y la erección del órgano copulador se producirá justo cuando lo colocamos sobre la mesa o el potro. En este caso ya sólo precisara de una presión sobre las vesículas seminales a ambos lados de la cloaca, a esto se le acompaña con ligeras presiones en el abdomen. Por lo cual es normal que en las primeras extracciones en gallos jóvenes obtengamos alguna gota de sangre. (Francesch, 1994, p. 6)

A veces puede ocurrir que se consiga la erección del órgano copulador, pero no se obtenga secreción de semen. Esto sucede cuando se practica con gallos que encuentran con gallinas en la

jaula o cuando aquéllos son demasiado jóvenes. Si esto sucediera por varias ocasiones puede tratarse de un caso de esterilidad. Por lo que la cantidad de semen es variable. (Francesch, 1994, p. 6)

En gallos con edades desde 8 meses a 2 años se puede esperar un promedio de 0,7 ml por extracción, cuando éstas se realizan diariamente. No es aconsejable, de cara a la fertilidad de las muestras, realizar más de una extracción al día. Lo que se ha visto es que una extracción diaria, frente a una semanal, favorece la fertilidad. (Francesch, 1994, p. 6)

## **1.9. Conservación de semen de gallos**

### **1.9.1. Conservación de semen.**

Existen dos maneras de conservar in vitro al semen. En términos generales el almacenamiento del semen líquido es una práctica frecuente que involucra la dilución del semen en amortiguadores a baja temperatura (5°C aproximadamente) para ser utilizado en la IA. Se ha demostrado que, dependiendo de los 51 ingredientes utilizados para hacer un diluyente, este tendrá diferente capacidad para conservarlo. (Sexton, 1988, p. 131).

La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con crio protectores, ésta técnica permite su almacenamiento de manera indefinida en nitrógeno líquido permitiendo la creación de un banco de genes, con ello se facilita el manejo posterior (Bakst, 1990, p. 91).

La conservación espermática en fresco y la criopreservación son dos herramientas de la reproducción asistida que se ha perfeccionado para dicho propósito, aunque existen riesgos que están aunados a estas técnicas como lo es el aspecto higiénico y la transmisión de ciertas enfermedades, los cuales deben ser considerados. (Thiber, et el, 2000, p .32)

### **1.9.2. Dilución del semen fresco**

El problema de si diluir o no el semen está relacionado con el tiempo que vaya a transcurrir hasta que este sea utilizado. En los casos en los que el semen es utilizado de 30-45 minutos tras su obtención, no es necesario diluirlo. En cambio, cuando el tiempo sea superior es imprescindible diluirlo a la vez que se recoge e incluso refrigerarlo. (Muñoz 2011, p .6)

### **1.9.3. Características de los diluyentes**

Se dice que los diluyentes deben ser capaces de preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides, tamponar la acidificación del medio como consecuencia del metabolismo de los espermatozoides, aportar nutrientes de tipo energético en determinadas ocasiones y de preparar a los espermatozoides para la congelación. En el caso de que el semen diluido sea utilizado sin haberse congelado, los diluyentes utilizados pueden ser soluciones tampón que favorezcan la capacidad fecundante de los espermatozoides. (Muñoz 2011, p. 6)

Los tampones del tipo fosfato de sodio deben ser descartados mientras que el TES puede utilizarse si se utiliza a una concentración de 65g/l para garantizar una presión osmótica de 380-400 mosm/l. Entre los diluyentes más utilizados, encontramos los de Lake o de Sexton que cumplen con la osmolaridad y además incluyen hasta varios sistemas tampón (citrato, acetato, BES o TES). (Muñoz 2011, p .6)

### **1.9.4. Diluyentes de semen**

Diluyentes más utilizados comúnmente en aves es una solución de 1% NaCl. La mayoría son mezclas de amortiguadores de diferentes sales, la razón de la dilución comúnmente utilizada es de 1:4 (semen: diluyente) y por lo general se debe inseminar de 30 a 45 min luego de colectar el semen. Estos diluyentes permiten almacenar semen hasta por 24 h sin ningún efecto en la fertilidad (Santiago, 2010, p. 7).

En un trabajo investigativo que se realizó en la obtención y congelación de semen de gallo domestico usando como diluyente el glutamato de sodio donde se trabajaron 49 eyaculados de gallos Plymouth Rock Barrada, el diluyente glutamato de sodio se preparó o fue elaborado con 0,9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo, 10% de glicerol, 0,0011 g de cloranfenicol en 27 ml de agua bidestilada. (Hernández et al 2005, p .5)

La mayoría de los diluyentes para aves tienen al glutamato de sodio combinado con otros ingredientes, pero en la actualidad existe la falta de algunos componentes, esto ha llevado a sugerir algunas alternativas más prácticas, como el empleo del glutamato de sodio con yema de huevo, antibiótico y glicerol, que sirva como un medio para la conservación de espermatozoides de gallo durante el proceso de congelación y descongelación. (Hernández et al 2005, p. 5)

También, se ha demostrado en los diluyentes convencionales utilizados para aves, que la adición de substancias como la albúmina sérica bovina, ayuda a mantener por mayor tiempo y con una

alta calidad los valores de movilidad espermática del semen conservado en fresco a 7 °C por 24 h (Bakst et al, 1992, p .15)

### **1.9.5. Tasa de dilución**

Una mayor dilución no aumenta el porcentaje de fecundidad sino todo lo contrario, una dilución excesiva puede dar lugar a una menor motilidad y a una disminución en el poder fecundante de los espermatozoides. La tasa de dilución debe ser la justa para poder aportar todas las ventajas de la dilución. Así el nivel adecuado de dilución suele estar entre 1:2 y 1:3 para las distintas especies. (Muñoz 2011, p. 6)

### **1.9.6. Conservación en fresco**

Los espermatozoides de gallo pueden ser conservados con capacidad fertilizante hasta por 24 horas. Para esto, es necesario proporcionar al menos una provisión de oxígeno, suplir la fructosa o glucosa en el diluyente, mantener el pH en intervalos de 6.0 a 8.8, mediante amortiguadores con una mezcla de sales de fosfatos, citratos y amortiguadores orgánicos como el BES (N, N-bis (2 hidroxietil)-2-aminoetano de ácido sulfónico) y el TES (N- tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano de ácido sulfónico). (Donoghue et al, 2000, p. 62).

Se ha demostrado que la conservación en fresco en diluyentes, con el plasma seminal, este reduce la peroxidación de lípidos (Surai et al 1998, p .19)

Otros, son la temperatura y el tiempo de conservación, ya que se ha demostrado que los espermatozoides de gallo y pavo, son capaces de mantener reservas de energía en forma de ATP, mediante la glucólisis y respiración, con valores óptimos de estos parámetros, a temperaturas de 5 °C y no así a 40 °C (Wambeke et al 1989, p. 30).

En otro estudio con espermatozoides de gallo, se evaluó la viabilidad del semen fresco conservado a 4 °C, en un periodo entre 0 y 24 h post eyaculación, observando una disminución de la viabilidad en un intervalo de 93 al 65 % aproximadamente. Otro factor que influye en la conservación en fresco de los espermatozoides es la tasa de dilución, es por esto, que se han realizado estudios para determinar la dilución óptima para obtener los mejores resultados de fertilidad. (Chalah et al, 1998 p 23)

Otro factor que influye en la conservación en fresco de los espermatozoides es la tasa de dilución, es por esto, que se han realizado estudios para determinar la dilución óptima para obtener los

mejores resultados de fertilidad. En espermatozoides de gallo, se ha demostrado que la mejor dilución fue en proporción de 1:2 semen-diluyente, conservándolo el menor tiempo posible (1 h) después de eyaculado. (Pereira et al, 1999, p. 20).

### **1.9.7. Métodos de criopreservación de semen**

El uso tecnología para la criopreservación de semen se ha desarrollado desde hace aproximadamente 50 años. Existen diferencias fisiológicas de las células espermáticas entre las especies e incluso entre individuos, pero representa un problema sin resolver. A pesar de los ensayos realizados en el campo de la criopreservación espermática, pocas técnicas permiten supervivencias elevadas. (Hofmo et al, 1991, p .17).

Según la velocidad de la curva de enfriamiento y descongelamiento de las células espermáticas. Las técnicas de criopreservación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultra rápida y vitrificación. (Boiso, 2001 p 127).

En el caso de la congelación lenta el descenso de la temperatura (curva de enfriamiento) se realiza lentamente, en un congelador programable y además la adición de crioprotector suele hacerse por pasos. La descongelación lenta también se lleva a cabo mediante el uso de un congelador programable; la descongelación rápida se realiza a temperatura ambiente o mediante el uso de un baño maría, para evitar la recristalización del agua (Boiso, 2001, p. 127).

La vitrificación está basada en la congelación ultra rápida, pero utiliza una combinación de crioprotectores (solución vitrificante) que al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, sin formación de hielo y tomando de ahí su nombre (Rall et al, 1985, p .35).

### **1.9.8. Protocolos de congelación**

La etapa de enfriamiento es un periodo de adaptación para los espermatozoides a un metabolismo reducido, el semen ya diluido se enfría hasta los 5°C, a una velocidad de unos -0.2 a 0.4 °C/minuto. Generalmente, en las primeras dos horas se da la disminución de la temperatura de la muestra hasta igualarse con su entorno (5°C). Una vez que el semen diluido alcanza los 5°C, por ello se recomienda mantenerlo a esta temperatura durante 1.5 a 2 horas, este proceso es conocido como equilibrado. (Salamon et al, 1995, p. 21).



Durante este periodo los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol antes de la congelación, permitiendo que el glicerol penetre en las células espermáticas y que se establezca un equilibrio entre la concentración intra y extracelular, pero no solo de glicerol, sino también del resto de componentes osmóticamente activos (Salamon et al 1995, p .21).

La congelación se realiza en vapores de nitrógeno líquido, de forma manual o automatizada. En la congelación manual, la velocidad de congelación se regula por la distancia de las pajuelas o tubos al nivel del nitrógeno líquido (10 a 100 °C/minuto). Las pajuelas se colocan horizontalmente en una gradilla a una distancia de 3-4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno o de cualquier material aislante. (Evans et al 1990, p .14).

Las pajuelas se exponen a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a -100°C) durante 10 a 20 minutos y posteriormente son depositadas directamente en el nitrógeno líquido (-196 °C) (Evans et al 1990, p. 14).

La congelación automatizada se realiza mediante un biocongelador programable controlado por un ordenador. Consiste en un arcón, en el cual va entrando de forma controlada el nitrógeno para ir disminuyendo progresivamente la temperatura, ajustándose a una rampa previamente fijada) (Evans et al 1990, p .14).

Si se preparan pellets o pastillas, se congelan las gotas de semen refrigerado (0.1-0.5 mL) directamente sobre pequeños orificios realizados en una superficie de hielo seco o sobre un polímero que se mantenga a una temperatura de entre -80 y -95°C, dejándoles allí durante 2-3 minutos, para luego transferirlos a nitrógeno líquido. (Evans et al 1990, p .14).

### **1.9.9. Descongelación de semen**

Como norma general, cuanto más rápidamente se congele el semen, más rápido se debe descongelar a fin de obtener una más rápida recuperación de los espermatozoides.

En una investigación no se encontró diferencias en la motilidad y vitalidad entre la descongelación de semen de gallo de raza Murciana a 32 °C durante 30 segundos sin diluyente, a 4 °C durante 7 minutos con diluyente BPSE, a 56 °C durante 8 segundos sin diluyente. Y, por último, a 37 °C durante 1 minuto, a temperatura ambiente y sin diluyente. (Duchi et al. 2010, p. 12)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Localización y duración del experimento

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, que está ubicada en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba kilómetro 1½ Panamericana Sur. A una altitud de 2,754 msnm. La presente investigación tuvo un tiempo de duración de 90 días. En la tabla 3-2, se describe las condiciones meteorológicas del cantón Riobamba.

**Tabla 3-2:** Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba.

INDICADORES	VALOR
Temperatura (°C).	13,45
Precipitación (mm/año)	42,80
Humedad relativa (%).	61,40
Viento / velocidad (m/s).	2,50
Heliofania (horas/ luz).	1317,60

**Fuente:** Estación Meteorológica de la Facultad de Recursos Naturales 2017.

#### 2.2. Unidades experimentales

Para esta investigación, el Tamaño de la Unidad Experimental fue de un semoviente con un total de dieciocho gallos aptos para la reproducción, provenientes de la raza Asil de la misma parvada.

#### 2.3. Materiales, equipos e instalaciones

##### 2.3.1. *Materiales de campo*

- Jaulas metálicas
- Gallos de pelea

- Alimento
- Comederos
- Bebederos
- Valdez
- Pala y escoba
- Mesa.

*Materiales para colecta*

- Guantes quirúrgicos
- Tijeras
- Papel aluminio
- Eppendorf de 1 ml
- Termómetro
- Caja para transportar
- Mandil

**2.3.2. *Materiales de laboratorio (Calidad del semen)***

- Colorantes eosina - nigrosina
- Diluyente
- Placas porta objetos

- Placas cubre objetos
- Cajas petri
- Placas de Neubauer
- Vasos de precipitación
- Balón volumétrico 100ml
- Pipeta de 5 ml desechables
- Papel absorbente

### 2.3.3. *Equipos*

- Balanza manual
- Microscopio
- Tanque de nitrógeno
- Placa calefactora

## 2.4. **Tratamiento y diseño experimental**

En la presente investigación se evaluó el efecto de la utilización de tres diluyentes para la crío preservación de semen de gallos de riña, los tratamientos Fueron: tratamiento uno (D1) se empleó el diluyente Lake y Stewart ( 0.9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo,0.0011 g de florfenicol 27 ml de agua,10 % de glicerol) % y el tratamiento dos (D2) se administró Lake y Stewart ( 0.9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo,0.0011 g de florfenicol 27 ml de agua,15 % de glicerol) D3 diluyente testigo (Andromed). Es decir, esta investigación se compuso de 3 tratamientos experimentales con 6 repeticiones un tamaño de la unidad experimental de 1, dando un total de 18 unidades experimentales. Las unidades experimentales fueron distribuidas bajo un diseño completamente al azar y para su análisis se ajustó al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$ : Valor de la variable en determinación.

$\mu$ : Media general.

$T_i$ : Efecto del dilutor

$\varepsilon_{ij}$ : Efecto del error experimental.

#### 2.4.1. *Esquema del experimento*

En la tabla 4-2, se describe el esquema del análisis de varianza que fue utilizado en la investigación.

**Tabla 4-2:** Esquema del Experimento.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE*	Rep. /trat.
Dilutor 1 más 10 % de glicerol	T1	6	1	6
Dilutor 2 más 15 % de glicerol	T2	6	1	6
Dilutor 3 Andromed	T3	6	1	6
<b>TOTAL</b>				<b>18</b>

Realizado por: Zambrano, Carlos 2019.

En la tabla 5-2, se indica el esquema del Análisis de Varianza (ADEVA).

**Tabla 5-2:** Esquema de ADEVA.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	17
Tratamiento	2
Error	15

**Realizado por:** Zambrano, Carlos 2019.

## **2.5. Mediciones experimentales**

- Volumen ml
- PH
- Color
- # de espermatozoides vivos (millones/ml)
- Células vivas / muertas (%)
- Morfología
- Motilidad masal (%)
- Motilidad individual (%)
- Viabilidad

### **2.5.1. Económicos**

- Costos de producción USD

## **2.6. Técnicas Estadísticas**

En la presente investigación los datos de campo obtenidos en cada uno de los tratamientos se procesaron en el sistema estadístico SPSS e INFOSTAT (2013) para la estadística inferencial, mientras que, para el análisis descriptivo, se utilizó SPSS respectivamente, sometiéndose a los siguientes análisis estadísticos. Bajo un sistema completamente al azar.

- Análisis de varianza (ADEVA) a un nivel de significancia de  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .
- Separación de medias a través de la prueba de Duncan a un nivel de significancia de  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

## **2.7. Procedimiento Experimental**

### **2.7.1. Selección de los gallos por medio de las características fenotípicas**

Los criterios para la selección de los gallos par la presente investigación se lo realizo tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- De 1.5 a 2 años de edad
- Velocidad
- Resistencia
- Elegancia del plumaje

### **2.7.2. Producción de semen de gallos**

- Primero se realizó un sorteo, donde se ubicó a los gallos de forma individual en sus respectivas jaulas además se instaló comederos y bebederos para cada uno.
- Luego se administró un desparasitante llamado (gallomec plus) que contiene ivermectina, fenbendazole, y prazicuantel en razón de una tableta, además se administró vitamina AD3E en una dosis de 0.5 ml para mejora la fertilidad y evitar el estrés de las aves

- Se procedió a adiestrar los gallos donantes para la colección de semen mediante la técnica de masaje dorso abdominal por 30 días y 2 a 3 minutos por día. Para tal ello, se construyó una mesa que tuvo una altura de 1 m aproximadamente para la aplicación de la técnica.
- Luego se saca al gallo de la jaula y se sujeta con la mano derecha por las extremidades se inmoviliza y se recuesta sobre la mesa, seguidamente con la mano izquierda y con el uso de la yema de los dedos se procedió a dar masajes dorso abdominales a lo largo del lomo terminando con los dedos pulgar y medio en la cloaca como si fuera a exprimir.
- Luego que se entrenó a los gallos, se procedió a preparar una fórmula de diluyente para conservar el semen y proceder con la evaluación de la calidad seminal. Para elaborar el diluyente los reactivos utilizados fueron: D1 (0,9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo, 0,0011 g de florfenicol en 27 ml de agua bidestilada, 10 % de glicerol). Para el D2 (0,9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo, 0,0011 g de florfenicol en 27 ml de agua bidestilada 15 % de glicerol), D 3 se utilizó el Andromed. El diluyente tiene que estar una temperatura de 38°C manteniendo un osmolaridad de 500 a 600 medias / mol

### **2.7.3. *Recolección de semen y evaluación***

- Una vez que se tiene listo el diluyente se procedió a realizar la colección del semen en el laboratorio, y se procedió de la misma forma de extracción mientras que la otra persona espera atento el eyaculado. Ya colectadas el semen se recogió en tubos de Eppendorf, se colocó en baño maría con temperatura previamente regulada a 38 0C y se realiza su respectivo análisis.
- Durante el análisis del semen fresco se evaluó: volumen (ml), ph, color, concentración espermática, morfología (%), células vivas / muertas (%), motilidad masal (%), motilidad individual en puntos y viabilidad, para después hacer una comparación con el semen descongelado.
- El volumen fue determinado por volumetría, para la concentración se preparó una relación de 1:100, 100 µl de semen y 900 µl de solución de glutaraldehido, de esta dilución 10 µl de semen diluido en glutaraldehido se transfirió a la cámara de Neubauer para el respectivo conteo bajo el microscopio (200x), la motilidad espermática fue clasificada utilizando la escala de 0 – 5 (0 = motilidad nula, 1= movimiento sin motilidad progresiva, 2 = motilidad progresiva lenta, 3= movimientos laterales acompañados de motilidad progresiva lenta, 4= motilidad progresiva rápida y 5= motilidad progresiva muy rápida); el porcentaje de vitalidad



fue analizada mediante percepción sensorial subjetiva; y para determinar la morfología celular se realizó una extensión vital sobre un porta objetos con una solución de eosina – nigrosina y observado bajo el microscopio (400x).

- Para evaluar espermatozoides vivos, muertos se tiñó con eosina – nigrosina, colocando primero una gota de semen y sobre ella la tinción se hizo un frotis y se observó al microscopio. Al evaluar el color, se procedió simplemente a determinar por observación directa.
- Para el recuento de espermatozoides, se utilizó cámaras de Neubauer en el que se contó un cuadro dentro de los cuadros grandes y mediante la fórmula siguiente se determinó la concentración espermática.

Concentración de spz. =  $X \cdot 5 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot FD$

X= promedio de espermatozoides de las dos micro cámaras

5= para llevar los 25 cuadros de la cámara

10= para convertir a ul

1000= para convertir a ml

FD= factor de dilución

#### **2.7.4. Criopreservación del semen**

- Los eyaculados fueron recogidos en forma individual en 0,5 ml diluyente Lake & Stewart (1978), (0,9996 g de glutamato de sodio, 3 ml de yema de huevo, 0,0011 g de florfenicol en 27 ml de agua bidestilada más 10% de glicerol para el tratamiento 1 y para el tratamiento 2 se aumenta el 15 % de glicerol y como tratamiento testigo se utilizó Andromed, posteriormente se ajusta la relación 1:10 de semen: diluyente más glicerol, se homogenizan los eyaculados hasta obtener un volumen total.
- luego se colocó la muestra en una cámara de enfriamiento a 4°C para que se establezca la solución por 1 hora aproximadamente, al término de este tiempo se procede a embazar en pajillas de 0,25 ml, se sella con alcohol polivílico en polvo, siempre manteniendo a la misma temperatura.

- En un culer se procede a colocar el nitrógeno líquido a una altura de 3 cm luego se mete una gradilla porta pajuelas a una altura de 6 cm del nitrógeno líquido por 6 minutos, después se baja la gradilla a una altura de 4 cm por 4 minutos, y por último paso se dejan las pajuelas en el nitrógeno por un minuto y con ello las pajuelas ya están congeladas y se procede a colocar en el tanque de nitrógeno para su almacenamiento.

#### **2.7.5. Descongelación del semen**

Para la valoración del semen descongelado en cuanto a las variables de motilidad masal e individual, porcentaje de viabilidad, células vivas muertas, se procedió a la descongelación de las pajillas en cámara fría a 4°C por 7 min. El semen descongelado fue transferido a tubos de ensayo y mantenidos a la misma temperatura durante la evaluación.

#### **2.7.6. Costo por tratamiento**

Se analizó el costo unitario de producción de cada pajuela de 0,25 ml de los gallos.

### **2.8. Metodología de Evaluación**

#### **2.8.1. Semen fresco**

##### **2.8.1.1. Volumen de eyaculado (ml)**

Para determinar el volumen del eyaculado, se utilizó Eppendorf a 1ml.

##### **2.8.1.2. Concentración espermática (spz/ml)**

Se utilizó el método de conteo en la cámara de Neubauer, donde se procedió a realizar la dilución 1:100 del semen con agua fisiológica, quiere decir que por 2ml de agua fisiológica al 1%, se agregó 5µl de semen, con la ayuda de la micropipeta se mezcló homogéneamente.

Se limpió bien la cámara de Neubauer y se procedió agregar 10µl de la muestra en los dos bordes de cada cuadrante posteriormente se colocó el cubreobjetos, verificar que la cámara no presente burbujas de aire, de ser el caso debe preparar nueva muestra.

La muestra fue observada al microscopio con el lente de 100X para facilitar el enfoque y observar la cuadrícula, una vez identificado se puede realizar el conteo respectivo o a la vez se puede utilizar el lente 400X, para una mejor apreciación, se procede a contar los 5 cuadrados de cada uno de los cuadrantes, preferiblemente que sean los cuadrados externos y el central

Concentración de spz =  $X \cdot 5 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot FD$

X= promedio de espermatozoides de las dos micro cámaras

5= para llevar los 25 cuadros de la cámara

10= para convertir a  $\mu$ l

1000= para convertir a ml

FD= factor de dilución

#### 2.8.1.3. *Medición de Ph*

Medida con tiras de papel tornasol. Después de la colecta del semen, se procedió a valorar el pH del semen en el tubo de recolección con la ayuda de una pinza, previamente limpia, desinfectada y seca.

#### 2.8.1.4. *Color*

Se realizó por medio de observación.

#### 2.8.1.5. *Células vivas (%)*

Para observar espermatozoides vivos se colocó una gota de semen en un porta objetos y debidamente tinturado con eosina – nigrosina se procedió a realizar un frotis en otra porta objetos y se observó al microscopio a un aumento de 400x y por determinación subjetiva se calculó mediante la siguiente relación:

Ecuación 2-2.fórmula para determinar las células vivas

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides vivos}} \times 100$$

#### 2.8.1.6. *Células muertas*

Para observar espermatozoides muertos se colocó una gota de semen en una porta objetos y debidamente tinturado con eosina – nigrosina se procedió a realizar un frotis en otro porta objetos y se observó al microscopio a un aumento de 400x y por determinación subjetiva se calculó mediante la siguiente relación:

**Ecuación 3-2.fórmula para determinar las células muertas**

$$\text{Células muertas (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides muertos}} \times 100$$

#### 2.8.1.7. *Motilidad masal (%)*

La evaluación de la motilidad espermática se realizó observando al microscopio a un aumento de 400x, y por determinación subjetiva se calificó de 0 a 100 %. Su relación entonces fue:

**Ecuación 4-2 fórmula para determinar la motilidad masal**

$$\text{Motilidad masal (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides inmòviles}}{\text{Número de espermatozoides mòviles}} \times 100$$

#### 2.8.1.8. *Motilidad individual*

La evaluación de la motilidad espermática se realizó observando al microscopio a un aumento de 400x, y por determinación subjetiva se calificó de 0 a 5

#### 2.8.1.9. *Morfología*

El procedimiento para evaluar la morfología espermática es el siguiente:

- 1- Se debe realizar por duplicado.
- 2- Depositar de 5-10µl de muestra bien homogenizada en el extremo del portaobjetos.

- 3- Aplicar una gota de eosina-nigrosina
- 4- Extender la gota suavemente con otro portaobjetos.
- 5- Secar la muestra al aire
- 6- Fijar
- 7- Colorear (Técnicas de coloración recomendadas: Papanicolaou o Diff-Quick)
- 8- Evaluación de la morfología espermática por duplicado (% de formas normales) con microscopio óptico con inmersión con objetivo 100x.

#### 2.8.1.10. Viabilidad

Para la determinación de la vitalidad se colocó sobre un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica a 37 °C, una gota de semen y una gota de solución de eosina-nigrosina previamente calentada a 37°C para evitar el shock térmico, se mezcló durante 30 segundos. Luego de un minuto se realizó un frotis, observándolo al cabo de dos min, sin cubreobjetos con aumento 100X.

Los espermatozoides muertos se tiñen de rosa ya que la membrana deteriorada en los muertos se hace permeable, mientras que los espermatozoides que se encontraron vivos en la tensión se visualizaron de color transparente. La determinación dada en porcentaje se estimó con la siguiente fórmula (Garabito 2003)

Ecuación 5-2 fórmula para determinar la viabilidad espermática

$$\% \text{ Epz. Vivos/Muertos} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Epz. Vivos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de Epz. Contados (Vivos+Muertos)}} \times 100$$

#### 2.8.2. Post-descongelación

Se realizó la descongelación después de 24 horas previo a la Criopreservación, lo que consistió en colocar la pajuela en el baño maría a una temperatura 37 °C por un tiempo de 60 segundos , posteriormente se secó con una toalla absorbente, con un cortapajuelas se cortó el primer extremo

donde se encuentra el alcohol polivinílico y se colocó boca abajo, en un tubo de eppendorf previamente calentado en la placa térmica, después se cortó el otro extremo y la muestra cayó por efecto de la gravedad, se tomó 0.5 µl de muestra y se procedió a evaluar lo siguiente.

#### 2.8.2.1. *Motilidad masal, (%)*

Se valoró mediante las ondas de movimiento de los espermatozoides tomando a consideración los criterios de (Cueto et al, 2016, p. 16), para la evaluación del semen después de la congelación, se evaluó un total de 36 pajuelas, en decir 2 por cada tratamiento y por 6 que fueron el número de repeticiones.

#### 2.8.2.2. *Motilidad individual, (puntos)*

La motilidad individual progresiva se evaluó de forma subjetiva donde se estima la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides hacia adelante, en la evaluación post-descongelación se estimó que es mucho más baja su valoración en comparación a la valorada antes de la congelación, esto se debe a diferentes factores como puede ser el shock térmico u otros factores, para su estimación se utilizó una escala subjetiva de 0 y 5 (0 es mínimo y 5 es máximo)

#### 2.8.2.3. *Viabilidad espermática (%)*

Para la determinación de la vitalidad se colocó sobre un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica a 37 °C, colocamos una gota de semen y una gota de solución de eosina-nigrosina previamente calentada a 37°C para evitar el shock térmico, se mezcla durante 30 segundos. Luego de un minuto se realizó un frotis, observándolo al cabo de 2 min, sin cubreobjetos con aumento 100X.

Los espermatozoides muertos se tiñen de rosa ya que la membrana deteriorada en los muertos se hace permeable, mientras que los espermatozoides que se encontraron vivos en la tensión se visualizaron de color transparente. La determinación dada en porcentaje se estimó con la siguiente formula.

**Ecuación 6- 2 fórmula para determinar la viabilidad espermática**

$$\% \text{ Epz. Vivos/Muertos} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Epz. Vivos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de Epz. Contados (Vivos+Muertos)}} \times 100$$

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Valoración de tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de riña.

Al finalizar la presente investigación se determinó la respuesta de los semovientes al método de extracción seminal al igual que las características macroscópicas y microscópicas de las muestras seminales fresca perteneciente a los gallos de riña de la raza Asil de 1,5 a 2 años de edad, además se evaluaron las características microscópicas motilidad masal, motilidad individual y viabilidad espermática al post descongelamiento reportando los siguientes resultados.

##### 3.1.1. *Respuesta animal al entrenamiento para extracción de semen.*

En la tabla (6-3) se observa los resultados de los gallos sometidos al entrenamiento para la extracción de semen con la técnica del masaje dorso abdominal. Durante el experimento se realizaron 18 intentos de recolección para cada tratamiento, es decir 3 intentos por gallo. En total en los tres tratamientos se dieron 54 intentos, de los cuales 31 fueron efectivos reportando el 92,5% de efectividad del método utilizado en la presente investigación.

**Tabla 6-3:** Respuesta al entrenamiento de extracciones seminales de los gallos de raza Asil

Parámetros	RESPUESTA		
	R1	R2	R3
Total, de intentos	18,00	18,00	18,00
Eyaculados efectivos, total	16,00	17,00	17,00
Eyaculados efectivos, %	88,88	94,44	94,44

Realizado por: Carlos Alfredo Zambrano Zambrano, 2020.

### 3.1.2. *Evaluación de las características macroscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil.*

#### 3.1.2.1. *Volumen (ml).*

La evaluación de las muestras seminales frescas con respecto al volumen del eyaculado reportó en la presente investigación un promedio de  $0,43 \pm 0,024$  ml como se indica en la tabla (7-3).

**Tabla 7-3:** Características macroscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil.

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Volumen</b>	0,43	0,024
<b>Ph</b>	6,98	0,075
<b>Color</b>	Bl	-

Bl: Blanco lechoso.

Realizado por: Carlos Alfredo Zambrano, 2020.

Con respecto a los resultados obtenidos Sánchez (2012), quien al evaluar las características seminales de los gallos sevillanos de raza Pintada manifiesta, que en los gallos el volumen de eyaculación depende de muchos factores entre los cuales se encuentran la edad (disminuye con la edad), estado sanitario, alimentación, habilidad del personal recolector, etc.

Tene (2014), quien al utilizar bioestimulantes en la producción de semen de gallos e inseminación artificial en gallinas criollas, reportó  $0,32 \pm 0,03$  ml de eyaculado en las muestras seminales frescas valores que son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Los resultados reportados son inferiores a los registrados por Duchi et al. (2009), quienes al realizar estudios en la criopreservación de semen de gallo como una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana, observaron en muestras seminales frescas de 6 gallos en edades de 1,5 a 2, valores de  $0,55 \pm 0,07$  ml de volumen seminal, las diferencias encontradas entre esta y la presente investigación se atribuyen a la raza de gallos utilizada y el tiempo de entrenamiento de los semovientes.

#### 3.1.2.2. *pH.*

En el análisis del pH de las muestras seminales provenientes de los gallos de raza Asil se reportó promedios de  $6,98 \pm 0,075$  acercándose el mismo a un pH neutro a lo que Donoghue y Wishart



(2000), manifiestan que el intervalo de tolerancia en pH para los espermatozoides de aves es amplio, un pH ácido, reduce la movilidad, la producción de ácido láctico y el consumo de oxígeno, mientras que un pH alcalino aumenta el metabolismo y en ambos casos se reduce sensiblemente la fertilidad de los espermatozoides.

Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Cumpa y Pomahuali (2009), quienes al realizar la evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad de semen en gallos cruzados de 30 meses, registraron valores de 7,4 y 7,5 en pH a diferencia de los resultado de Jácome (2005), quien en su investigación sistema de producción en aves pesadas por inseminación artificial registro un pH de 6.

### *3.1.2.3. Color.*

La coloración que presentaron los eyaculados de los gallos de raza Asil en las diferentes extracciones seminales fue Blanco Lechoso (Bl).

En concordancia con los resultados obtenidos Sánchez (2012), indica que el color del semen en los gallos puede oscilar desde blanco lechoso hasta colores ligeramente amarillentos con leve cremosidad en su consistencia, mismos que son predictores de un material genético de buena calidad y con altas concentraciones espermáticas, mientras que las tonalidades grisáceas o amarillentas indican una escasa concentración espermática, resultados obtenidos al evaluar las características seminales de los gallos sevillanos de raza Pintada.

Los resultados obtenidos son similares a los registrados por Jácome (2005), quien en su investigación sistema de producción en aves pesadas por inseminación artificial registro un color blanco en las muestras seminales frescas.

### *3.1.3. Evaluación de las características microscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil.*

#### *3.1.3.1. # de espermatozoides vivos (millones/ml)*

Una característica de gran importancia en la calidad seminal de una muestra es la concentración espermática, ya que de esta depende la cantidad de dosis seminales que se puedan obtener de cada eyaculado.

La concentración espermática del semen de los gallos Asil en la presente investigación presentó promedios de  $2,59 \times 10^9 \pm 5,55 \times 10^8$  spz. /ml, como se muestra en la tabla (8-3).

**Tabla 8-3:** Características microscópicas del semen fresco de gallos de la raza Asil.

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
# de spz.. vivos ( mill/ml)	$2,59 \times 10^9$	$\pm 5,55 \times 10^8$
Células vivas/muertas (%)	95,33	$\pm 0,81$
Morfología (%)	89,66	$\pm 0,51$
Motilidad Masal (%)	94,83	$\pm 0,98$
Motilidad Individual (pts.)	4,01	$\pm 0,25$

Realizado por: Carlos Alfredo Zambrano Zambrano, 2020.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Juárez et al. (2018), quienes al evaluar el efecto de la edad sobre la calidad del semen en gallos Rhode Island Rojos en el Municipio de Tarímbaro, Michoacán-México, determinaron valores de  $2 \times 10^9$  spz./ml, de concentración espermática en muestras seminales de gallos en edades de 14 a 18 meses, argumentando que a mayores edades en las aves la concentración espermática disminuye.

Con respecto a la presente investigación los resultados obtenidos por Duchi et al. (2009), quienes al realizar estudios en la criopreservación de semen de gallo como una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana, determinaron concentraciones espermáticas de  $4,55 \times 10^9$  spz./ml, siendo estos resultados superiores a los de la presente investigación al igual que los resultados obtenidos por Cumpa y Pomahuali (2009), quienes al realizar la evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad de semen en gallos cruzados de 30 meses, registraron concentraciones espermáticas en rangos de  $309,7 \pm 32,94 \times 10^7$  spz./cc y  $400,3 \pm 87,62 \times 10^7$  spz./cc, en muestras seminales frescas.

Permitiéndonos inferir que la diferencia de estas investigaciones con el presente trabajo puede deberse a factores como la edad, el individuo, origen genético, las condiciones del medio y la experiencia de la persona que realiza la extracción seminal en los semovientes.

### 3.1.3.2. *Células vivas / muertas (%)*

Con respecto a la variable células vivas/muertas (%), se determinó un  $95,33 \pm 0,81$  %, de células vivas en relación al  $4,67 \pm 0,19$  % de células muertas observadas en las muestras seminales frescas.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Herrera (2005), quien al realizar criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves, reporto valores de  $97,7 \pm 0,4$  % de viabilidad espermática en muestras seminales frescas.

Siendo a su vez superiores a los reportados por Duchi et al. (2009), quienes al realizar estudios en la criopreservación de semen de gallo como una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana, determinaron viabilidades espermáticas de 82,63 %, al igual que los resultados presentados por Jácome (2005), quien en su investigación sistema de producción en aves pesadas por inseminación artificial registro un 97 % de viabilidad espermática en semen fresco, debiéndose estas diferencias a la genética de los semovientes utilizados en la presente investigación.

### 3.1.3.3. *Morfología*

La morfología espermática es un componente esencial de la evaluación seminal, en todas las especies de producción animal, ya que la disminución del porcentaje de espermatozoides normales esta correlacionado con una disminución en la fertilidad. Es así que en la presente investigación la morfología espermática de las muestras seminales analizadas provenientes de los gallos de raza Asil registro un promedio de  $89,66 \pm 0,51$ % de espermatozoides normales y el  $10,34 \pm 0,49$ % de anormalidades espermáticas entre las cuales se encontraron doble cola y cola doblada.

En el análisis de la célula espermática de los gallos se encontró una forma distinta a las células espermáticas de otras especies de interés zootécnico, características estructurales como las que describe Gilbert en el año de 1995 citado en Herrera (2005), quien indica que el espermatozoide de las aves, en general difiere con la forma de la célula espermática de otras especies como los mamíferos, ya que posee una cabeza alargada en forma de curva filamentosa que mide entre 12 a 13  $\mu\text{m}$ , y una cola con una longitud aproximada de 87 a 100  $\mu\text{m}$ .

En la cabeza se encuentra el acrosoma de 2  $\mu\text{m}$  de largo. Esta región contiene enzimas proteolíticas que son requeridas durante la fertilización. La parte media, con 4  $\mu\text{m}$  de largo, contiene mitocondrias, y en la cola se extienden fibras centrales, relacionadas con el centriolo proximal y distal. En su parte más ancha el espermatozoide mide cerca 0.5  $\mu\text{m}$ , Gilbert en el año de 1995 citado en Herrera (2005)

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Toscano et al. (2017), quienes al realizar estudios sobre las anormalidades espermáticas en el guajolote criollo (*Meleagris*

*gallopavo*) en México, obtuvieron valores de 88,54% de células espermáticas normales y el 11,46 ± 1,53 % de anomalías morfológicas totales.

De las cuales destacan los defectos en la cabeza del espermatozoide con un 27,72 ± 2,98 %, que incluyen cabeza hinchada, doblada, en forma de sacacorchos, pequeña o larga, desprendida o con nudos, después le siguen los defectos del acrosoma (13,05 ± 2,67 %), que incluyen acrosoma en forma de coma, separado o hinchado y en menor proporción las anomalías de la pieza media (2,11 ± 1,38 %), como hinchazón, flexión, engrosamiento y desprendimiento parcial o total y de la cola (7,38 ± 2,98 %) que también incluyen desprendimiento, dobladas enrolladas y con nudos.

#### 3.1.3.4. *Motilidad Masal (%)*.

La motilidad masal en las muestras seminales frescas reportó promedios de 94,83 ± 0,98 %, siendo este parámetro fundamental para determinar la calidad seminal de los eyaculados, ya que es una de las más importantes expresiones de la función espermática, que, según algunos autores, puede ser uno de los factores que mejor se correlacionan con la fertilidad, misma que se valora mediante las características del movimiento del semen en un porcentaje del 1 al 100 %.

Los resultados obtenidos son mayores a los registrados por Blanch et al. (2011), quienes al investigar sobre la calidad in vitro del semen crioconservado de gallos de la raza Gallina Valenciana de (Chulilla, resultados preliminares), reportaron una motilidad masal de 77 ± 7%, en muestras seminales frescas, al igual que (Jácome 2005), quien registro promedios de 82,3%, en semen fresco provenientes de machos Hubbard HI-Y, en la investigación sistema de producción en aves pesadas por inseminación artificial.

#### 3.1.3.5. *Motilidad Individual (pts.)*

La evaluación de las muestras seminales fresca con respecto a la motilidad individual registro promedios de 4,01±0,25 puntos (pts.), parámetros que es indicativo de que los espermatozoides son viables, su valoración está basada en la observación del movimiento individual de las células con el fin de determinar el porcentaje de células móviles en el eyaculado Vale (2011).

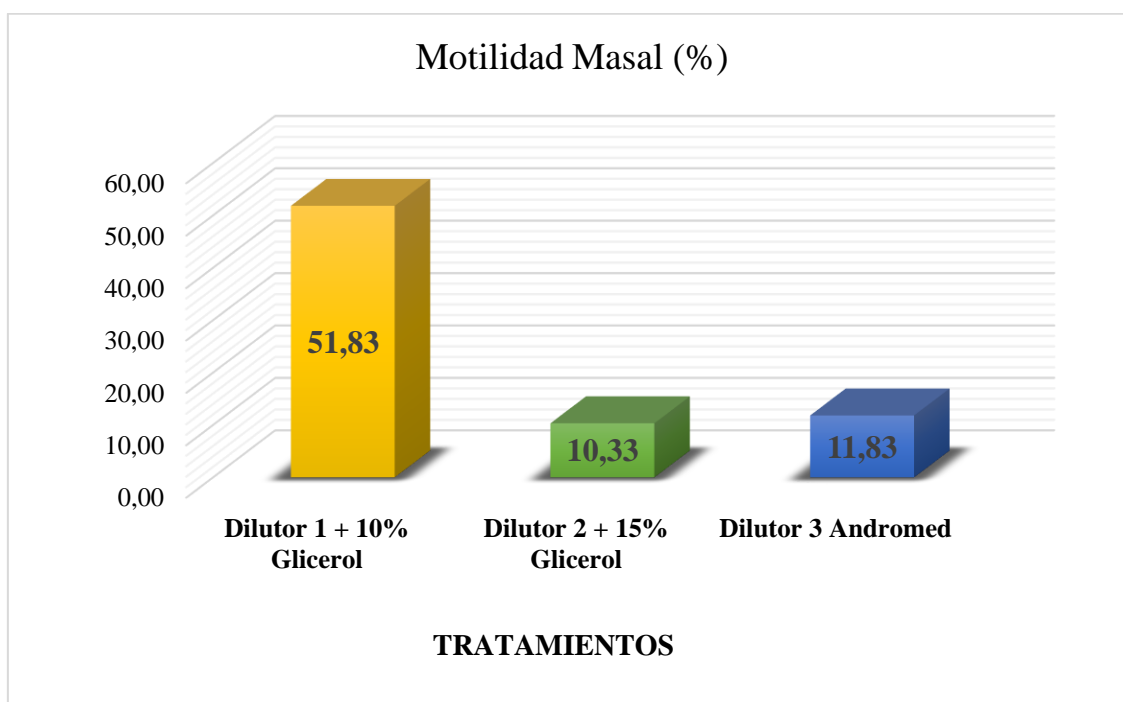
En concordancia con los resultados obtenidos Duchi et al. (2009), quienes al realizar estudios en la criopreservación de semen de gallo como una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana, reportaron motilidades individuales de 4,04 pts., en semen fresco resultados que son similares a los reportados en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores a los registrados por Blanch et al. (2011), quienes al investigar sobre la calidad in vitro del semen crioconservado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla (resultados preliminares), reportaron una motilidad individual en promedio de 3,05 pts., correspondiente al 61 %.

### 3.1.4. *Evaluación de las características seminales en la criopreservación, frente a la utilización de tres diluyentes seminales.*

#### 3.1.4.1. *Motilidad Masal.*

En el análisis de la motilidad masal al post descongelamiento de la dosis seminal en la presente investigación se reportaron diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos a ( $P < 0,01$ ), registrando el mayor valor para el tratamiento dilutor 1 + 10 % de glicerol con 51,83 % de motilidad masal a diferencia del tratamiento dilutor 2 + 10 % de glicerol con el cual se obtuvo el menor porcentaje al descongelar las pajuelas con 10,33 % de motilidad masal, como se muestra en la tabla (9-3) y en el grafico (1-3).



**Gráfico 1-3.** Comportamiento de la motilidad masan %, al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil.

Realizado por: Carlos Alfredo Zambrano Zambrano, 2020.

**Tabla 9-3:** Características microscópicas al post descongelamiento tras el efecto de tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de raza Asil.

Variables	Tratamientos						E.E	PROB.	SIG.
	Dilutor 1 + 10% Glicerol		Dilutor 2 + 15% Glicerol		Dilutor 3 Andromed				
Motilidad Masal (%)	51,83	a	10,33	b	11,83	b	0,66	0,0001	**
Motilidad Individual	3	a	0,67	b	0,58	b	0,08	0,0001	**
Viabilidad Espermática (%)	47,5	a	13,5	b	13,33	b	1,15	0,0001	**

E.E: Error Estándar.

Prob. > 0,05: No existen diferencias estadísticas.

Prob. < 0,05: Existen diferencias significativas.

Prob. < 0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan

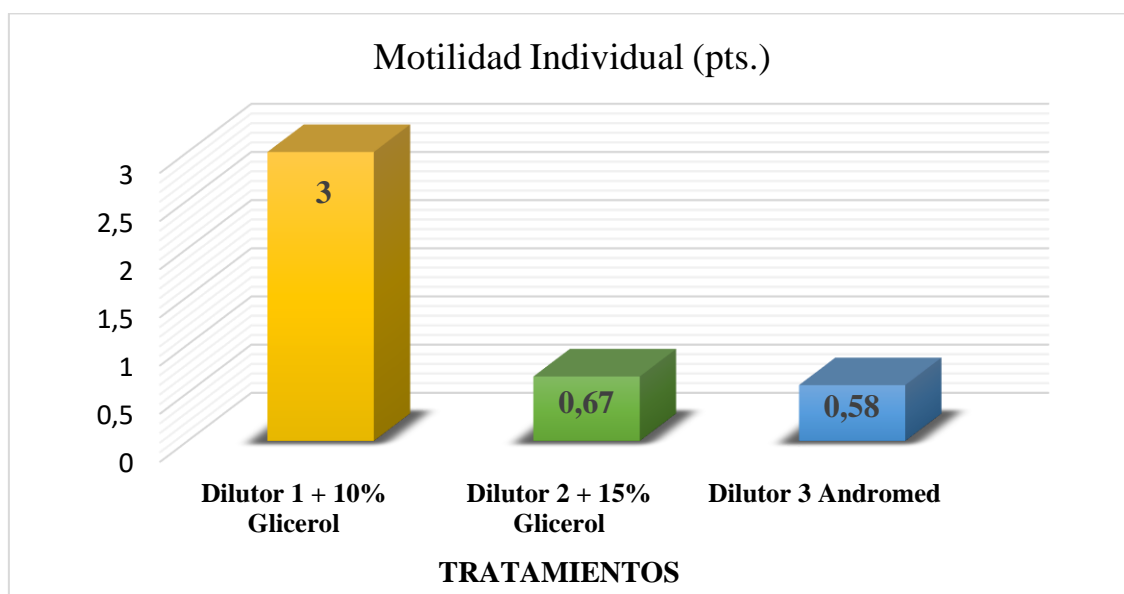
**Realizado por:** Carlos Alfredo Zambrano Zambrano, 2020.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores a los reportados por Herrera (2005), quien al realizar criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves, reporto valores de  $36 \pm 3,9$  de movilidad en las dosis seminales al post descongelamiento al utilizar en la crioconservación dimetilsulfóxido (DMSO) en gallos (*Gallus domesticus*).

Con respecto a los resultados obtenidos estos son inferiores a los reportados por Blanch et al. (2011), Quienes al investigar sobre la calidad in vitro del semen crioconservado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla (resultados preliminares) reportaron el 67,5 % de motilidad masal al post descongelamiento con la utilización del 10 % de glicerol en los diluyentes utilizados para la crioconservación seminal, las diferencias encontradas entre esta y la presente investigación pueden deberse a los componentes de los diluyentes seminales utilizados y al proceso de crioconservación de las dosis seminales.

#### 3.1.4.2. *Motilidad Individual*

Al analizar microscópicamente las dosis seminales al post descongelamiento se registró diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos a ( $P < 0,01$ ), para la variable motilidad individual reportando el mayor valor al criopreservar las dosis seminales con el dilutor 1 + 10 % de glicerol, obteniendo 3 puntos en la escala de calificación para la motilidad individual, a diferencia del menor valor el cual se registró para el tratamiento dilutor 3 Andromed con 0,58 puntos, como se muestra en el grafico (2-3).



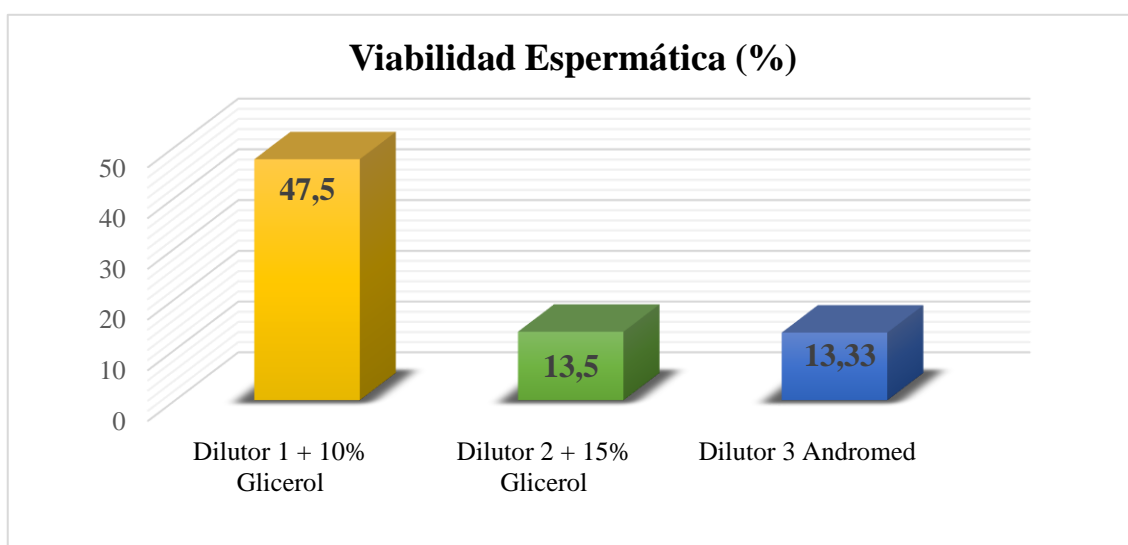
**Gráfico 2-3.** Comportamiento de la motilidad individual pts., al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil.

Duchi et al. (2009), en su estudio de criopreservación de semen de gallo, los resultados obtenidos en el análisis de las dosis seminales al post descongelamiento evaluados en una escala de 0 – 5 pts., por determinación subjetiva, registro una motilidad individual de 3,57pts., valores que son similares a los reportados en la presente investigación.

A diferencia de los resultados obtenidos Tomas et al. (2013), quienes al evaluar el efecto de la concentración de glicerol y de la tasa de dilución sobre la calidad in vitro y la capacidad fecundante del semen crio conservado de gallos de raza gallina Valenciana de Chulilla, obtuvieron valores de 2 pts., en la motilidad individual correspondiente a 40,1 % al utilizar el 11% de glicerol en los diluyentes seminales como crioprotector seminal, valores que son inferiores a los de la presente investigación debiéndose estos resultados a factores genéticos, ambientales al igual que la individualidad de cada semoviente en estudio.

#### 3.1.4.3. Viabilidad Espermática (%)

En la cuantificación de la viabilidad espermática o células vivas y muertas presentes dentro de las dosis seminales analizadas de cada uno de los tratamientos en estudio, se registraron diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos a ( $P < 0,01$ ), reportando la mayor viabilidad espermática al utilizar el dilutor 1 + 10 % de glicerol con 47,5 %, a diferencia del menor valor el cual fue registrado con el dilutor comercial Andromed con el 13,33 %, lo cual nos permite deducir que los diluyentes utilizados en el proceso de criopreservación de semen en gallos de riña influyeron sobre la calidad seminal referente a la cantidad de células espermáticas vivas a comparación de las células muertas, como se muestra en el gráfico (3-3).



**Gráfico 3-3.** Comportamiento de la viabilidad espermática %, al utilizar tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos Asil.



Los resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Duchi et al. (2009), en su estudio de criopreservación de semen de gallo una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza Murciana, reportaron una media de 83,33% de células espermáticas vivas frente al 12,67%  $\pm$  2,67 de mortalidad; mientras que Tomas et al. (2013) quienes al evaluar el efecto de la concentración de glicerol y de la tasa de dilución sobre la calidad in vitro y la capacidad fecundante del semen crio conservado de gallos de raza gallina Valenciana de Chulilla, obtuvieron valores del 70,3 % de viabilidad espermática al utilizar en los diluyentes seminales el 11% de glicerol para la crio conservación seminal.

Las diferencias entre esta y la presente investigación puede deberse al proceso de crioconservación seminal, componentes de los diluyentes seminales y a los factores ambientales.

### **3.2. Evaluación Económica**

Para la valoración de tres dilutores en la criopreservación de semen de gallos de riña, en lo que correspondiente al análisis económico se determinó el costo de inversión por dosis seminal reportando valores de \$ 1,55 USD, para los tratamientos dilutor 1+10% de glicerol y dilutor 2+15% de glicerol, a diferencia de \$ 1,47 USD, reportados en el dilutor 3 Andromed, siendo estos valores temporales los cuales pueden variar, ya que se encuentran valorados en el tiempo en que se realizó la presente investigación, como se muestra en la tabla (10-3).

**Tabla 10-3:** Análisis Económico por tratamiento utilizado para la crioconservación seminal de gallos de riña.

<b>Dilutor 1+10% de glicerol</b>				
<b>Producto</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio Unitario</b>	<b>Total</b>
Nºde gallos		6		
<b>Insumos</b>				
Huevos	U	1	0,15	0,15
Glutamato de sodio	g	0,99	0,05	0,05
Florfenicol	ml	0,0011	0,3	0,00033
Agua bidestilada	ml	10,5	0,27	2,84
Glicerol	ml	0,03	0,3	0,01
Jeringas	U	2	0,25	0,50
Guantes	U	1	0,25	0,25
Pajuelas	U	40	0,1	4,00
Nitrógeno líquido	Kg	21	2,5	52,50
Alcohol poli vinílico	g	10	0,16	1,60
<b>Total</b>				<b>61,89</b>
<b>Costo: pajuela/tratamiento</b>				<b>1,55</b>
<b>Dilutor 2 +15% de glicerol</b>				
<b>Producto</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio Unitario</b>	<b>Total</b>
Nºde gallos		6		
<b>Insumos</b>				
Huevos	U	1	0,15	0,15
Glutamato de sodio	g	0,99	0,05	0,05
Florfenicol	ml	0,0011	0,3	0,00033
Agua bidestilada	ml	10,5	0,27	2,84
Glicerol	ml	0,05	0,3	0,02
Jeringas	U	2	0,25	0,50
Guantes	U	1	0,25	0,25
Pajuelas	U	40	0,1	4,00
Nitrógeno líquido	Kg	21	2,5	52,50
Alcohol poli vinílico	g	10	0,16	1,60
<b>Total</b>				<b>61,90</b>
<b>Costo: pajuela/tratamiento</b>				<b>1,55</b>
<b>Diluyente 3 Andromed</b>				
<b>Producto</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio Unitario</b>	<b>Total</b>
Nºde gallos		6		
<b>Insumos</b>				
Jeringas	U	2	0,25	0,50
Guantes	U	1	0,25	0,25
Pajuelas	U	40	0,1	4,00
Nitrógeno líquido	Kg	21	2,5	52,50
Alcohol poli vinílico	g	10	0,16	1,60
Dilutor Andromed	ml	6	8,76	52,56
Agua bidestilada	ml	10,5	0,27	2,84
<b>Total</b>				<b>58,85</b>
<b>Costo: pajuela/tratamiento</b>				<b>1,47</b>

## CONCLUSIONES

- El método de entrenamiento de los gallos se los realizó a través de la técnica de masaje dorso abdominal con el cual se obtuvo una efectividad del 92,5%, este método es una alternativa para reproducción asistida en aves, y conservar la genética de las mejores estirpes de aves.
- En la evaluación de la calidad espermática de muestra seminales frescas, pertenecientes a los gallos de raza Asil se obtuvieron las siguientes características macroscópicas: color blanco lechoso, volumen  $0,43 \pm 0,024$  ml; y microscópicas concentración espermática  $2,59 \times 10^9$ , 6,9 de pH, células vivas muertas (95 %), morfología (89,6%), motilidad masal (94,8 %), motilidad individual (4 pts.), parámetros que se encuentran dentro de los rangos para criopreservación seminal.
- En cuanto a la valoración de las dosis seminales al post descongelamiento existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos como respuesta al uso de dilutores en el proceso de criopreservación seminal, obteniendo las mejores características microscopias en el dilutor 1 (glutamato de sodio, florfenicol, agua bidestilada, yema de huevo y glicerol al 10 %), con una motilidad masal de 51,83%, individual de 3pts., y una viabilidad espermática de 47,5%.
- La variación de las características microscópicas del semen post congelación quizás puede verse influenciada por la raza, temperatura, edad y los tipos de dilutores que se utilizaron en el proceso de conservación seminal.

## RECOMENDACIONES

- Seleccionar gallos que hayan iniciado su etapa reproductiva, con miras a obtener una mejor efectividad al momento del entrenamiento y extracción del seminal.
- Utilizar la técnica de masaje dorso abdominal de forma correcta, ya que podemos causar daño a nivel interno ocasionando un sangrado y con ello la contaminación de la seminal.
- Para la criopreservación del semen se tiene que tener a consideración las variaciones de las temperaturas debido a que influyen directamente sobre las características microscópicas del semen.
- Realizar futuras investigaciones utilizando semen criopreservados de gallos en la inseminación artificial de gallinas.
- Ampliar la investigación en especies de aves que se encuentren en riesgo o en peligro de extinción.
- Difundir la información con los criadores de gallos de pelea para obtener una mejor alternativa de conservar la calidad genética de nuestros gallos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BLANCH, Eva., TOMÀS, C., SANSANO, S., GOMEZ, Ernesto., CASARES, Lucia. y GIMENEZ, Ignacio.** Calidad In Vitro del Semen Criopreservado de Gallos de la Raza Gallina Valenciana de Chulilla. Resultados Preliminares. AIDA, XIV Jornadas sobre Producción Animal. [en línea]. 2011. Valencia -España.vol.1. pp. 407- 409. Consulta: [20/12/2019].

[https://www.researchgate.net/publication/292248393\\_Calidad\\_in\\_vitro\\_del\\_semen\\_criopreservado\\_de\\_gallos\\_de\\_la\\_raza\\_gallina\\_valenciana\\_de\\_Chulilla\\_Resultados\\_preliminares](https://www.researchgate.net/publication/292248393_Calidad_in_vitro_del_semen_criopreservado_de_gallos_de_la_raza_gallina_valenciana_de_Chulilla_Resultados_preliminares).

**CUMPA, Marcial y POMAHUALI, Joel.** Evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad de semen de gallo. Anales Científicos UNALM, [en línea].2009. Lima- Perú. vol.70, n°1 pp.27-33.Consulta: [20/12/2019].

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6171205>.

**DUCHI,N.,ALMELA, V., PEINADO, R. y REMACHA, P.,** Criopreservación de semen de Gallo : Una Alternativa para la Recuperación y Conservación de la Gallina de Raza Murciana . SEAE. [en línea]. 2009. -Murcia - España.vol.1. pp. 1-4. [Consulta: 21/12/2019].

[https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-](https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPRESERVACION.pdf)

[bullas/seae\\_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPRESERVACION.pdf](https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4%20P.GANADERIA/10%20CRIOPRESERVACION.pdf)

**HERRERA, Josè.** Criopreservación y Evaluación Fisiológica y Reproductiva de Espermatozoides de tres Especies de Aves.[en línea]. **(Tesis), (Doctoral)**. Universidad Autónoma Metropolitana Casa Abierta al Tiempo, Ciencias Biológicas, Posgrado.Ciudad de México-México.2005.pp.1-81. [Consulta: 29/10/2019].

<http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI12026.pdf>.

**HERNÁNDEZ, P., FERNÁNDEZ, R. y RODRÍGUEZ, S.** Obtención y congelación de semen de gallos domesticados usando un diluyente con glutamato sódico. [En línea] 2005. [Consulta: 29/10/2019].

[http://ftp.censa.edu.cu/revistas\\_censa/rsa/v27n2/pjehdez1.pdf](http://ftp.censa.edu.cu/revistas_censa/rsa/v27n2/pjehdez1.pdf)..

**JACAME, Jadira.** Sistema de producción en aves pesadas por Inseminación Artificial. [en línea]. **(Tesis), (Doctoral)**.Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, escuela de Posgrado. Quito-Ecuador.2005. pp.1-18. [Consulta: 24/10/2019].

[https://quickvet.edifarm.com.ec/pdfs/articulos\\_tecnicos/IA EN AVES PESADAS.pdf](https://quickvet.edifarm.com.ec/pdfs/articulos_tecnicos/IA_EN_AVES_PESADAS.pdf).

**JUÀRES, C., JIMÈNEZ, A., GUTIÈRREZ, V. y SEGURA, C.** Efecto de la edad sobre la calidad del semen en gallos Rhode Island Rojos. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal* [en línea], 2018. Michoacán - México vol. 11, pp. 11-18. [Consulta: 24/10/2019].

[https://aicarevista.jimdo.com/app/download/17229492725/AICA2017\\_Trabajo002.pdf?t=1529166546&mobile=1](https://aicarevista.jimdo.com/app/download/17229492725/AICA2017_Trabajo002.pdf?t=1529166546&mobile=1).

**LASHERAS, Jose.** *Manual de avicultura*. . 6<sup>a</sup> ed. Bueno Aires Argentina. Libreria del colegio., 1960. p.9.

**MAÑAS ,Rafael. 1996.** *Manual basico de gallos de riña*. . 1<sup>a</sup> ed Bueno Aires - Argentina . Albatros, 1996. pp. 12.

**MEDINA ,Fransisco.** *Catastro de criadores de gallos de pela en Chile*. 1<sup>a</sup> ed. Santiago de Chile - Chile 2003. pp. 14-15.

**MUÑOS, Diego. 2011.** Inseminación artificial en aves. [En línea] (Las Canarias -España) 2011. [Consulta: 24/10/2019]. pp. 1-3.

<http://www.canariculturalucense.com/cria/138-inseminacion-artifical-en-aves>

**PERALTA, María.** Bases de la Reproducción Animal Aviar. Universidad Nacional De Rìo Cuarto. [En línea] (Còrdova - Argentina) 2002. [Consulta: 24/10/2019].

[https://www.researchgate.net/publication/316976888\\_BASES\\_DE\\_LA\\_REPRODUCCION\\_AVIAR\\_1\\_Aparato\\_reproductor\\_11\\_Generalidades](https://www.researchgate.net/publication/316976888_BASES_DE_LA_REPRODUCCION_AVIAR_1_Aparato_reproductor_11_Generalidades)

**PEREZ, Eduardo.** *Su majestad el gallo de pelea*. 1<sup>a</sup> ed. Mexico - DF : privada, 1999. p. 8.

**RALL, W., y FAHY, G.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 1985. (United State of America). pp.573- 575. [Consulta: 5/11/2019].

<https://www.nature.com/articles/313573a0>

**RICAURTE, Sandra.** Importancia de un buen manejo de la reproducción en. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. [En línea] (Bogota - Colombia) 2006. ISSN 1695-7504 [Consulta: 21/12/2019].

[https://www.researchgate.net/publication/26432550\\_Importancia\\_de\\_un\\_buen\\_manejo\\_de\\_la\\_r](https://www.researchgate.net/publication/26432550_Importancia_de_un_buen_manejo_de_la_r)

eproduccion\_en\_avicultura\_Importance\_of\_a\_good\_handling\_of\_the\_reproduction\_in\_poultry\_keeping

**SÀNCHEZ, Fernando.** *La Pintada* [en línea]. 1ª.ed. Madrid - España. 2012. pp.1-4 [Consulta: 24/10/2019]

<http://www.aasafaubeda.com/index.php/escritos/77-la-pintada/2565-reproduccion-y-cria->

**SANTIAGO, Hector.** Inseminación Artificial en Aves. Departamento Departamento de Industria Industria Pecuaria Pecuaria Recinto Recinto Universitario Universitario de Mayaguez 1ª .ed. [En línea] (España) 2010. [Consulta : 5/11/2019]

<http://academic.uprm.edu/hsantiago/Inseminacion%20artificial%20aves.pdf>

**SAUVEUR, B. y REVIERS, M.** Reproducción de aves. 2ª.ed. (Madrid -España) Mundiprensa, 1992. [Consulta: 24/10/2019]

<https://www.iberlibro.com/9788471143600/Reproducci%C3%B3n-aves-BERNARD-SAUVEUR-MICHEL-8471143607/plp>

**SEXTON, T.** Comparison of commercial diluents for holding turkey. [En línea] 1988. (United State of America). pp. 56-56.[Consulta : 5/11/2019]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3375167>

**SURAI P, WISHART G, MALDJIAN A, NOBLE R Y SPARKS L.** Lipid peroxidation in avian semen : protective effect of seminal plasma. [en línea], 1998 Br poult sci. (United State of America).p. 57. [Consulta: 5/11/2019].

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071669888403>

**TENE, Jorge.** Utilización de Bioestimulantes en la Producción de Semen de Gallos e Inseminación Artificial en Gallinas Criollas [en línea]. (**Trabajo de titilaciòn**), (**Ingenierìa**). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo; Facultad de Ciencias Pecuarias; Carrera de Ingenieria en Zootecnia. Riobamba - Ecuador. 2014.pp. 1-172. [Consulta: 24/10/2019].

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3806>

**TOMAS, C., BLANCH, E., GÒMEZ, E., CASARES, L., SANSANO, S., GIMENEZ, I. y MÒCE, E.** 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. AIDA, XV Jornadas sobre Producción Animal. Castellòn-España-vol.1. 1, pp. 186-188. 2013. [Consulta: 24/10/2019].

[http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013\\_Rep\\_37.pdf](http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/comunicaciones/2013_Rep_37.pdf)

**TOSCANO, T., FLORES, P., NÚÑEZ, A., CONEJO, N. y OLIVO, Z.** Anormalidades Espermáticas En El Guajolote Criollo. Actas Iberoamericanas en Conservación Animal. [en línea], 2017. Michoacán - México. vol. 9, pp. 48-52. [Consulta: 24/10/2019].

[https://aicarevista.jimdo.com/app/download/16121918225/AICA2016ARG\\_Trabajo028.pdf?t=1561831886](https://aicarevista.jimdo.com/app/download/16121918225/AICA2016ARG_Trabajo028.pdf?t=1561831886).

**THIBER, A., y GUERIN, B.,** Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Anim rep sci. [en línea],2000 (United State of America). p. 32. [Consulta: 5/11/2019].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924827>

**WAMBEKE F y HUYGHEBAERT G.** Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. [en línea],1989,(United State of America). pp.461-451. [Consulta: 15/11/2019].

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071668908417170>