

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la melatonina y L-carnitina en criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides del gallo criollo (*Gallus gallus domesticus*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

Autores:

Luis Miguel Guachichullca Cabrera

CI: 0106021108

Correo electrónico: luismiguel-96@hotmail.com

Juan Pablo Hernández Valarezo

CI: 0105812127

Correo electrónico: juanpaher21@gmail.com

Director:

Dr. Diego Andrés Galarza Lucero Ph.D.

CI: 0103912846

Cuenca, Ecuador

22-junio-2022

Resumen:

La poderosa acción antioxidante de la melatonina (ME) y el efecto estimulante de la locomoción de la *L-carnitina* (LC) han permitido mejorar criosupervivencia espermática en aves. En este sentido, esta investigación evaluó los efectos de la ME y LC suplementado al medio de congelación sobre la criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides de gallos criollos (*Gallus gallus domesticus*). Para lograr este propósito, sesenta eyaculados de semen de 10 gallos criollos adultos (8 – 24 meses) recolectados mediante masaje dorsal (en 6 sesiones) sirvieron para conformar 12 agrupaciones (pools). Cada pool fue dividido en tres alícuotas y cada una de ellas diluidas con Lake-Ravie y suplementadas con 10 μ M de ME, 5 mM de LC y sin antioxidantes (control). Las muestras fueron cargadas en pajuelas de 0,25 mL, selladas y congeladas con vapores de nitrógeno líquido estático. Un total de 360 pajuelas fueron congeladas: ME (n=120 pajuelas), LC (n=120 pajuelas) y control (n=120 pajuelas). La mitad de las pajuelas fueron descongeladas y analizadas su cinemática e integridad de la membrana plasmática mediante el uso del sistema CASA y la prueba fluorescente con yoduro de propidio, respectivamente. La otra mitad de las pajuelas sirvieron para evaluar la fertilidad después de inseminar artificialmente 30 gallinas ponedoras (10 gallinas / tratamiento) en 6 sesiones. Los resultados demostraron que la suplementación del medio de congelación con ME y LC mejoró la criosupervivencia espermática. Eficazmente, la L-carnitina produjo un efecto tanto estimulador de la locomoción como crioprotector al incrementar la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática y la fertilidad después del proceso de congelación – descongelación. Sin embargo, la melatonina únicamente mejoró la integridad de la membrana plasmática o viabilidad posterior a la criopreservación.

Palabras claves: Gallos criollos. L-carnitina. Melatonina. Inseminación. Fertilidad.

Abstract:

The mighty antioxidant action of melatonin (ME) and the locomotion-stimulating effect of L-carnitine (LC) have allowed to improve sperm cryosurvival of avian sperm. In this sense, this research evaluated the effects of ME, and LC supplemented to the freezing medium on the cryosurvival and fertility of Creole roosters (*Gallus gallus domesticus*) spermatozoa. For this purpose, sixty ejaculated from 10 adult Creole roosters (8-24 months) collected by dorsal massage (in six sessions) were used to conform 12 pools. Each pool was divided into three aliquots, each diluted with Lake-Ravie extender and supplemented with 10 μ M ME, 5 mM LC, and no antioxidants (as control). Semen samples were loaded into 0.25 mL straws, sealed and frozen with static liquid nitrogen vapors. A total of 360 straws were frozen: ME (n=120 straws), LC (n=120 straws) and control (n=120 straws). Half of the straws were thawed and analyzed for kinematics parameters and plasma membrane integrity using the CASA system and the propidium iodide fluorescent test, respectively. The other half of the straws were used to assess fertility after artificial insemination of 30 hens (10 hens per treatment) in 6 sessions. The results demonstrated that supplementation with ME and LC to the freezing medium improved sperm cryosurvival. Effectively, L-carnitine produced both locomotion-stimulating and cryoprotective effects by increasing progressive sperm motility, plasma membrane integrity, and fertility after the frozen-thaw process. Nevertheless, melatonin only improved plasma membrane integrity or viability after cryopreservation.

Keywords: Creole roosters. L-carnitine. Melatonin. Insemination. Fertility.

Índice de Trabajo

| | |
|--|----|
| Resumen:..... | 2 |
| Abstract:..... | 3 |
| Índice de Trabajo | 4 |
| Índice de Figuras..... | 7 |
| Índice de Tablas | 8 |
| Índice de Anexos..... | 9 |
| Agradecimiento..... | 14 |
| Dedicatoria..... | 15 |
| Acrónimos..... | 17 |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 18 |
| 1.2. Objetivos | 21 |
| 1.2.1 Objetivo general | 21 |
| 1.2.2 Objetivos específicos..... | 21 |
| CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 Sistema reproductivo del gallo..... | 22 |
| 2.1.1. Testículos..... | 22 |
| 2.1.2. Conductos excurrentes..... | 23 |
| 2.1.3. Órgano copulador | 23 |
| 2.1.4. Control hormonal de la función testicular | 24 |
| 2.1.5. Control de la función adenohipofisaria | 24 |
| 2.1.6. Gonadotropinas en la función testicular | 25 |
| 2.2 Sistema reproductivo de la gallina | 26 |
| 2.2.1. Ovario | 26 |
| 2.2.2. Oviducto | 26 |
| 2.2.2.1. Infundíbulo | 27 |
| 2.2.2.2. Magnum..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2.3. Itsmo | 27 |
| 2.2.2.4. Útero | 28 |
| 2.2.2.5. Vagina..... | 28 |
| 2.3. Semen de gallo | 29 |
| 2.3.1. Características del semen del gallo..... | 29 |
| 2.3.2. Morfología y fisiología del espermatozoide del gallo | 29 |
| 2.3.3. Espermatogénesis | 30 |
| 2.3.4. Transporte y maduración extragonadal de los espermatozoides. | 30 |
| 2.3.5. Recolección de semen | 32 |
| 2.4. Inseminación artificial en aves | 32 |
| 2.4.1. Almacenamiento, transporte y fertilización del esperma. | 33 |
| 2.5. El huevo..... | 34 |
| 2.5.1. Transporte de huevos y oviposición | 36 |
| 2.5.2. Cutícula de cáscara de huevo y depósito de pigmento | 36 |
| 2.5.3. Ciclo ovulatorio | 37 |
| 2.5.4. Terminación de la producción de huevos | 38 |
| 2.5.5. Fotorefractoridad | 38 |
| 2.5.6. Comportamiento de incubación..... | 38 |
| 2.6. Antioxidantes | 39 |
| 2.6.1. ROS en aves..... | 40 |
| 2.6.2. Criopreservación de semen de gallo | 40 |
| 2.6.3. Uso de antioxidantes..... | 41 |
| CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS | 43 |
| 3.1 Materiales | 43 |
| 3.1.1 Biológicos..... | 43 |
| 3.1.2 Reactivos | 43 |
| 3.1.3 Equipos | 44 |
| 3.2. Área de estudio..... | 45 |
| 3.3 Elaboración de diluyentes y medios..... | 45 |
| 3.4. Diseño experimental..... | 46 |
| 3.5 Metodología | 47 |

| | |
|---|----|
| 3.5.1 Reproductores y recolección del semen | 47 |
| 3.5.2. Tratamientos y congelación..... | 48 |
| 3.5.3. Análisis de la calidad espermática..... | 49 |
| 3.5.4 Evaluación de la fertilidad..... | 50 |
| 3.6 Análisis estadístico..... | 50 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS..... | 52 |
| 4.1 Variables cinéticas..... | 52 |
| 4.2 Integridad de membrana plasmática..... | 54 |
| 4.3 Fertilidad | 55 |
| CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN | 56 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES | 60 |
| CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES | 61 |
| CAPÍTULO 8: REFERENCIAS..... | 62 |
| CAPÍTULO 9: ANEXOS | 70 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ubicación del proyecto, donde se llevará a cabo la incubación e inseminación artificial de las gallinas, ubicación en la parroquia Ricaurte, sector 5 esquinas. Fuente: http://gis.uazuay.edu.ec/ | 45 |
| Figura 2. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) post-descongelación de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c – d, $P < 0,05$). | 52 |
| Figura 3. Velocidades curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$). | 53 |
| Figura 4. Parámetros de relación de progresividad, rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. | 53 |
| Figura 5. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$). | 54 |
| Figura 6. Integridad de la membrana plasmática (viabilidad) de muestras criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b, $P < 0,05$). | 54 |
| Figura 7. Fertilidad lograda con de muestras criopreservadas con LC, ME y control después de una inseminación artificial. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b, $P < 0,05$). | 55 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Diluyente Lake-Ravie (IRTA) para la criopreservación de semen de gallo. | 46 |
| Tabla 2. Hepes para fluorescencia. | 46 |
| Tabla 3. Yoduro de propidio. | 46 |

Índice de Anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Resultados de las variables cinéticas de los espermatozoides de gallo criollo. MT (motilidad total), MP (motilidad progresiva), VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad promedio), VSL (velocidad rectilínea), STR (rectitud), LIN (linealidad), WOB (oscilación), ALH (desplazamiento lateral de la cabeza), BCF (frecuencia de batida del flagelo). | 70 |
| Anexo 2. Fotografías del trabajo de campo, en orden cronológico desde la extracción y análisis de semen, posteriormente la inseminación artificial en gallinas. | 71 |

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Luis Miguel Guachichulca Cabrera en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"Efecto de la melatonina y L-carnitina en criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides del gallo criollo (*Gallus gallus domesticus*)"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de Junio de 2022



Luis Miguel Guachichulca Cabrera

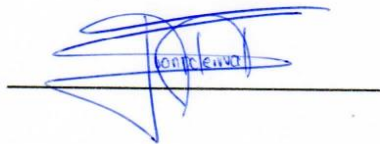
C.I: 0106021108

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Juan Pablo Hernández Valarezo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Efecto de la melatonina y L-carnitina en criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides del gallo criollo (*Gallus gallus domesticus*)”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de Junio de 2022



Juan Pablo Hernández Valarezo

C.I: 0105812127

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Luis Miguel Guachichulca Cabrera, autor del trabajo de titulación **"Efecto de la melatonina y L-carnitina en criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides del gallo criollo (*Gallus gallus domesticus*)"**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 22 de Junio de 2022



Luis Miguel Guachichulca Cabrera

C.I: 0106021108

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Juan Pablo Hernández Valarezo, autor del trabajo de titulación **“Efecto de la melatonina y L-carnitina en criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides del gallo criollo (*Gallus gallus domesticus*)”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 22 de Junio de 2022



Juan Pablo Hernández Valarezo

C.I: 0105812127

Agradecimiento

Agradecemos a los maestros apasionados por guiarnos y prepararnos para nuestra vida profesional, a nuestros amigos que gracias a ellos fue muy bonita la experiencia en la Universidad, conocimos grandes amistades que fueron y serán parte de la vida.

A nuestro tutor de tesis Dr. Andrés Galarza Lucero por su apoyo y guía en este trabajo, un especial agradecimiento al Dr. Elías Segarra, a los estudiantes Diana y Andrés, que nos apoyaron en nuestro trabajo de campo, de la misma manera al Dr. Xavier Samaniego.

Gracias a nuestro tribunal representado por el Dr. Fabián Astudillo, Dra. Silvana Méndez y Dr. Diego Rodríguez que nos guiaron para avanzar de manera ágil y correcta en la culminación de nuestra tesis.

Finalmente agradecemos nuestras 30 gallinas y 10 gallos (Claudio, Claxon, Gallito, Popo, Rocky, Bartolito, Cenizo, Piolín, Condorito, Holstein) que nos sirvieron de estudio, en memoria a ellos, gracias totales.

"La mayoría hemos soñado años con llegar a este día, el día de dejar la niñez y de ser independientes, pero, aunque nos vayamos a miles de kilómetros nadie escapara, la familia va con nosotros, estará ahí siempre, en los hábitos, en los gestos y las decisiones que tomemos, jamás seremos libres, ni estaremos solos"

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico mis abuelitos que me apoyaron desde niño y supieron guiarme con buenos valores, me transmitieron las ganas de superarme y salir adelante con trabajo y disciplina.

Agradezco a Dios por darme unos hermosos padres y hermanos, para mi papá que ha sido mi apoyo y ejemplo de responsabilidad durante toda mi vida. Para mi mamá que está en el cielo, su batalla fue ejemplo a seguir y esa muestra de lucha está impregnada en mí. A las personas que son todo para mí; Evelyn, Damián, Valentina y Estefanía, seguiremos luchando juntos y cuidándonos, les agradezco por creer en mí y apoyarme en todo momento, ustedes son mi motivación para seguir.

Finalmente dedico esta tesis a familiares y amigos que fueron parte en mi camino, en especial a mis mejores amigos de infancia y a las personas que están conmigo brindándome su amor y apoyo incondicional; nunca se den por vencidas ya que el éxito en la vida no se mide por lo que logras sino por los obstáculos que superas.

Luis Miguel

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a mis padres José y Ligia, por el gran apoyo y paciencia a lo largo de todo este tiempo.

Para mis tres queridas hermanas que son la alegría y las risas sin fin de mi vida. Finalmente, para esa persona que, aunque ya no esté aquí, fue mi primer ejemplo y motivación en el mundo académico desde que fui un niño.

Todos ellos han sido los pilares de este pequeño paso, muchas gracias por estar cuando más lo necesité.

Juan Pablo

Acrónimos

LC: L-Carnitina.

LPO: Peroxidación lipídica.

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

ME: Melatonina.

MBH: Hipotálamo basal medial.

IA: Inseminación artificial.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

LH: Hormona luteinizante.

FSH: Hormona foliculoestimulante.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La producción de pollo criollo (*Gallus gallus domesticus*) en el Ecuador es de trascendental importancia en la economía y nutrición de las familias rurales y ciudadinas. El pollo criollo ha sido considerado como un valioso recurso genético en las producciones de traspatio (o huertas) constituyendo un importante recurso económico y un producto básico en la dieta tradicional (Toalombo, 2020). La carne y los huevos de las aves criollas también tienen un alto valor nutricional, y es accesible a toda la población debido a su bajo poder adquisitivo. Según la ‘Corporación Financiera Nacional (CFN)’ en 2016, luego de realizar un análisis económico de la producción avícola en Ecuador, se indicó que entre 2013 y 2016, la crianza de aves criollas disminuyó en un 27%, mientras que se observó un incremento en el sistema de crianza industrial (Amores, 2016). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas biotecnológicas para maximizar el uso de este material genético autóctono. Los programas de cruzamientos y mejora genética son desarrollados mediante la inseminación artificial (IA) de aves usando tanto semen fresco o criopreservado; sin embargo, hasta donde conocemos, el uso de estas biotecnologías reproductivas en aves (Ej. criollas) en Ecuador, es deficiente o nula (Tene, 2014).

Actualmente, los gallos criollos se encuentran en permanente riesgo de extinción por la falta de estudios científicos sobre su caracterización, que puedan sustentar su reconocimiento general (Toalombo, 2020). Lo más fundamental es emprender con programas de conservación, como lo detallado por Alderson, (2018). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en su informe sobre seguridad alimentaria (FAO, 2016), recomienda como prioridad el uso de razas locales de animales y destaca la importancia de preservar los recursos genéticos de estas especies nativas a través de bancos de germoplasma.

La fertilidad de aves después de una IA con semen aviar criopreservado depende principalmente de la criosupervivencia celular (Ehling *et al.*, 2012). La criopreservación de espermatozoides de gallo tiene un interés conservativo (aplicado en especies y razas amenazadas) y productivo (aplicado en programas de mejora genética) (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). Los espermatozoides de ave sufren cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales durante el proceso de congelación y descongelación; estos efectos deletéreos provocan daños irreversibles en la estructura de una subpoblación de espermatozoides del ave. Estos daños incluyen a nivel de la membrana plasmática, membrana mitocondrial y acrosoma (Blesbois, 2007). Una respuesta a estos

efectos se basa en el incremento del estrés oxidativo debido a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). Entonces, los espermatozoides de gallos se hacen vulnerables al ataque de radicales libres (ej. H_2O_2 , O_2 y OH^-) debido a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en la membrana plasmática (Fujihara and Howarth, 1978; Parks and Lynch, 1992; Aitken *et al.*, 1989; Partyka *et al.*, 2012). En consecuencia, las ROS se combinan fácilmente con los PUFA y conducen a la producción de una peroxidación lipídica (LPO) (Surai *et al.*, 1998; Ansari *et al.*, 2019). En consecuencia, el incremento de LPO provoca una disminución de la motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides de gallo (Blesbois, 2007).

Los antioxidantes ayudan a mitigar los efectos deletéreos propios de la criopreservación, protegen a la membrana plasmática e incrementan la motilidad (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). Han sido numerosos los antioxidantes que se han evaluado como protectores frente al estrés oxidativo que se produce durante el proceso de congelación (Santiago-Moreno and Galarza, 2019). La *L-carnitina* (LC, ácido beta-hidroxi-gamma-N-trimetilaminobutírico) es un aminoácido resultante de la síntesis de la metionina y lisina, que desempeña un papel importante en la preservación de la integridad de la membrana, función mitocondrial y la inhibición de la apoptosis (Surai, 2015). Varios estudios *in vitro* han evidenciado que la adición de LC a los medios estimula la motilidad de espermatozoides del ave (Fattah *et al.*, 2017); además posee un efecto crioprotector en concentración de 1 a 5 mM suplementando al diluyente de congelación (Partyka *et al.*, 2012). Por otro lado, la melatonina (ME, *N-aceil-5-metoxitriptamina*) preserva la integridad mitocondrial y ayuda a mantener las funciones celulares. Otros efectos de la ME ha sido atribuidos tales como neutralizar los efectos tóxicos de ROS y especies reactivas de nitrógeno (León *et al.*, 2004). Además, se ha informado que la ME posee efectos protectores de la membrana espermática contra el estrés oxidativo en espermatozoides de aves a concentraciones de 10^{-3} o 10^{-6} M (Mehaisen *et al.*, 2020).

Esta investigación trató de demostrar los efectos benéficos antioxidantes de la LC y ME suplementados a un diluyente de base sintética en la criopreservación de espermatozoides del gallo criollo. A pesar de que no se ha reportado estudios de fertilidad de gallos criollos en Ecuador, se conoce tradicionalmente que estos animales han mostrado caracteres de alta fertilidad. Por lo tanto, la suplementación de estos aditivos y la criosupervivencia celular, así como la fertilidad después de una IA en gallinas criollas de postura, permitirá tener una línea base inicial y referencial para

emprender futuros programas de conservación *in situ* de estos gallos autóctonos. En consecuencia, este hándicap expone que el uso de biotecnologías reproductivas (criopreservación de espermatozoides y la IA) ha sido poco desarrollado e investigado en esta especie y raza en el Ecuador.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la melatonina y *L-carnitina* suplementado al medio de congelación sobre la criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides de gallos criollos (*Gallus gallus domesticus*)

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar las características cinéticas y viabilidad de los espermatozoides de gallos criollos, suplementados con melatonina y L-carnitina, antes y después de la criopreservación.
- Evaluar los porcentajes de fertilidad en gallinas después de una inseminación artificial usando espermatozoides de gallo criopreservados con melatonina y L-carnitina.

1.3. Hipótesis

La suplementación con los antioxidantes *L-carnitina* y melatonina al medio de congelación de semen de gallos criollos permite incrementar la criosupervivencia celular basada en un incremento de las características cinéticas y viabilidad, así como un incremento de la fertilidad después de la una IA en gallinas ponedoras.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Sistema reproductivo del gallo

El sistema reproductor masculino del ave es un conjunto de túbulos seminíferos conectados en cadena con los conductos excurrentes de los testículos. Integrados por la red testicular, los conductos eferentes proximales, el conducto eferente distal, los conductos de conexión, el conducto del epidídimo y el conducto deferente. Si bien, la porción proximal del conducto deferente se denomina conducto epididimario, no existe una diferencia significativa entre estos dos conductos aparte del diámetro de la luz, el contenido de músculo liso y la medida en que están rodeados de tejido conectivo denso (Froman *et al.*, 2016).

2.1.1. Testículos

Los testículos del ave están emparejados, los cuales no descienden y permanecen en la cavidad corporal común, y además carecen de escroto. Están ubicados en lo alto de la cavidad corporal, entre los pulmones y la división renal craneal, adyacentes a las glándulas suprarrenales, la aorta y la vena cava caudal (Konig *et al.*, 2016). Los testículos están unidos a la pared del cuerpo por un mesorquio (Froman *et al.*, 2016). Fuera de la temporada de reproducción, los testículos del macho *Galliformes* tienen aproximadamente el tamaño de un hueso de cereza (Konig *et al.*, 2016). Sin embargo, durante el período de apareamiento, crecen muchas veces este tamaño (Akers and Denbow, 2013) alcanzando los 60 mm de largo y los 30 mm de grosor en los machos *Galliformes*. El aumento del tamaño pone las gónadas en contacto con los sacos de aire torácicos y abdominales (Konig *et al.*, 2016). Cada tracto consta de un testículo, un epidídimo y un conducto deferente muy intrincado que discurre a lo largo del uréter (Scanes and Dridi, 2022). Cada testículo contiene túbulos seminíferos anastomosados y tejido intersticial rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo (Froman *et al.*, 2016). El tejido intersticial contiene vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, células epiteliales peritubulares y células de Leydig; mientras que finas capas concéntricas de células mioepiteliales, fibroblastos y fibrillas de tejido conjuntivo se superponen a la lámina basal del túbulo seminífero. En el ave, el testículo izquierdo suele ser más grande que el derecho, lo que puede ser un subproducto de la selección evolutiva por la asimetría en el tracto reproductivo femenino o una adaptación para facilitar el vuelo (Scanes and Dridi, 2022). El impacto potencialmente nocivo de la temperatura corporal alta de las aves (hasta 41,5°C) sobre los espermatozoides en desarrollo dentro de las gónadas ubicadas internamente se evita mediante la

elaboración de un plexo venoso ricamente ramificado alrededor de los testículos (Konig *et al.*, 2016; Reece and Rowe, 2017).

2.1.2. Conductos excurrentes

Los conductos excurrentes o canales excurrentes son conductos asociados con el aparato reproductor del macho que derivan del mesonefros y abarcan los conductos eferentes, el epidídimo y los conductos deferentes. El epidídimo se encuentra en la cara dorsomedial del testículo, que se denomina hilio (Scanes and Dridi, 2022), alcanza una longitud de 3 a 4 mm en gallos sexualmente activos. A diferencia del epidídimo de los mamíferos, que consta de cabeza, cuerpo y cola, el epidídimo de las aves no está dividido en segmentos (Konig *et al.*, 2016), es en realidad una serie de conductos que finalmente desembocan en el conducto deferente. Los conductos dentro del epidídimo incluyen la red testicular, los conductos eferentes, los conductos de conexión y el conducto del epidídimo. Los conductos del epidídimo y el conducto deferente se denominan colectivamente conductos excurrentes de los testículos (Scanes and Dridi, 2022). El conducto deferente sigue un curso fuertemente sinuoso, ocupando una posición retroperitoneal ventromedial al riñón. A nivel de la división renal media, cruza hacia la cara lateral del uréter, al que luego acompaña en su paso hacia la cloaca. Caudalmente, su luz puede expandirse considerablemente. En virtud de su disposición altamente enrevesada, el conducto deferente recorre una distancia de solo unos 10 cm en los galliformes, a pesar de tener al menos 60 cm de largo en estas especies (Konig *et al.*, 2016). El conducto deferente es el sitio donde se almacena el semen antes de la eyaculación (Froman *et al.*, 2016; Akers and Denbow, 2013).

2.1.3. Órgano copulador

Cada conducto deferente termina como una papila dentro de la cloaca. Cada papila es una pequeña proyección en forma de dedo de la pared lateral de la cloaca. Un cuerpo vascular paracloacal se encuentra en asociación con cada receptáculo. Estos órganos accesorios son responsables de la tumescencia del tejido linfático que acompaña a la excitación sexual (Froman *et al.*, 2016). El falo del ave macho es un componente de la cloaca. Entre las especies de aves modernas hay dos tipos de falo: no protrusible y protrusible. El falo no protrusible presente en los gallos, se compone de: un cuerpo fálico mediano impar y cuerpos fálicos laterales emparejados (Konig *et al.*, 2016). La erección del falo en las aves es linfática. En los mamíferos, la erección del pene es vascular y durante la eyaculación el semen se transporta a través de la uretra (Scanes and

Dridi, 2022). La eyaculación ocurre cuando la contracción del músculo liso dentro de la pared de cada receptáculo acompaña a la eversión del falo (Froman *et al.*, 2016). El falo no es intermitente y el espermatozoide pasa a la hembra a través del “beso cloacal” durante el apareamiento. El beso cloacal supone la unión de la cloaca masculina y femenina durante unos segundos. Durante la cópula o en respuesta al masaje, un falo no intermitente forma un tejido linfático tumesciente que se evierte a través de la ventilación inmediatamente antes de la eyaculación (Scanes and Dridi, 2022).

2.1.4. Control hormonal de la función testicular

Las gonadotropinas y los esteroides gonadales son esenciales para la espermatogénesis galliforme (Froman *et al.*, 2016). La actividad neurosecretora, se ve afectada por estímulos somáticos y ambientales. La duración del período de luz en un día es el principal factor ambiental que estimula la espermatogénesis en aves galliformes. Los fotorreceptores que afectan la espermatogénesis no se encuentran ni en la retina ni en la glándula pineal. La mayor parte de la evidencia sugiere que el sitio más plausible asociado con la respuesta fotoperiódica es el hipotálamo basal medial (MBH) a través de la inervación directa de las neuronas GnRH por fotorreceptores encefálicos o a través de la pars tuberalis de la adenohipófisis (Scanes and Dridi, 2022). En el gallo, los fotorreceptores en lo profundo del prosencéfalo ventral constituyen la principal neurona sensorial que estimula las neuronas hipotalámicas GnRHérgicas (Froman *et al.*, 2016).

2.1.5. Control de la función adenohipofisaria

La GnRH-I del gallo difiere en solo un aminoácido en comparación con la forma de mamífero; mientras que la GnRH-II del gallo difiere en tres aminoácidos. Las neuronas GnRHérgicas se encuentran en sitios hipotalámicos y extrahipotalámicos. Sin embargo, se cree que sólo aquellas neuronas cuyos axones terminan dentro de la eminencia media inducen la secreción de gonadotropina. Los axones de las neuronas GnRHérgicas terminan en la proximidad de los capilares dentro de la eminencia media del hipotálamo. La GnRH secretada por estos axones llega a las células diana dentro de la adenohipófisis a través de los vasos portales hipotálamo-hipofisarios. Los gonadotrofos que contienen LH y FSH residen en células separadas dentro de la glándula pituitaria. Tanto GnRH-I como -II estimulan la liberación de gonadotropinas en el gallo. Sin embargo, GnRH-I es el principal regulador de la liberación de gonadotropinas en el ave. Los fotorreceptores hipotalámicos transducen la energía de la luz en una señal biológica que regula la

secreción de GnRH. Los fotorreceptores encefálicos están muy cerca de las neuronas GnRH-I, lo que indica que los fotorreceptores cerebrales se comunican directamente con las neuronas y terminales GnRH. Durante la temporada de reproducción, el GnRH-I aumenta en las aves macho. La melatonina y el estrés pueden ser factores clave involucrados en las funciones neuronales de la GnRH-I. La estimulación de GnRH-I, a su vez, inhibe la actividad gonadal y los esteroides sexuales al disminuir la síntesis y liberación de gonadotropinas (Scanes and Dridi, 2022).

2.1.6. Gonadotropinas en la función testicular

Las gonadotropinas ejercen sus efectos sobre los testículos al unirse a receptores específicos de la superficie celular en dos tipos distintos de células parenquimatosas testiculares: células de Leydig y de Sertoli. Las células de Leydig contienen las enzimas esteroidogénicas necesarias para la producción de andrógenos y responden rápidamente a la LH a través de aumentos rápidos en el segundo mensajero cAMP. Los principales esteroides secretados por las células de Leydig incluyen testosterona y androstenediona. La concentración de testosterona en la circulación general está en el rango de 5-15 nM, secretada como pulsos discretos, que siguen de cerca los pulsos de LH. La testosterona es esencial para la espermatogénesis, el mantenimiento de los conductos excurrentes y los atributos sexuales secundarios. Aunque se sabe que la FSH afecta a las células de Sertoli, los medios por los que actúa la FSH son poco conocidos en las aves. Está bien establecido que la testosterona es absolutamente esencial para mantener la espermatogénesis y, a diferencia de la LH, el efecto de la FSH es potenciado por la testosterona. LH y FSH parecen ser esenciales para la espermatogénesis en aves galliformes (Scanes and Dridi, 2022). Mientras que la espermatogénesis en los machos galliformes puede depender de la testosterona secretada por las células de Leydig, el efecto biológico completo de esta hormona en la producción de semen puede estar mediado, en parte, por su conversión a estrógeno dentro del epitelio seminífero del gallo (Froman *et al.*, 2016). La FSH es el regulador más importante de la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli. Aunque la producción de espermatozoides depende del número de células de Sertoli, el proceso está controlado en última instancia por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (Scanes and Dridi, 2022). Además, se ha cuestionado un papel directo de la testosterona en la regulación del epitelio seminífero de las aves debido a la ausencia informada de inmunorreactividad similar al receptor de andrógenos dentro del túbulo seminífero (Froman *et al.*, 2016).

2.2 Sistema reproductivo de la gallina

El proceso reproductivo de la gallina, que consta de ovulación, ovoposición e incubación. El aparato reproductor de la gallina consta de dos partes bien diferenciadas: el ovario y el oviducto (Guioli *et al.*, 2014). En el aparato reproductor, empiezan a diferenciarse las gónadas primitivas procedentes del mesonefros, en los embriones hembra, empieza a desarrollarse la gónada izquierda, pero la derecha inicia un proceso de atrofia por falta de epitelio gonadal. No obstante, en ocasiones la gónada derecha puede persistir. En la mayoría de las hembras, solo se desarrollan el ovario izquierdo y el conducto mülleriano izquierdo. El conducto de Müller luego se convierte en el oviducto debido a la acción estimuladora de los estrógenos y la ausencia del factor anti-Mülleriano (Kuroiwa, 2017).

La transformación de un ovocito en un óvulo completamente formado requiere de 8 a 10 días desde el comienzo del rápido crecimiento folicular hasta la oviposición. El sistema reproductivo femenino de las aves difiere marcadamente del de los mamíferos para permitir la maduración gradual de los folículos preovulatorios que luego ovulan individualmente, seguida de la formación sucesiva de todos los demás componentes del huevo durante un paso de un día a través del oviducto (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.2.1. Ovario

El ovario consta de una médula, que contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y nervios, y una corteza. La corteza contiene los ovogonios, que dan origen a los ovocitos. El ovario del ave inmaduro en forma de pera mide unos 15 mm de largo por 5 mm de ancho y se encuentra en la cavidad del cuerpo, ventral a la aorta, craneal al riñón y cerca de las dos glándulas suprarrenales. El suministro de sangre surge de la arteria gonadorrenal. Dos venas drenan la sangre del ovario. Está ampliamente inervado desde la cadena simpática a través del plexo suprarrenal-ovárico (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.2.2. Oviducto

El oviducto está suspendido dentro de la cavidad abdominal por ligamentos dorsales y ventrales, por los cuales los vasos sanguíneos y los nervios irrigan las partes oviductales particulares. El oviducto está inervado por nervios simpáticos y parasimpáticos. La inervación simpática surge de los plexos abdominales ovárico que inerva el infundíbulo, los plexos renal y

aórtico que inervan el magnum, el plexo mesentérico posterior que inerva el istmo y el plexo hipogástrico que inerva la glándula de la concha y la vagina. El plexo pélvico parasimpático contiene fibras del nervio pélvico (Liu *et al.*, 2007). El oviducto de la gallina ponedora incluye cinco segmentos morfológica y funcionalmente específicos: el infundíbulo, el magnum, el istmo, la glándula de la concha (útero) y la vagina (Chousalkar and Roberts, 2008).

2.2.2.1. Infundíbulo

El infundíbulo envuelve al óvulo, que se libera tras la ovulación; durante aproximadamente 18 min (rango: 15-30 min) permanece el huevo en esta parte. Actúa para engullir el óvulo ovulado y es el sitio de la fertilización. La porción glandular más angosta del infundíbulo se conoce como la "región chalazífera" y las secreciones de esta región forman una capa perivitelina "externa" y probablemente contribuyan a la formación de las chalazas (Bakst and Howarth, 1977). La región calazífera es también uno de los dos sitios de almacenamiento de espermatozoides en el oviducto (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.2.2.2. Magnum

Es la región secretora de albúmina. Es el segmento oviductal más largo y se distingue del infundíbulo y el istmo por su mayor diámetro externo, paredes más gruesas y pliegues más voluminosos. La mayoría de los 40 aminoácidos que componen la albúmina se producen en la mucosa oviductal. Las glándulas tubulares son la fuente de ovoalbúmina, que constituye el 54% de la clara de huevo, así como de lisozima, ovotransferrina y ovomucoide. Las células de las glándulas tubulares parecen producir proteínas de clara de huevo de forma continua y las almacenan en gránulos, que se liberan a medida que pasa el óvulo. A medida que el óvulo atraviesa el magnum en aproximadamente 2,5-3 h, se secreta la mayor parte (15 g) de la clara de huevo (Jung *et al.*, 2011).

2.2.2.3. Istmo

Es una sección corta del oviducto que forma la membrana de la cáscara alrededor del óvulo en desarrollo (Scanes and Dridi, 2022). El istmo es una sección corta del oviducto (en pollos de 8 cm de largo), separada del magnum por una línea de demarcación translúcida estrecha, que es una región no glandular. El istmo se caracteriza por paredes más estrechas y delgadas, y por pliegues luminales menos voluminosos que los que se encuentran en el magnum. Se ha observado, que

mientras el huevo albuminoso va entrando en el istmo, se deposita una membrana en aquellas partes en contacto con el tejido glandular (Froman *et al.*, 2016; Hincke *et al.*, 2012).

2.2.2.4. Útero

La glándula de la concha se subdivide en la glándula de la concha tubular inicial corta (2 cm de largo) y la bolsa de la glándula de la concha en forma de saco (7 cm de largo y 3 cm de ancho). La glándula de la cáscara, a menudo denominada útero, se caracteriza por una sección similar a una bolsa unida al istmo por un "cuello" corto y por una extensa muscularización. El huevo permanece en la glándula de la cáscara durante aproximadamente 20 horas. Durante las primeras 6 horas más o menos, un líquido acuoso producido por la región del cuello pasa al huevo, lo que da como resultado un aumento del doble en la masa de clara de huevo. Sin embargo, este "relleno" puede continuar durante todo el tiempo que el huevo permanece en la glándula de la cáscara. A partir de entonces, el proceso principal es la calcificación. Durante su permanencia en la glándula de la cáscara, la rotación del huevo alrededor del eje polar conduce a la finalización de la formación de las chalazas, que comenzaron en el infundíbulo, y la estratificación de la albúmina (Hincke *et al.*, 2012).

Las tareas finales de la glándula de la concha son la pigmentación y la formación de la cutícula. Los pigmentos consisten en derivados de porfirina del metabolismo de la hemoglobina y se depositan durante las últimas horas en la glándula de la concha. La cutícula se deposita después de que se completa la cáscara, justo antes de la oviposición (Froman *et al.*, 2016).

2.2.2.5. Vagina

La vagina es un conducto angosto (en gallinas de 10 cm de largo), separado de la glándula de la concha por el músculo del esfínter uterovaginal y se abre en el urodeo de la cloaca. La vagina no juega ningún papel distinto en la formación del óvulo, pero en coordinación con la glándula de la cáscara, participa en la expulsión del óvulo. El sistema inmunológico bien desarrollado en la vagina previene la invasión de patógenos de la cloaca. Además, la mucina producida por las células epiteliales de los segmentos oviductales inferiores (istmo, glándula de la concha y vagina) proporciona una barrera contra la invasión de microbios (Scanes and Dridi, 2022).

La vagina tiene la apariencia de ser relativamente corta. La capa muscular está bien desarrollada y los pliegues luminales son altos y estrechos. La vagina sirve como pasaje para el

óvulo formado desde la glándula de la cáscara hasta la cloaca en el momento de la oviposición. También cumple una función importante en la selección, transporte y almacenamiento de esperma (Froman *et al.*, 2016).

2.3. Semen de gallo

2.3.1. Características del semen del gallo

En los gallos, el semen blanco lechoso contiene aproximadamente 3,5 millones de espermatozoides por microlitro. El volumen de la eyaculación es de 0,5 a 1 ml (Konig *et al.*, 2016). El plasma seminal se deriva de los túbulos seminíferos y los conductos eferentes, ya que el ave no tienen próstata, glándula bulbouretral ni vesícula seminal (Reece and Rowe, 2017).

2.3.2. Morfología y fisiología del espermatozoide del gallo

La estructura del esperma aviar se asemeja a la de otras especies de vertebrados en que hay una cabeza, que consiste principalmente en el núcleo y el acrosoma, una pieza intermedia con mitocondrias y un flagelo largo. En las aves domésticas, sin embargo, el núcleo es tan largo y delgado que la cabeza no sobresale en la forma característica de la mayoría de los espermatozoides vertebrados (Bellairs and Osmond, 2015). Los espermatozoides galliformes son vermiformes con una anchura máxima de aproximadamente 0,6 μm y una longitud que oscila entre 75 y 90 μm . Este valor es comparable al rango reportado para el gallo de 80 a 120 X 10^6 espermatozoides por gramo de testículo por día (Froman *et al.*, 2016). Contienen un acrosoma cónico, un núcleo cilíndrico ligeramente doblado y una hélice de 25 a 30 mitocondrias que rodean la porción proximal de un flagelo largo, que representa aproximadamente el 84% de la longitud de la célula (Scanes and Dridi, 2022). El núcleo del espermatozoide de las aves mide aproximadamente 12 μm de largo y 0,6 μm de diámetro. Los espermatozoides de las aves, a diferencia de los de los mamíferos, desarrollan su capacidad de fecundación aún en los testículos y, como no existen glándulas accesorias correspondientes a las de los mamíferos, el semen pasa directamente al tracto genital de la gallina. La fecundación tiene lugar en el infundíbulo del oviducto (Bellairs and Osmond, 2015). Los espermatozoides testiculares del gallo, aunque inmóviles, pueden fertilizar ovocitos si los espermatozoides se introducen en el oviducto por encima del esfínter vaginal (Froman *et al.*, 2016). La competencia espermática ocurre cuando el esperma de dos o más machos

está presente en el tracto reproductivo femenino y debe competir por la fertilización del óvulo (Scanes and Dridi, 2022).

2.3.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso en el que la división de las células madre espermatogoniales finalmente produce espermatozoides mientras se mantiene una población de células madre (Scanes and Dridi, 2022). La espermatogénesis en todas las especies involucra una secuencia programada de pasos que involucran tipos específicos de células (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas) que persisten por períodos que van desde minutos hasta días (Froman *et al.*, 2016). La duración de la espermatogénesis, hasta la entrega de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero contorneado, no suele ser superior a 12 días en el gallo (Konig *et al.*, 2016). Este fenómeno complejo ocurre dentro del epitelio seminífero y depende de la disponibilidad de testosterona y FSH, la actividad de las células de Sertoli, así como de las interacciones entre las células germinales y las células de Sertoli. La espermatogénesis en las aves galliformes implica una reducción extrema del contenido citoplasmático de las células haploides (Froman *et al.*, 2016). La espermiogénesis implica la formación de un acrosoma y un axonema, pérdida de citoplasma y sustitución de nucleohistonas por nucleoprotamina, que acompaña a la condensación nuclear. Las reducciones en los volúmenes citoplasmático y nuclear son llamativas; los espermatozoides maduros de gallo representan solo el 3% del volumen inicial de células espermáticas (Scanes and Dridi, 2022). Una reducción de aproximadamente el 97% del volumen celular acompaña la transformación de espermátidas esféricas a espermatozoides vermiformes en el gallo. La espermatogénesis culmina con la liberación de espermatozoides inmóviles del epitelio seminífero. Por último, cabe señalar que, si bien el escroto proporciona un aparato de enfriamiento esencial para que se produzca la espermatogénesis en los mamíferos domésticos a una temperatura de 32 a 35 °C, la espermatogénesis se produce a la temperatura corporal central (40 a 41 °C) en el ave (Froman *et al.*, 2016).

2.3.4. Transporte y maduración extragonadal de los espermatozoides.

Los espermatozoides se suspenden dentro del líquido secretado por las células de Sertoli. El paso de los espermatozoides a través del laberinto de los túbulos seminíferos probablemente depende de la presión hidrostática del líquido de los túbulos seminíferos y de la contractilidad de las células mioepiteliales que recubren la superficie externa de los túbulos seminíferos. Se ha

estimado que un análisis de los fenómenos y la evolución temporal del transporte de espermatozoides a través de los conductos excurrentes del gallo llevará varios días. Quizás el fenómeno más evidente que ocurre durante el transporte de espermatozoides a través de los conductos excurrentes; como lo demuestra un cambio en la concentración de espermatozoides, es la absorción del líquido de los túbulos seminíferos (Scanes and Dridi, 2022). El efluente de los túbulos seminíferos pasa rápidamente a través de los conductos excurrentes, y el resultado más evidente es la formación de semen viscoso debido a la absorción del líquido de los túbulos seminíferos, particularmente a nivel del conducto eferente proximal (Froman *et al.*, 2016).

Los conductos eferentes, que representan el principal conducto excurrente dentro del epidídimo, pueden ser un sitio crítico para la maduración de los espermatozoides. Debido al extenso plegamiento de la mucosa, la secreción apocrina, la presencia de células ciliadas y células epiteliales con abundantes microvellosidades, los conductos eferentes parecen ser un sitio donde los espermatozoides se mezclan con las secreciones a medida que se concentran. El medio resultante es plasma seminal. La composición química del plasma seminal es distinta del plasma sanguíneo, como lo demuestran las diferencias en la composición de electrolitos, aminoácidos libres y proteínas. El mantenimiento de estas diferencias a lo largo de los conductos excurrentes se ha atribuido a las uniones estrechas entre las células epiteliales adyacentes que revisten los conductos (Scanes and Dridi, 2022).

El paso de los espermatozoides a través de los conductos excurrentes es la capacidad de los espermatozoides para volverse móviles cuando el semen recuperado del conducto deferente se diluye con un tampón fisiológico (Froman *et al.*, 2016). Los espermatozoides no necesitan ser móviles para ascender por el oviducto por encima del esfínter vaginal. Por lo tanto, la capacidad de fertilización de los espermatozoides testiculares puede no depender de la motilidad tanto como la capacidad de los espermatozoides para experimentar una reacción acrosomal en respuesta al contacto con la capa perivitelina interna del ovocito (Scanes and Dridi, 2022). Más del 90% de la reserva de espermatozoides extragonadal galliforme está contenido dentro del conducto deferente (Froman *et al.*, 2016). Después del apareamiento, algunos, pero no todos (Bellairs and Osmond, 2015), los espermatozoides son transportados a los túbulos de almacenamiento de espermatozoides (inferiores) (Reece and Rowe, 2017; Akers and Denbow, 2013), que se encuentran en la unión de la vagina y la glándula del útero. Hay túbulos de almacenamiento de espermatozoides adicionales en el extremo

superior del infundíbulo. Si hay espermatozoides allí, pueden fertilizar el óvulo. Los espermatozoides probablemente están metabólicamente inactivos mientras están en los tubos, la concentración de calcio en el fluido tubular aparentemente inhibe la motilidad de los espermatozoides, pero se activan al salir. El período de tiempo en el que los espermatozoides permanecen fértiles varía según la gallina, pero es común entre 18 y 21 días (Bellairs and Osmond, 2015).

2.3.5. Recolección de semen

La recolección de semen para la inseminación artificial se practica de forma relativamente limitada en los programas de cría en cautividad. El semen se obtiene masajeando la región cloacal. Debido a la falta de técnicas de conservación eficaces, la inseminación artificial se realiza casi exclusivamente con semen fresco (Konig *et al.*, 2016). En el gallo, la protrusión de los genitales y la expulsión forzada del semen siguen a las caricias externas de la base de la cola. La eversión fálica sigue a una estimulación, pero el semen generalmente se libera solo después de aplicar presión a los depósitos de almacenamiento terminales (agrandamientos terminales de los conductos deferentes). La recolección de semen de machos se practica ampliamente. El volumen de la eyaculación del gallo es de unos 0,3 a 0,5 ml. La concentración de espermatozoides del gallo es de aproximadamente 4 mil millones/mL a 10 mil millones/mL (Reece and Rowe, 2017).

2.4. Inseminación artificial en aves

La inseminación artificial (IA) es una herramienta eficaz ampliamente utilizada por la industria avícola moderna para acelerar el proceso de reproducción. Sin embargo, existen desventajas como el potencial de fertilidad variable del semen, que no la hace deseable para su uso en rebaños comerciales. Se han realizado esfuerzos en investigación para desarrollar protocolos mejorados de criopreservación de semen de gallo, todavía no se dispone de un procedimiento estándar para garantizar tasas de fertilidad constantes y fiables (Salehi *et al.*, 2020). En la industria avícola de especies domésticas, la IA representa ventajas similares a las obtenidas en la ganadería de mamíferos, como el mejor aprovechamiento de machos genéticamente superiores, reducción de la proporción de machos respecto a las hembras, cruce entre diferentes líneas o especies, no requiere la presencia de la conducta de apareamiento permitiendo una gran presión genética para la selección de caracteres en pocas generaciones. También debido a que la fertilidad de los gallos declina en el segundo y tercer año de la vida, y que la producción de semen se incrementa durante

el invierno y primavera y disminuye en el verano y otoño, declinando la fertilidad durante estas dos últimas estaciones (Tene, 2014).

Francesch, (1994) señaló que las inseminaciones en el momento previo a la puesta no suelen dar buenos resultados y se obtienen huevos fértiles a partir del tercer-cuarto día post-inseminación. Recalcando que antes de inseminar, no se debe exteriorizar el orificio vaginal en gallinas que están a punto de poner; es decir con el huevo totalmente formado en el útero. En este caso esperamos que realice la puesta.

2.4.1. Almacenamiento, transporte y fertilización del esperma.

A diferencia de la mayoría de los mamíferos en los que los espermatozoides pasan un tiempo relativamente cortos en el tracto femenino, los espermatozoides del gallo pasan períodos prolongados (hasta 32 días en la gallina) alojados dentro de los túbulos de almacenamiento de esperma del oviducto ubicados en la unión uterovaginal. No se sabe cómo entran, sobreviven y salen los espermatozoides de estos túbulos de almacenamiento de espermatozoides (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

El transporte de espermatozoides a la unión uterovaginal es rápido, menos de una hora; sin embargo, solo los espermatozoides viables ingresan a los túbulos de almacenamiento de espermatozoides. Aunque primero se pensó que estaba asociado con la oviposición, la evidencia actual sugiere que la liberación de esperma almacenado es continua o episódica. Estos espermatozoides ascienden por el oviducto por medio de contracciones del músculo liso y/o actividad ciliar y se acumulan en los pliegues mucosos y glándulas tubulares cortas en el extremo inferior del infundíbulo. En la ovulación, los espermatozoides se liberan (probablemente por distensión del infundíbulo) para fertilizar el óvulo (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

Los espermatozoides que entran en contacto con la capa perivitelina sufren una reacción acrosómica y presumiblemente por la acción de la tripsina como la enzima acrosina, hidrolizan la capa perivitelina. Se observa polispermia en el óvulo de gallina, con muchos agujeros hidrolizados en la capa perivitelina. Aunque teóricamente solo un espermatozoide necesita penetrar la capa perivitelina que rodea el disco germinal para causar la fertilización, existe una clara relación entre el número de tales agujeros presentes en cualquier huevo y la probabilidad de que ese huevo sea fértil (Froman *et al.*, 2016).

2.5. El huevo

El ave produce un huevo macroscópico que contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del pollito completamente formado. El huevo está formado básicamente por tres componentes: la yema, que equivale al huevo microscópico de los mamíferos; la albúmina, o clara de huevo, que es secretada por el tracto reproductivo; y la concha, que proporciona protección y minerales al embrión en desarrollo (Gilbert, 1971; Froman *et al.*, 2016).

La yema, o el óvulo, comprende aproximadamente un tercio de la masa del huevo y contiene el pronúcleo femenino, la yema se compone de 50 % de agua, 32 % de lípidos y 16 % de proteína, y está rodeada por una membrana de cuatro capas. Las dos capas externas se derivan del oviducto, mientras que las dos capas internas son producidas por el ovario. La mayor parte de la yema es una mezcla heterogénea de proteínas, lípidos, pigmentos y una variedad de componentes orgánicos e inorgánicos menores, que proporcionan nutrientes para la embriogénesis. La yema también contiene inmunoglobulina G, que le confiere inmunidad al embrión (Gilbert, 1971; Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022;).

Los cromosomas maternos están empaquetados en un área del óvulo no fertilizado llamada blastodisco. Esta área es visible en la superficie de la yema como una pequeña mancha blanca de unos 3 mm de diámetro. El blastodisco flota en un cono de yema "blanca" de color claro que forma el Núcleo de Pander y termina dentro del óvulo en una bola conocida como latibra, esta yema blanca contiene una mayor proporción de proteínas que la yema amarilla y proporciona al pronúcleo femenino (o al cigoto si el huevo es fértil) un ambiente fisiológico normal. Si el óvulo ha sido fertilizado, el blastodisco se desarrolla durante el tránsito por el oviducto hacia un área un poco más grande llamada blastodermo en el óvulo fertilizado recién puesto (Froman *et al.*, 2016).

La albúmina rodea la yema y la coloca en el centro del huevo; comprende el 58% del peso del huevo, tiene al menos siete regiones principales que contienen alrededor de 40 proteínas, muchas de las cuales son exclusivas de la gallina ponedora. Dado que la albúmina rodea al embrión en desarrollo, forma un manto acuoso que evita la desecación y sirve como reserva de agua principal para el embrión. También aporta algunas proteínas, vitaminas y minerales al embrión durante su desarrollo posterior. Se han atribuido otras funciones a proteínas específicas, ya que muchas de las proteínas *in vitro* tienen propiedades bactericidas, mientras que algunas tienen actividad enzimática y algunas son inhibidoras de enzimas (Froman *et al.*, 2016).

El caparazón sirve para proteger físicamente y contener al embrión durante el desarrollo, para permitir el intercambio de gases entre el embrión y el medio ambiente, y para actuar como barrera contra la invasión microbiana y la pérdida de agua. Se compone de tres estructuras: las membranas, la cáscara mineralizada y la cutícula. Las dos membranas de la cubierta son láminas de proteína fibrosa. En el extremo más grande del huevo, las láminas de proteína se separan para formar un saco de aire. Funcionalmente, las membranas de la cubierta proporcionan la superficie sobre la cual puede ocurrir la mineralización; las fibras de la membrana de la cubierta externa sirven como sitio de crecimiento de los cristales de carbonato de calcio y sirven como matriz orgánica de la cubierta. Las membranas también pueden reducir la velocidad de entrada de bacterias, lo que permite que las propiedades bactericidas de la clara de huevo actúen con mayor eficacia (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

La cáscara del huevo está compuesta de cristales radiantes de carbonato de calcio puro, corriendo verticalmente a través de la cubierta hay poros que permiten el paso de los gases. El caparazón forma una barrera física a las sustancias que podrían afectar negativamente el microambiente del embrión. También proporciona resistencia mecánica y un soporte rígido para mantener la orientación de los componentes internos heterogéneos. La resistencia de la concha está determinada principalmente por su curvatura y grosor. También proporciona calcio para el embrión en desarrollo (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

La cubierta exterior del huevo, la cutícula proteica, es libremente permeable a la transferencia de fluidos antes de la oviposición, pero se seca inmediatamente después de la puesta del huevo para convertirse en una barrera contra la contaminación bacteriana y la pérdida de agua (Froman *et al.*, 2016).

La formación del huevo implica el transporte de grandes cantidades de material a través de numerosas membranas biológicas y la formación de muchas sustancias nuevas, en particular proteínas y lípidos específicos. El tamaño, la composición del huevo y la velocidad a la que se producen los huevos, se ven afectados por numerosos factores genéticos, ambientales y físicos (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.5.1. Transporte de huevos y oviposición

El óvulo en desarrollo pasa unos 15 minutos en el infundíbulo. En el magnum, su velocidad promedia unos 2 mm/min, por tanto, tarda unas 2 o 3 horas en atravesar esta región. El huevo tarda entre 1 y 1 1/2 horas en atravesar el istmo. Alrededor de 20 horas de su tiempo total en el oviducto (alrededor de 26 horas) se gasta en la glándula de la cáscara. El paso a través de la vagina toma solo unos segundos (Froman *et al.*, 2016).

No se sabe con precisión cómo se inicia la oviposición, pero están involucrados tanto mecanismos hormonales como neurales. La oviposición, es decir, la expulsión del óvulo del oviducto ocurre por contracciones vigorosas del músculo de la glándula de la cáscara y la relajación del esfínter uterovaginal (posiblemente análogo al cuello uterino de los mamíferos). Al igual que el parto de los mamíferos, la oviposición en las aves está regulada, al menos en parte, por una hormona neurohipofisaria (arginina vasotocina; AVT) y por las prostaglandinas ováricas. El folículo posovulatorio más grande (la masa de tejido que queda después de la ovulación del folículo anterior) secreta prostaglandinas que inician la contracción de la glándula de la cubierta, donde se encuentran tanto los receptores AVT como los de prostaglandina. Estudios recientes han demostrado que la galanina, un péptido que se encuentra ampliamente en el sistema nervioso y en varios órganos de mamíferos, provoca la oviposición en las codornices y puede actuar como neurotransmisor o neuromodulador en la glándula del caparazón (Srivastava *et al.*, 2010).

El paso del óvulo a la vagina y la distensión concomitante de la pared vaginal provoca el reflejo de "pujar hacia abajo", que se caracteriza por un cambio en la respiración y la postura, y la contracción de los músculos abdominales del cuerpo (Li *et al.*, 1996).

2.5.2. Cutícula de cáscara de huevo y depósito de pigmento

Una vez que se completa la calcificación, la cutícula se deposita en la superficie de la cáscara durante la última hora antes de la oviposición. La cutícula protege el huevo aviar de la invasión microbiana en los huevos. Contiene proteínas con propiedades antibacterianas como *ovocalyxin-25*, *ovocalyxin-32*, *ovocalyxin-36*, *ovocleidin-116*, *ovocleidin-17* y *clusterina*, así como lípidos y polisacáridos relacionados con la glicosilación de las proteínas, (Scanes and Dridi, 2022).

El color de la cáscara de huevo aviar está determinado principalmente por tres tipos de pigmentos, es decir, protoporfirina-IX (huevo de cáscara marrón), biliverdina-IX (huevo de cáscara azul) y quelato de zinc biliverdina. El mecanismo molecular de la formación de la cáscara de huevo pigmentada aún no está claro; sin embargo, existe una creciente evidencia de la expresión de numerosos genes involucrados en la vía de la síntesis de biliverdina (u otros derivados de la porfirina), (Scanes y Dridi, 2022).

2.5.3. Ciclo ovulatorio

La gallina, a diferencia del mamífero, solo tiene una fase folicular. Debido a que la gallina no queda preñada, no hay necesidad de un cuerpo lúteo. Por lo tanto, el ciclo de crecimiento folicular y cambios hormonales que culmina en la ovulación se denomina ciclo ovulatorio. Aproximadamente cada 25 a 27 horas, se pone un huevo. Durante este ciclo, se produce un aumento preovulatorio de LH de 4 a 6 horas antes de la ovulación. A diferencia de los cambios en la LH, los niveles sanguíneos de FSH son relativamente constantes a lo largo del ciclo (Etches, 1990; Froman *et al.*, 2016).

La ovulación del segundo óvulo y los subsiguientes en una nidada se produce unos 30 minutos después de la oviposición del óvulo anterior. Debido a que la mayoría de las gallinas requieren más de 24 horas para completar un ciclo ovulatorio, tanto la oviposición como la ovulación ocurren más tarde en días sucesivos. Los factores clave que determinan el momento de la ovulación (y la posterior oviposición) son la generación del pico preovulatorio de LH y la presencia de un folículo maduro en el momento en que ocurre el pico de LH. El momento del pico preovulatorio de LH es el resultado de un ritmo circadiano que restringe este pico a un período "abierto" de 8 horas durante las 24 horas del día. La ubicación de este período abierto dentro del ciclo de luz y oscuridad parece estar controlada por el inicio de la oscuridad, pero las estructuras anatómicas y las interacciones endocrinas exactas entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario que son necesarias para definir el período abierto y conducir al aumento preovulatorio de LH no se resuelven. El resultado, sin embargo, es que el pico de LH ocurre más tarde cada noche hasta que finalmente no puede ocurrir ningún pico de LH porque los eventos neuroendocrinos requeridos que culminan en este pico no han ocurrido durante el período abierto y no se pone un huevo al día siguiente. Este día se llama un día de "pausa". Luego, la gallina restablecerá su ritmo

neuroendocrino, ovulará temprano en el período abierto y pondrá el primer huevo de la próxima nidada temprano al día siguiente (Froman *et al.*, 2016).

2.5.4. Terminación de la producción de huevos

En condiciones naturales de crianza, la producción de huevos termina con el inicio del comportamiento de incubación o fotorrefractoriedad. La temporada reproductiva de la naturaleza es relativamente corta para la mayoría de las aves y se ha alargado para las aves comerciales a través de la cría y el manejo selectivos. El uso de luz artificial proporciona un fotoperíodo constante o creciente, y la fotorrefractoriedad es mínima en estas cepas. De manera similar, la selección para la producción de huevos ha eliminado en gran medida el comportamiento de incubación (cría), que es la tendencia natural de la gallina a dejar de poner huevos e incubar una nidada de huevos. Las razas de aves de corral de tipo carne tienen ciclos reproductivos más cortos y producen menos huevos (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.5.5. Fotorefractoridad

El inicio de la reproducción ocurre cuando la luz, actuando a través de los fotorreceptores en el cerebro, proporciona señales neuronales que el sistema endocrino reproductivo del ave percibe como una duración del día que es suficiente para iniciar la reproducción. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, estas señales neuronales comienzan a fallar en mantener la secreción de gonadotropina a pesar de la estimulación continua con luz. Esta "foto refractoriedad" es un evento gradual caracterizado por una disminución gradual en la producción de óvulos hasta que, finalmente, la hipófisis ya no secreta suficiente LH para mantener la gónada y se produce una regresión gonadal. El mecanismo de esta regresión ovárica parece residir en el hipotálamo, donde disminuye la síntesis o secreción de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). La fotorrefractoriedad ocurre muy gradualmente en las gallinas ponedoras, pero a menudo ocurre temprano en la temporada reproductiva de las gallinas reproductoras de pollos de engorde. Solo el reciclaje (equivalente al "invierno" reproductivo) restablecerá el sistema neuroendocrino a un nivel que nuevamente apoye la reproducción (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

2.5.6. Comportamiento de incubación

Este comportamiento se ha eliminado en gran medida de las gallinas tipo huevo y se ha reducido a través de la reproducción en gallinas reproductoras de pollos de engorde. El

comportamiento de incubación resulta de una serie de eventos neurales y endocrinos que conducen a una elevación dramática en la secreción pituitaria de prolactina. Los altos niveles circulantes de prolactina causan la regresión del ovario y el final de la puesta de huevos. Se necesita una secuencia de estímulos hormonales y ambientales para iniciar el comportamiento de incubación. Los aumentos en la secreción de estrógeno y progesterona que ocurren con el inicio de la producción de huevos también pueden actuar para preparar a la gallina para la incubación. La progesterona induce la actividad de anidación, mientras que el estrógeno estimula la síntesis del péptido intestinal vasoactivo (VIP), que es la hormona liberadora hipotalámica que estimula la secreción de prolactina en las aves (Froman *et al.*, 2016; Scanes and Dridi, 2022).

A medida que aumenta la frecuencia de anidación, los lactotrofos se vuelven más numerosos, y permanecen elevados hasta la eclosión. Una vez que nacen los pollitos el comportamiento de incubación cesa y la gallina exhibe un comportamiento maternal. Este cambio de comportamiento va acompañado de una caída abrupta en los niveles de prolactina circulante y requiere el estímulo táctil del pollito. Los estímulos visuales y auditivos por sí solos no son suficientes para terminar el comportamiento de incubación (Froman *et al.*, 2016).

2.6. Antioxidantes

Las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las membranas de los espermatozoides aviares muestran la necesidad de la membrana de alta fluidez y flexibilidad; que resultan esenciales para la movilidad de los espermatozoides (Donoghue and Donoghue, 1997; Zaniboni *et al.*, 2006).

Sin embargo, la desventaja es que los espermatozoides son vulnerables a ROS y peroxidación de lípidos. El equilibrio de ROS se puede considerar como el equilibrio de "creación y destrucción". En circunstancias fisiológicas normales, existe un equilibrio adecuado entre ROS y antioxidantes (Agarwal and Anandh, 2005); El aumento de la producción de ROS y la disminución del nivel de antioxidantes resultan en estrés oxidativo. En consecuencia, los desequilibrios entre los prooxidantes y la concentración de antioxidantes tendrán un impacto negativo en la calidad del semen. Los antioxidantes, en general, son compuestos que eliminan o suprimen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), o se oponen a sus acciones. Se está investigando dentro de la categoría de antioxidantes químicos; tanto los productos naturales como los sintéticos han llamado la atención debido a su utilidad en el manejo de la reproducción

y la fertilidad. Se considera que el delicado equilibrio entre la producción de ROS y la defensa antioxidante es un determinante importante de la calidad del semen, en particular su capacidad fertilizante (Sikka *et al.*, 1995).

2.6.1. ROS en aves

Las membranas de los espermatozoides aviares son ricas en PUFA y pueden sufrir fácilmente la peroxidación lipídica en presencia de ROS (Fujihara and Howarth, 1978; Surai *et al.*, 1998; Cerolini *et al.*, 2006). Las ROS son moléculas reactivas producidas durante la reducción de oxígeno que afectan el deterioro de la función y viabilidad de los espermatozoides, si se producen en concentraciones superiores a las óptimas (Aitken *et al.*, 1989; Lamirande y Gagnon, 1993). La peroxidación de PUFA en las membranas de los espermatozoides es una reacción autocatalítica y autopropagante, que puede causar disfunción celular asociada con la pérdida de la función e integridad de la membrana y finalmente conduce a una disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Alvarez and Storey, 1982). Como consecuencia del potencial destructivo de las ROS, las membranas de los espermatozoides deben estar protegidas por un sistema antioxidante altamente eficaz para prevenir el daño peroxidativo (Cerolini *et al.*, 2006), (Partyka *et al.*, 2012).

2.6.2. Criopreservación de semen de gallo

La genética de muchas razas locales o en peligro de extinción, con poblaciones pequeñas, puede almacenarse en forma de células reproductoras criopreservadas (Rakha *et al.*, 2017; Svoradová *et al.*, 2018). La conservación de los recursos genéticos de los animales de granja es un desafío importante para mantener la biodiversidad nacional y la adaptación de las especies animales a los cambios globales, accidentes de reproducción o epidemias (Mara *et al.*, 2013; Joost and Bruford, 2015). Generalmente, el almacenamiento de semen en frío se utiliza para reducir el metabolismo de los espermatozoides y para mantener la viabilidad de los espermatozoides durante un período de tiempo prolongado. Estos extensores de semen y el mantenimiento de la temperatura juegan un papel importante en el mantenimiento de la motilidad del esperma (Dumpala *et al.*, 2006).

2.6.3. Uso de antioxidantes

2.6.3.1. Melatonina (ME)

La melatonina (ME) contiene un heterociclo indol y dos cadenas laterales llamadas grupo *5-metoxi* y un grupo *3-amida*. La fracción indol rica en electrones con alta estabilidad de resonancia y electroreactividad determina la potente capacidad de captación de radicales libres. Por lo tanto, se ha informado que los productos resultantes de la interacción de la melatonina con los radicales libres son *2-hidroxi*, *3-hidroxi*, *6-hidroxi* y *7-hidroxi melatonina*, *2 o 3-Hydroxymelatonina cíclica*, *Nnitrosomelatonina* y *N1-acetil-N2 formil- 5-metoxicinuramina* (AFMK), respectivamente. Las cadenas laterales contribuyen a la capacidad de eliminación de la melatonina y limitan las acciones prooxidativas de la melatonina. La melatonina protege eficazmente las moléculas en varios compartimentos de la célula, incluida la membrana, el citosol, la mitocondria y el núcleo contra agresiones oxidativas. Las modificaciones de las cadenas laterales, como la hidroxilación en C5, influyen tanto en las propiedades químicas como físicas de la melatonina, alterando así su eficacia antioxidante en situaciones in vivo (Tan *et al.*, 2005). La indolamina es un antioxidante que puede eliminar directamente las ROS producidas durante el metabolismo normal de este orgánulo y promueve indirectamente la actividad de las enzimas antioxidantes que incluyen SOD (superóxido dismutasa), GPx (glutación peroxidasa), GRd (glutación reductasa) y catalasa (CAT). Además, la melatonina aumenta la actividad y la expresión de los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones, en condiciones normales y restablece sus actividades en algunas situaciones patológicas. Una consecuencia importante de estos efectos es que la ME mantiene la homeostasis del GSH (glutación reductasa) en las mitocondrias y aumenta la producción de ATP (León *et al.*, 2004). Según Mehaisen *et al.* (2020), la ME tiene un efecto crioprotector luego de la suplementación en un medio de congelación sobre la calidad del espermatozoide de gallo descongelado, ya que la integridad de la membrana plasmática y la actividad mitocondrial son mayores. En cambio, la peroxidación lipídica y fragmentación del ADN son menores. La dosis óptima de melatonina es de 0,25 mg/ml (Appiah *et al.*, 2019).

2.6.3.2. L-carnitina (LC)

La L-carnitina (LC) tiene propiedades antioxidantes que protegen la membrana del espermatozoide contra el incremento tóxicos de ROS. Las carnitinas están presentes en altas concentraciones tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides, donde reduce la disponibilidad de lípidos para la peroxidación al transportar ácidos grasos poliinsaturados a las mitocondrias para que la β -oxidación genere energía para la motilidad de los espermatozoides. La LC tiene la capacidad quelante del hierro libre, evitando así el incremento de la producción de ROS debido a la actividad prooxidante del hierro. La carnitina puede proteger a otros antioxidantes contra posibles daños peroxidativos. Trabaja junto con SOD para proteger la membrana lipídica que rodea a los espermatozoides y juega un papel clave en la reducción de la peroxidación lipídica, protegiendo a las células del daño de la peroxidación (Khan, 2011).

La LC libre se conoce principalmente por su importancia biológica en la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga. En el metabolismo de los mamíferos, todas las funciones principales de la L-carnitina libre implican la conjugación de residuos acilo con el grupo β -hidroxilo de la molécula de carnitina, con la posterior translocación de un compartimento celular a otro. La forma acetilada de L-carnitina, acetil-L-carnitina, es la principal acilcarnitina que se encuentra en los tejidos animales. La L-carnitina libre controla el transporte de grupos acetilo y acilo a través de la membrana interna mitocondrial. La membrana mitocondrial interna no es permeable a los ácidos grasos de cadena larga ni a los derivados de la acil-coenzima A (CoA). Los ésteres de acilcarnitina transportan estos grupos acilo grasos a través de la membrana mitocondrial interna y, por lo tanto, desempeñan un papel crucial en la regulación de la β -oxidación (Jeulin, 1996). Se ha demostrado que la L-Carnitina es eficaz en la protección del espermatozoide de pollo contra la apoptosis, la pérdida de actividad mitocondrial y la desfragmentación del ADN (Partyka *et al.*, 2012). Fattah *et al.* (2017a) indicaron que se obtuvo una mayor motilidad, funcionalidad de la membrana y viabilidad de los espermatozoides de gallo después de la congelación-descongelación mediante la suplementación del diluyente con 1 y 2 Mm de LC.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Biológicos

- Esperma de 10 gallos criollos.
- 30 gallinas ponedoras de la línea genética Lohmann Brown.
- Huevos de gallina.

3.1.2 Reactivos

- Sodio L-Glutamato-L (H20)
- Glucosa H₂O (Sigma, G5146)
- Acetato de Magnesio 4 H₂O
- Acetato de potasio
- Polivinilpirrolidona (Mr 10 000)
- Sal sódica de penicilina G (Sigma, P3032)
- Sal sulfato de estreptomicina (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma G9012),
- Glutaraldehído 2%
- Alcohol polivinilo
- Sal sódica de HEPES (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Suero de albumina bovina, BSA (Sigma, A9418)
- Nitrógeno Líquido (NL₂)

- Melatonina (ME, Sigma M5250)
- L-carnitina (LC, Sigma 8400920025)

3.1.3 Equipos

- Sistema CASA, (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast)
- Cámara de Neubauer
- Centrífuga
- Rampa de doble enfriamiento (24 y 10 cm de altura)
- Caja poliestireno de 31 x 30 x 30 cm
- Tubos eppendorf 1,5 ml
- Tubos Khan
- Tubos falcon 15 ml
- Jeringas 1 ml
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Bolsas de sellado al vacío Ziploc®
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Baño María
- Pipetas automáticas (2-10 μ L, 2 – 20 μ L, 20 – 200 μ L, y (100 – 1000 μ L)
- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pajuelas de 0,25 ml
- Termómetro para pajuelas
- Refrigerador
- Termocouple
- Rampas de congelación
- Gafas de protección
- Pinzas
- Papel secante

3.2. Área de estudio

El trabajo experimental sobre la congelación y evaluación del semen se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, ubicado en el Km 23 de la vía Cuenca – Girón, perteneciente a la parroquia Victoria del Portete, perteneciente al cantón Cuenca, provincia del Azuay (longitud w 79° 03' 42'' y latitud sur 3° 03' 36''; altitud 2663 metros sobre el nivel del mar). Posteriormente, el experimento de fertilidad en gallinas se realizó en la parroquia Ricaurte, cantón Cuenca, provincia del Azuay (longitud occidental 2°51'333,8'', latitud Sur: 78°57'45.9'', altitud media. 2500 metros sobre el nivel del mar).

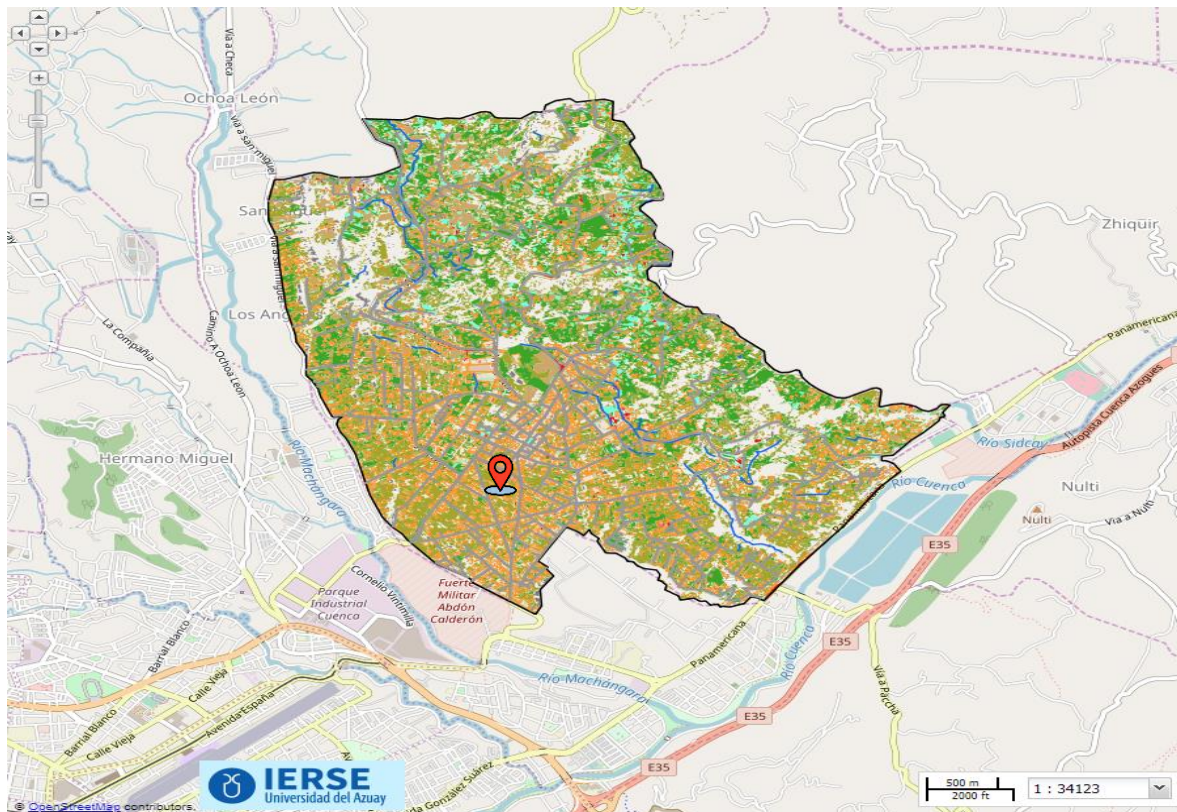


Figura 1. Ubicación del proyecto, donde se llevará a cabo la incubación e inseminación artificial de las gallinas, ubicación en la parroquia Ricaurte, sector 5 esquinas. **Fuente:** <http://gis.uzuay.edu.ec/>

3.3 Elaboración de diluyentes y medios

El diluyente que se usó en este experimento es a base de TCG, y se detallan en las siguientes tablas:

Tabla 1. Diluyente Lake-Ravie (IRTA) para la criopreservación de semen de gallo.

| Reactivo | Cantidad |
|----------------------------------|----------|
| Sodio L-Glutamato-L (H2O) | 1,92 g |
| Glucosa H2O (Sigma, G5146) | 0,8 g |
| Acetato de Magnesio 4 H2O | 0,08 g |
| Acetato de potasio | 0,5 g |
| Polivinilpirrolidona (Mr 10 000) | 0,3 g |
| Agua milli Q | 100 mL |

pH: 7,08; Osmolaridad: 343 mOsm/kg

Tabla 2. Hepes para fluorescencia.

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|------------|
| HEPES sal | 476,62 mg |
| NaCl | 1151,27 mg |
| KOH | 16,5 mg |
| Glucosa | 198,77 mg |
| H2O (agua Milli Q) | 100 ml |

Tabla 3. Yoduro de propidio.

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------------------|----------|
| Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170) | 1 mg |
| PBS | 1 mL |

3.4. Diseño experimental

El experimento incluyó sesenta eyaculados de semen de 10 gallos criollos recolectados en 6 sesiones semanales mediante la técnica de masaje dorsal con previo entrenamiento de 3 semanas. En cada sesión se conformó dos agrupaciones (pools) de semen de 5 eyaculados cada uno; así se controló la aleatoriedad individual. Un total de doce pools fueron conformados en todo el experimento. Cada pool fue evaluado su concentración espermática y luego se diluyó con Lake-Ravie (**Tabla 1**). Cada pool diluido fue dividido en tres alícuotas de igual volumen que fueron suplementadas con 5 μ M de ME, 10 mM de LC y sin aditivos (control) conformando tres tratamientos: ME, LC y control. En cada grupo se congeló un total de 10 pajuelas de 0,25 mL a una concentración de 200×10^6 espermatozoides/ml mediante la exposición a vapores de NL₂. La mitad de las pajuelas de cada grupo fueron descongeladas y analizadas su cinética espermática y viabilidad mediante el uso del sistema CASA (SCA) y la prueba fluorescente con yoduro de

propidio, respectivamente. La otra mitad de las pajuelas fueron empleadas para evaluar la fertilidad mediante la inseminación artificial de 30 gallinas ponedoras (10 gallinas para el grupo ME, 10 gallinas para el grupo LC y 10 para el control) en seis sesiones. Cada sesión de IA fue realizada cada 3 días. La valoración de la fertilidad se realizó mediante la observación del embrión evaluado por un ovoscopio.

3.5 Metodología

3.5.1 Reproductores y recolección del semen

Diez gallos criollos fueron seleccionados de acuerdo con su edad (8 a 24 meses), peso (2 a 2,5 kg), estatura (45 a 50 cm) y la presencia de cresta (producción de testosterona). Todos los gallos fueron confinados en jaulas de 0,6 x 0,7 x 1,0 metro de largo, ancho y alto, respectivamente, bajo un sistema de alojamiento de tipo intensivo. Los gallos criollos fueron procedentes de las parroquias rurales del cantón Cuenca. Los gallos recibieron una dieta balanceada por lo menos un mes antes de iniciar el trabajo experimental. La dieta basal consistió en la administración 120 g diarios de un concentrado comercial (13% de humedad, 16% de proteína, 3% de grasas, 4% de fibra cruda y cenizas 7%). Los componentes del concentrado estuvieron basados en maíz, pasta de soya, soya integral extruida, subproductos de arroz y de trigo, gluten de maíz, granos de destilería (DDGS) de maíz, aceite de palma, harina de alfalfa, carbonato de calcio, fosfato mono, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, HMA metionina 88%, L-lisina 78%, L-treonina 98%, promotor de crecimiento, antimicótico, prebiótico, atrapante de toxinas, enzimas (fitasa, celulasa, xilanas), antioxidante, vitaminas (A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12), ácidos (nicotínico, pantoténico, fólico), biotina, manganeso, zinc, hierro, selenio, cobre.

Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los procedimientos detallados por capítulo 7,8 del Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2021 © OIE-La Organización Mundial de Sanidad Animal, (15/08/2021), relativo a la protección de los animales utilizados en experimentos científicos (OIE, 2021).

Aproximadamente entre 3 a 4 semanas antes de iniciar el experimento, los gallos fueron entrenados para la eyaculación con la técnica del masaje dorsal. Para este proceso, se limpió las plumas del área alrededor de la abertura cloacal y se limpiaron con una gasa estéril y solución salina fisiológica. Además, se aplicó sulfato de gentamicina (50 µg/mL) en esa área. Para evitar la

contaminación de las muestras de semen con materia fecal, todos los gallos fueron sometidos a un estricto período de ayuno de 8 horas previo a la recolección.

La técnica de masaje dorsal se realizó siguiendo los procedimientos reportados por Moscoso *et al.* (2021). Este método de recolección de semen consistió en aplicar masajes dorsales repetitivos con la mano del operador. Al mismo tiempo, con la otra mano, se ejerció presión directa sobre la cloaca. El fluido seminal fue recogido en tubos Khan de 5ml adaptados con un sistema de mangueras de doble entrada para ejercer un vacío por aspiración.

3.5.2. Tratamientos y congelación

La recolección de semen de los 10 gallos donantes se realizó en 6 sesiones semanales. En cada sesión se conformó 2 pools de 5 eyaculados cada uno asignados aleatoriamente. Cada pool fue evaluado su concentración inicial mediante el conteo celular con una cámara de Neubauer, se diluyó inicialmente (1:1) con el diluyente Lake-Ravie y enseguida se almacenó a 5°C durante un tiempo de 30 minutos. Estas muestras diluidas fueron ajustadas a una concentración de 400×10^6 espermatozoides /mL usando el mismo diluyente Lake-Ravie enfriado a 5°C y divididas en tres alícuotas de igual volumen (2 ml). Inmediatamente, se adicionó el mismo volumen (2 ml) de un segundo diluyente a cada alícuota; el segundo diluyente está basado en Lake-Ravie + 16% glicerol y suplementado con 20 μ M de ME, 10 mM de LC y sin aditivo (control). Las diluciones finales tendrán 4 mL de medio, una concentración del 200×10^6 espermatozoides / mL, 8% de glicerol y la mitad de aditivo usados (10 μ M y 5 mM de ME y LC, respectivamente). Las muestras fueron mantenidas en frío (5°C) durante 10 minutos y entonces cargadas a pajuelas de 0,25 mL previamente enfriadas. Las pajuelas previamente rotuladas fueron selladas con alcohol de polivinilo.

La congelación se realizó en vapores de NL_2 . El sistema de congelamiento fue realizado en un sistema de congelación basado de dos rampas dentro de una caja criogénica de poliestireno de $30 \times 29 \times 31$ cm de largo, ancho y alto respectivamente, con 3,4 litros de NL_2 (hasta 4 cm de altura). El NL_2 se colocó 30 minutos antes del proceso de congelación para equilibrar (estabilizar) los vapores de NL_2 dentro de la caja criogénica. Las pajuelas fueron colocadas en la primera rampa a 17 cm por encima de la superficie de NL_2 y se expuso a los vapores de NL_2 durante 4 minutos; y luego las pajuelas fueron bajadas a la segunda rampa inferior a 1 cm del nivel del NL_2 durante 2 minutos. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas en el NL_2 para enfriarlas a -196 °C. Este sistema de congelación generó las siguientes velocidades de enfriamiento:

- Rampa 1: de 5°C a -35°C a 7°C/ minuto
- Rampa 2: de -35°C a -140°C a 60°C/minuto

Se congeló un total de 360 pajuelas proveniente de los grupos LC (n=120), ME (n=120) y control (n=120). Las descongelaciones se realizaron sumergiendo las pajuelas en agua enfriada a 5°C durante 3 minutos. El contenido fue recogido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y enseguida su calidad seminal fue evaluada.

3.5.3. Análisis de la calidad espermática

3.5.3.1 Motilidad y cinética

Las características cinéticas espermáticas de las muestras frescas y congeladas-descongeladas fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, V6.0 software, Microptic S.l., Barcelona, Spain) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo con Moscoso *et al.* (2021). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Las variables cinéticas evaluadas fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

3.5.3.2 Integridad de la membrana plasmática (viabilidad)

Para la evaluación de la membrana plasmática, se descongeló 250 μl de medio Hepes (**Tabla 2**) y yoduro de propidio (**Tabla 3**). Al medio Hepes descongelado (temperatura de cuarto) se adicionó la muestra de esperma a analizar alcanzando una concentración de 10×10^6 espermatozoides/mL.

Sin luz, se adicionó 5 μL de PI a la muestra, y entonces se cargó a un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia. La integridad de la membrana plasmática, equivalente a la viabilidad fue analizada mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.) y contando 200 células.

3.5.4 Evaluación de la fertilidad

La segunda mitad de las pajuelas (60 pajuelas / tratamiento) se usaron para inseminar artificialmente 30 gallinas criollas en 6 sesiones intercaladas cada 3 días. Las gallinas ponedoras fueron seleccionadas como fértiles con una edad entre 12 a 24 y alojadas también en jaulas individuales de 0,6 x 0,70 x 1 m de largo, ancho y alto, respectivamente, bajo un sistema de tipo intensivo. La alimentación de las gallinas fue similar a la detallada en los reproductores donantes.

En cada sesión de IA, se descongeló 10 pajuelas por tratamiento sumergiendo las pajuelas en agua a 5°C durante 3 minutos. El contenido de cada pajuela fue contenido en un tubo falcon de 15 mL y el contenido fue centrifugado a 500 gravedades durante 10 minutos. Posteriormente, el pellet fue reconstituido con diluyente Lake-Ravie a una concentración final de 400×10^6 espermatozoides / mL. Estas muestras fueron mantenidas a 5°C hasta la IA en un tiempo máximo de 10 minutos. El transporte desde el sitio de descongelación hasta el sitio de la IA (gallinero) se hizo en una nevera con hielo. El contenido espermático fue cargado en jeringuillas de 1 ml (insulina) y la IA fue realizada inoculando el contenido espermático por vía cloacal con asepsia previa. En la inoculación fue depositado 0,20 mL por cada gallina. Los huevos fueron recolectados 3 días después de la primera inseminación hasta tres días después de la última inseminación. Los huevos recolectados en 3 días consecutivos fueron colocados en la incubadora por 7 días. Después de este plazo se observó en un ovoscopio cada uno de los huevos para determinar su fertilidad al encontrar estructuras anatómicas formadas.

3.6 Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente analizados estadísticamente en un software STATISTICA versión 12.0. Los datos fueron expresados en media \pm SEM (error estándar de la media). Cada variable paramétrica fue sometida a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la distribución normal de datos. En caso de que los datos no cumplieran una distribución normal, las variables porcentuales fueron convertidas al *Arcoseno* y las variables numéricas fueron transformadas al *Log-10*.

El análisis estadístico incluyó un modelo lineal general (GLM) para evaluar el efecto de los tratamientos LC, ME y control sobre las variables de calidad espermática y fertilidad. Para este

propósito, se usó un ANOVA unidireccional y la prueba Post Hoc de Tukey 5%. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de $P < 0.05$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Variables cinéticas

En general, a excepción de los parámetros de relación de progresividad (STR, LIN y WOB), los valores de las variables cinéticas como las motilidades (MT y MP), velocidades (VCL, VAP y VSL), la ALH y BCF disminuyeron ($P < 0,05$) después del proceso de criopreservación en comparación con sus valores en fresco.

La MT post-descongelación no varió significativamente entre tratamientos ($P > 0,05$). Además, sólo las muestras congeladas con LC no mostraron una disminución significativa de la MT con respecto a su valor en fresco ($P > 0,05$). Por otro lado, la MP después de la congelación con LC produjo porcentajes más altos ($P < 0,05$) que su contraparte control (**Figura 2**).

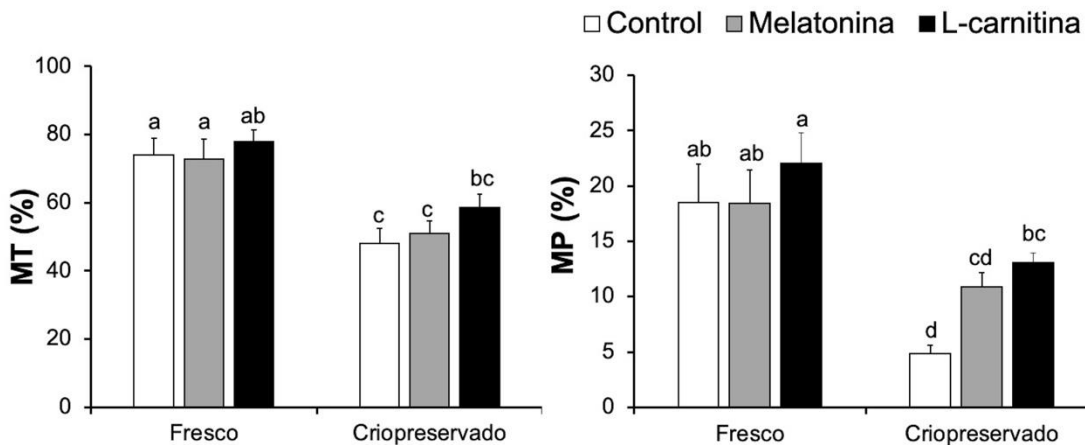


Figura 2. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) post-descongelación de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos ($a - b - c - d$, $P < 0,05$).

No se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) de todas las velocidades entre tratamientos después de la descongelación. Las muestras criopreservadas con LC mostraron ciertas ventajas comparados con los otros tratamientos, al no evidenciar diferencias significativas ($P > 0,05$) frente a los valores de VCL, VAP y VSL en fresco y diluidas con ME y las muestras descongeladas de LC (**Figura 3**).

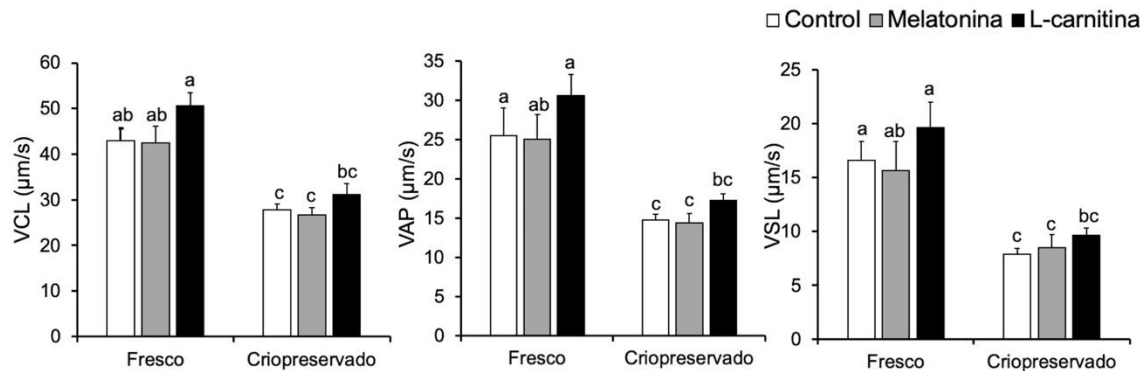


Figura 3. Velocidades curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos ($a - b - c$, $P < 0,05$).

No se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) de los parámetros de relación de progresividad, ni entre muestras frescas y criopreservadas, ni entre tratamientos (**Figura 4**).

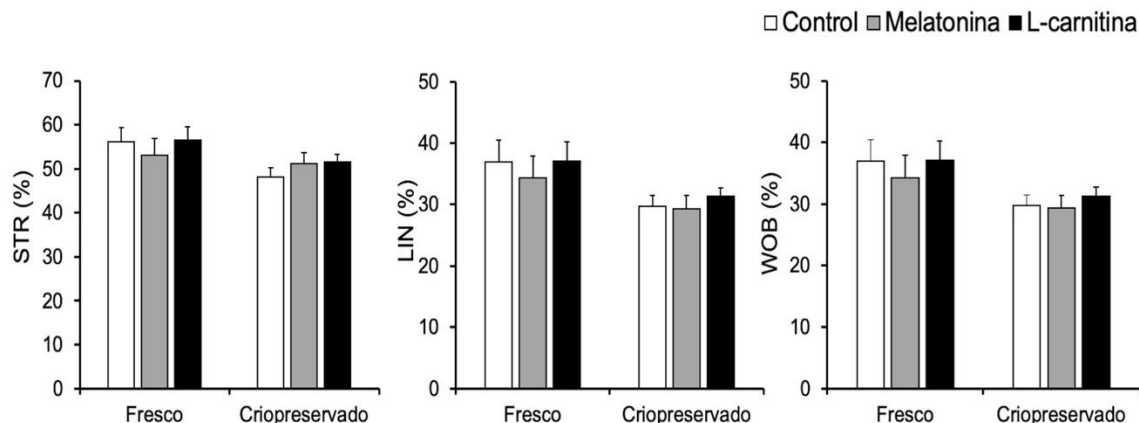


Figura 4. Parámetros de relación de progresividad, rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control.

Asimismo, no se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) de los valores de ALH y BCF entre tratamientos después de la descongelación. Sin embargo, las muestras criopreservadas con LC mostraron ventajas con respecto a los otros tratamientos (control y ME) al no evidenciar diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los valores de ALH en fresco diluidas con ME y control y las muestras descongeladas de LC (**Figura 5**).

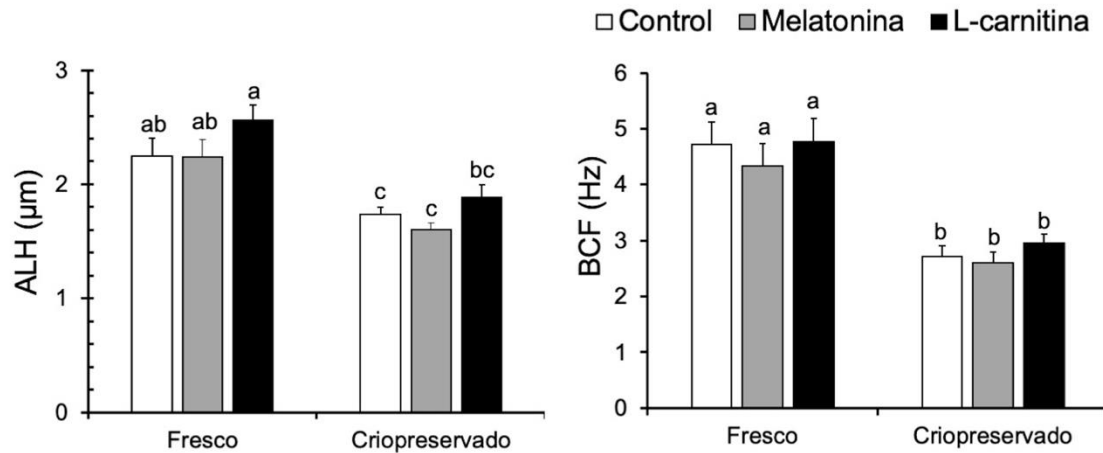


Figura 5. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de muestras frescas y criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos ($a - b - c$, $P < 0,05$).

4.2 Integridad de membrana plasmática

Las muestras criopreservadas con LC y ME mostraron un mayor porcentaje ($P < 0,05$) de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (equivalente a la viabilidad) en comparación con su contraparte control ($44,1 \pm 1,95$ y $42,0 \pm 1,90$ vs. $34,6 \pm 1,90$, respectivamente) (**Figura 6**).

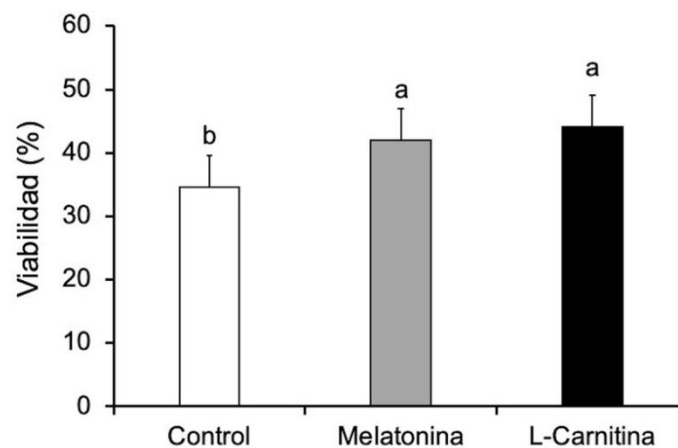


Figura 6. Integridad de la membrana plasmática (viabilidad) de muestras criopreservadas con LC, ME y control. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos ($a - b$, $P < 0,05$).

4.3 Fertilidad

Las muestras criopreservadas con LC mostraron un mayor porcentaje ($P < 0,05$) de fertilidad después de una IA en comparación las muestras criopreservadas control y ME ($17,8 \pm 4,05$ vs $3,6 \pm 2,06$ y $6,9 \pm 2,52$, respectivamente (**Figura 7**).

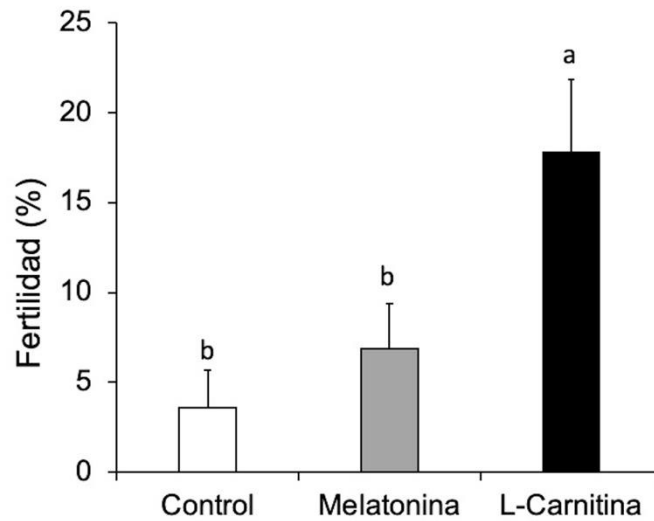


Figura 7. Fertilidad lograda con de muestras criopreservadas con LC, ME y control después de una inseminación artificial. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad indica diferencias significativas entre tratamientos ($a - b$, $P < 0,05$).

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Los diluyentes que se usan para refrigerar o congelar espermatozoides de aves deben complementarse con antioxidantes (Çiftci and Aygün, 2018) como la melatonina (Mehaisen *et al.*, 2020; Appiah *et al.*, 2019) o L-carnitina (Fattah *et al.*, 2017; Partyka *et al.*, 2017; Tabatabaei and Aghaei, 2012) para mitigar y superar los efectos nocivos de la criopreservación como la LPO que sufre la membrana espermática durante la criopreservación. En respuesta a esta a suplementación, las muestras espermáticas mejoran la motilidad, viabilidad y estabilidad de la membrana plasmática después de la descongelación (Çiftci and Aygün, 2018). Esta investigación demostró que el uso de los aditivos-antioxidantes ME y LC suplementados a un medio de congelación sintético (*Lake-Ravie*) mejoró la criosupervivencia de los espermatozoides del gallo criollo. La ME incrementó únicamente la integridad de la membrana plasmática, mientras la LC incrementó la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática y la fertilidad del espermatozoides congelado–descongelado de gallo criollo.

Estudios anteriores han demostrado que el semen de gallo suplementado con ME (10^{-3} M y 10^{-6} M) produjo un incremento significativo de la de motilidad total en comparación con su grupo control (34,6% frente a 25,3%, respectivamente) (Mehaisen *et al.*, 2020). Otros autores demostraron que la suplementación de 0,25 mg/ml y 0,5 mg/mL de ME al medio de congelación mejoró la motilidad total en comparación con su contraparte control ($39,7 \pm 1,20\%$ y $37,3 \pm 1,45\%$ frente a $32,3 \pm 0,88\%$, respectivamente) (Appiah *et al.*, 2019). Asimismo, la suplementación de 10^{-3} M y 10^{-6} M de ME al medio de congelación proporcionó un efecto crioprotector a los espermatozoides criopreservados de gallo a obtener una mayor integridad de la membrana plasmática en comparación con su muestra control (30,3% y 32,5% frente a 23,7%, respectivamente) (Mehaisen *et al.*, 2020). En este mismo sentido, Appiah *et al.* (2019) demostraron que la adición de 0,25 mg/mL y 0,5 mg/mL de ME al diluyente produjo una mayor integridad de la membrana plasmática posterior a la congelación–descongelación frente a su control ($49,1 \pm 0,69\%$ y $47,9 \pm 1,06\%$ frente a $43,2 \pm 1,07\%$). En la presente investigación, la adición de ME al medio de congelación no produjo un mejoramiento de la motilidad total en comparación con el control aunque los valores fueron superiores porcentualmente ($50,9 \pm 3,71\%$). Sin embargo, los resultados post-descongelación del presente estudio concerniente a la integridad de la membrana plasmática son consistentes a los reportados por Appiah *et al.* (2019 y Mehaisen *et al.*, (2020).

La ME cumple funciones homeostáticas mitocondriales siendo capaz de reducir el consumo de oxígeno, en consecuencia, la producción de ROS mientras mantiene la actividad del sistema de fosforilación oxidativa y la producción de ATP (López *et al.*, 2009) mediante la eliminación de radicales libres (Reiter *et al.*, 2009). Appiah *et al.* (2019) fueron pioneros en describir que la ME ejerce múltiples propiedades (entre ellas antioxidante) en el espermatozoides de gallo criopreservado. La respuesta benéfica de la ME ha sido denotada en un aumento la motilidad espermática y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal debido al aumento de la activación antioxidante de las enzimas con la eliminación efectiva de la generación de ROS y reducción del estrés oxidativo durante el proceso de crioconservación. Mehaisen *et al.* (2020), determinaron un rol crioprotector de la ME basado en una mayor integridad de la membrana plasmática, actividad mitocondrial y disminución de la peroxidación lipídica y fragmentación del ADN de los espermatozoides del gallo. Esto favoreció a pequeños cambios, similares a los de la apoptosis y a una mayor motilidad de los espermatozoides después de la descongelación (Li *et al.*, 2012).

Por otro lado, la LC mejoró la motilidad progresiva, viabilidad y fertilidad del espermatozoides de gallo criollo después del proceso de congelación–descongelación. Algunos estudios previos demostraron además el efecto benéfico de la LC. Fattah *et al.* (2017b) intentaron mejorar la eficacia del diluyente BPSE mediante la suplementación de LC al diluyente de semen de gallo, y justificaron de esta inclusión que la mejora de las funciones metabólicas y antioxidantes fue gracias a la LC. Las propiedades antioxidantes de LC incluyen la eliminación de radicales libres, la destrucción del peróxido de hidrógeno y la quelación de metales. La LC también tiene funciones en la preservación de la integridad de la membrana, la función mitocondrial y la inhibición de la apoptosis (Surai, 2015). La suplementación con 1 y 2 mM de LC dio como resultado una mayor motilidad, viabilidad y funciones de membrana de los espermatozoides, así como una menor peroxidación lipídica después de 24 y 48 h de refrigeración (a 5°C). Además, la inclusión a estas concentraciones de LC condujo a una mayor fertilidad del espermatozoides refrigerado durante 24 h de gallo después de una IA (Fattah *et al.*, 2017a). En este mismo sentido, Partyka *et al.* (2017) demostraron que la adición de 1mM de LC al diluyente de congelación protege a los espermatozoides de gallo contra la apoptosis, la LPO y la fragmentación del ADN y aumenta el potencial mitocondrial. Estos resultados son consistentes a los obtenidos en la presente

investigación al obtener un incremento de la membrana plasmática después del proceso de criopreservación con LC.

Se ha planteado que las mitocondrias suministran la energía necesaria para la motilidad de los espermatozoides (Peña *et al.*, 2009). Fattah *et al.* (2017b) evaluaron espermatozoides de gallo congelados y descongelados y demostraron que el porcentaje de actividad mitocondrial de los espermatozoides no se vio afectado por LC. Si bien, aquellos autores esperaron una relación lógica entre la motilidad de los espermatozoides y la actividad mitocondrial, ellos observaron una respuesta relativamente independiente en la actividad mitocondrial del parámetro de motilidad. Este hecho ha sido demostrado por otros investigadores (Martínez-Pastor *et al.*, 2008) sugiriendo que las características de movimiento de los espermatozoides son independientes de la actividad mitocondrial (Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Zanganeh *et al.*, 2013). En el presente estudio, la actividad mitocondrial no fue evaluada sin embargo, el incremento de la motilidad progresiva junto con la tendencia del incremento de las motilidades seguido de una mejora en la viabilidad y fertilidad, nosotros podemos especular que la LC facilitó el ingreso de Iso ácidos grasos (de cadena corte media y larga) hacia la mitocondria para una mejor producción de ATP como ha sido demostrado previamente por otros investigadores en otras especies domésticas (Fattah *et al.*, 2017a,b; Martínez-Pastor *et al.*, 2008).

Fattah *et al.* (2017b), obtuvieron mayores tasas significativas de fertilidad y eclosión con la adición de 1mM de LC (78 y 69%) y 2 mM 2mM (80 y 73%) usando semen refrigerado en comparación con el grupo control (64 y 56%). En nuestra investigación, sin embargo, obtuvimos una tasa significativa del $17,8 \pm 4,05$ % de fertilidad con una dosis de 10mM de LC comparado con un $3,6 \pm 2,06$ % del grupo control usando el semen congelado y descongelado. No obstante, debe recordarse que numerosos factores como la naturaleza de la gallina, la técnica utilizada, el número de espermatozoides, los factores ambientales, la profundidad de la deposición del semen y la frecuencia de la inseminación pueden afectar la tasa de fertilidad después de la inseminación artificial (Chalah *et al.*, 2009; Lake and Ravie, 1984; Tselutin *et al.*, 1999).

La LC ha demostrado ser eficaz en la protección del espermatozo del gallo contra la apoptosis, la pérdida de actividad mitocondrial y la fragmentación del ADN (Partyka *et al.*, 2017); así como un mejoramiento de la capacidad fecundante en condiciones de refrigeración (Fattah *et al.*, 2017b).

La adición de LC al diluyente de esperma de gallo preserva la calidad del semen refrigerado al respaldar el potencial activo mitocondrial mientras reduce la cantidad de peroxidación lipídica.

Tanto para Appiah *et al.*, (2019) y Fattah *et al.* (2017a), sugiere que se deben realizar más estudios para evaluar los efectos de estos antioxidantes de la ME y LC sobre los parámetros de fertilidad. En este estudio, se realizó la evaluación de fertilidad usando semen criopreservado con ME y LC y se demostró que la fertilidad fue significativamente mayor con la LC en comparación al ME y grupo control. Por lo tanto, este estudio sugiere que la LC mejora la criosupervivencia de espermatozoides de gallo basado en un incremento de la locomoción, integridad de membrana plasmática y fertilidad después de IA.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

La suplementación del medio de congelación con los antioxidantes melatonina y L-carnitina al medio de congelación de semen de gallos criollos mejoró la criosupervivencia espermática. Eficazmente, la L-carnitina produjo un efecto tanto estimulador de la locomoción como crioprotector al incrementar la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática y la fertilidad después del proceso de congelación y descongelación. Sin embargo, la melatonina únicamente mejoró la integridad de la membrana plasmática posterior a la criopreservación.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

- El uso de otro crioprotector como el DMF en lugar del glicerol.
- Al momento de mezclar diluyente, semen y antioxidante, se debe tener cuidado especial en mezclar glicerol de manera lenta, ya que al mezclar de manera brusca aumenta la mortalidad.
- Todo el proceso de criopreservación se debe realizar de manera rápida controlando los protocolos con tiempos, de manera que haya menos mortalidad espermática.
- Durante el proceso de criopreservación, en la parte de la congelación desechar cualquier pajuela que cayó al piso o de la rampa al nitrógeno, ya que de no hacerlo esto provocará la muerte de los espermatozoides por choque térmico y afectará posteriormente en los resultados.
- Además, se recomienda, rotular claramente las pajuelas en caso de ser posible con colores para poder distinguirlo por tratamientos.
- Al momento de la inseminación se debe tener especial cuidado con las gallinas, induciendo el menor estrés posible, evitando dañar o lesionar los tejidos blandos de la gallina.
- Se debe tener un protocolo y horarios de alimentación de los animales en experimentación.
- Todo el proceso se debe realizar en una cámara de refrigeración a 5⁰C para evitar la mortalidad de los espermatozoides del ave.
- Evitar que personas ajenas a la investigación ingresen al galpón, esto disminuye la tasa de puesta de huevos.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS

- Aitken, J., Clarkson, J., and Fishel, S. (1989). Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. *Biology of Reproduction*, 41(1), 183–197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.1.183>
- Agarwal, A., and Anandh, P. (2005). Oxidative stress and antioxidants in male infertility: A difficult balance. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. https://www.researchgate.net/publication/26453661_Oxidative_stress_and_antioxidants_in_male_infertility_A_difficult_balance
- Akers, M., & Denbow, M. (2013). *Anatomy & Physiology of Domestic Animals* (Segunda). Wiley-Blackwell.
- Alderson, G. (2018). Conservation of breeds and maintenance of biodiversity: justification and methodology for the conservation of Animal Genetic Resources. *Archivos de Zootecnia*, 67(257), 35–39.
- Alvarez, J. G., and Storey, B. T. (1982). Spontaneous Lipid Peroxidation in Rabbit Epididymal Spermatozoa: Its Effect on Sperm Motility. *Biology of Reproduction*, 27(5), 1102–1108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1102>
- Amores, C. E. (2016). *Determinación de la viabilidad financiera de la producción avícola mediante la utilización de planteles de crianza de pollo de engorde en la región oriental del Ecuador*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/11617>
- Ansari, M., Rakha, B., Akhter, S., Blesbois, E., and Santiago-Moreno, J. (2019). Effect of cryopreservation on lipid peroxidation, antioxidant potential, chromatin integrity, and mitochondrial activity of indian red jungle fowl (*Gallus murghi*) Semen. *Biopreservation and Biobanking*, 17(4), 288–295. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0111>
- Appiah, M. O., He, B., Lu, W., & Wang, J. (2019). Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen. *Cryobiology*, 89(December 2018), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.05.001>
- Bakst, M.R., Howarth, B. (1977). Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock sperm in vitro. *Biol. Reprod.* 17, 370e379.

- Bellairs, R., & Osmond, M. (2015). *The Atlas of Chick Development* (Tercera). Elsevier.
- Blesbois, E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63(2), 213–222. <https://doi.org/10.1017/S0043933907001419>
- Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., and Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66(4), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.022>
- Çiftci, H. B., & Aygün, A. (2018). Poultry semen cryopreservation technologies. *World's Poultry Science Journal*, 74(4), 699–709. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000673>
- Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E., & Brillard, J. P. (1999). In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39(2), 185-191.
- Chousalkar, K.K., Roberts, J.R. (2008). Ultrastructural changes in the oviduct of the laying hen during the laying cycle. *Cell Tissue Res*. 332 (2), 349e358
- Donoghue, A., and Donoghue, D. (1997). Effects of Water- and Lipid-Soluble Antioxidants on Turkey Sperm Viability, Membrane Integrity, and Motility during Liquid Storage. *Poultry Science*, 76(10), 1440–1445. <https://doi.org/10.1093/ps/76.10.1440>
- Dumpala, P. R., Parker, H. M., and Mcdaniel, C. D. (2006). The Effect of Semen Storage Temperature and Diluent Type on the Sperm Quality Index of Broiler Breeder Semen 1,2. *International Journal of Poultry Science*, 5(9), 838–845.
- Ehling, C., Taylor, U., Baulain, U., Weigend, S., Henning, M., & Rath, D. (2012). Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agric. For. Res*, 62, 151-158.
- Etches, R. J. (1990). The ovulatory cycle of the hen. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2(4), 293-318. Recuperado de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910188196>
- FAO. (2016). *Sustainable agricultural development for food security and nutrition: what roles for livestock? A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security*. July, 140. <http://www.fao.org/3/a-i5795e.pdf>

- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., & Esmaeili, V. (2017a). L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology*, *74*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.011>
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017b). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, *74*, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.009>
- Francesch, A. (1994). Inseminación artificial de gallinas. *Arte Avícola*. <https://core.ac.uk/download/pdf/33161531.pdf>
- Froman, D. P., Kirby, J. D., & Proudman, J. A. (2016). Reproduction in Poultry: Male and Female. *Reproduction in Farm Animals*, *6*, 237–257. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch16>
- Fujihara, N., and Howarth, B. (1978). Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poultry Science*, *57*(6), 1766–1768. <https://doi.org/10.3382/ps.0571766>
- Gilbert, A.B., 1971. The egg: its physical and chemical aspects. In: Bell, D.J., Freeman, B.M. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, vol. 3. Academic Press, London and New York, pp. 1379e1399. Recuperado de: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950400964286720>
- Guioli, S., Nandi, S., Zhao, D., Burgess-Shannon, J., Lovell-Badge, R., Clinton, M. (2014). Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sex. Dev.* *8* (5), 227e242.
- Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A.B., McKee, M.D., 2012. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.* *17*, 1266e1280. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22201802/>
- Joost, S., and Bruford, M. W. (2015). Editorial: Advances in Farm Animal Genomic Resources. *Frontiers in Genetics*, *6*(NOV), 333. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00333>
- Jeulin, C. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, *2*(2), 87–102. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.2.87>

- Jung, J. G., Lim, W., Park, T. S., Kim, J. N., Han, B. K., Song, G., & Han, J. Y. (2011). Structural and histological characterization of oviductal magnum and lectin-binding patterns in *Gallus domesticus*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 1-11. Recuperado de: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-9-62>
- Khan, R. (2011). Antioxidants and poultry semen quality. In *World's Poultry Science Journal* (Vol. 67, Issue 2, pp. 297–308). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000316>
- Konig, H., Korbel, R., & Liebich, H. G. (2016). *Avian Anatomy Textbook and Colour Atlas* (Segunda). 5M Publishing Ltd.
- Kuroiwa, A. (2017). Sex-determining mechanism in avians. In *Avian Reproduction* (pp. 19-31). Springer, Singapore.
- Lake, P. E., & Ravie, O. (1984). An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25(1), 145-150.
- Lamirande, E. De, and Gagnon, C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(1), 21–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01148.x>
- Li, X. X., Yang, X. G., Lu, Y. Q., Lu, S. S., Zhang, M., Yao, H. L., Meng, L. J., & Lu, K. H. (2012). Protective Effects of Melatonin against Oxidative Stress in Flow Cytometry-sorted Buffalo Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 299–307. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01858.x>
- Li, D., Tsutsui, K., Muneoka, Y., Minakata, H., Nomoto, K., 1996. An oviposition-inducing peptide: isolation, localization, and function of avian galanin in the quail oviduct. *Endocrinology* 137 (5), 1618e1626. Recuperado de: <https://academic.oup.com/endo/article/137/5/1618/3037669?login=false>
- Liu, J., Wang, W., Feng, Y., Li, M., Bao, H., Chen, Q. (2007). The sympathetic postganglionic and sensory innervation of oviducal magnum in hen: a cholera toxin subunit B-conjugated horseradish peroxidase study. *J. Anat.* 210 (4), 439e448
- López, A., García, J. A., Escames, G., Venegas, C., Ortiz, F., López, L. C., & Acuña-Castroviejo,

- D. (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *Journal of Pineal Research*, 46(2), 188–198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x>
- Leon, J., Acuña-Castroviejo, D., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. In *Life Sciences* (Vol. 75, Issue 7, pp. 765–790). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.003>
- Mara, L., Casu, S., Carta, A., and Dattena, M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 138, Issues 1–2, pp. 25–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.006>
- Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Del Olmo, E., Domínguez-Rebolledo, A. E., Estes, M. C., Montoro, V., & Garde, J. J. (2008). Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(5), 547-556.
- Martínez-Pastor, F., Del Rocío Fernández-Santos, M., Domínguez-Rebolledo, Á. E., Estes, M. C., Garde, J. J., & Biology of Reproduction Group. (2009). DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reproduction in domestic animals*, 44(3), 424-431.
- Moscoso, A., Muñoz, M., Argudo, D., Samaniego, J., Maldonado, M., Cabrera, B., Alvarado, J.C., Galarza, D.A. Comparison of characterization of fighting rooster (*Gallus gallus*) semen ejaculates recovered by electroejaculation and dorsal massage techniques. *Spermova*. 2021; 11(1): 32-38
- Mehaisen, G. M. K., Partyka, A., Ligocka, Z., & Nizański, W. (2020). Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106238>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2021). Código Sanitario para los Animales Terrestres, Bienestar de los animales. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/>
- Santuago-Moreno, Estes, M., Villaverde, S., Toledano, A., Castaño, C., Velázquez, R., López,

- A., Goya, A., and Martínez, J. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 882–888. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.188660>
- Santiago-Moreno, J., and Galarza, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(1).
- Partyka, A., Łukaszewicz, E., and Nizański, W. (2012). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134(3–4), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.007>
- Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., & Nizański, W. (2017). The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7279341>
- Parks, J., and Lynch, D. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255–266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)
- Peña, F. J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., & Macias Garcia, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345-349.
- Rakha, B. A., Ansari, M. S., Akhter, S., Zafar, Z., Naseer, A., Hussain, I., Santiago-Moreno, J., and Blesbois, E. (2017). Dimethyleacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology*, 103, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.018>
- Reece, W., & Rowe, E. (2017). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Wiley-Blackwell.
- Reiter, R. J., Paredes, S. D., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2009). Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin melatonin as an antioxidant R. J. Reiter *et al. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(4), 175–200. <https://doi.org/10.1080/10409230903044914>

- Salehi, M., Mahdavi, A. H., Sharafi, M., and Shahverdi, A. (2020). Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. *Theriogenology*, 142, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>
- Scanes, C., & Dridi, S. (2022). *Sturkie's Avian Physiology* (Septima). Elsevier Inc.
- Sikka, S., Rajasekaran, M., and Hellstrom, W. (1995). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. In *Journal of Androl*
- Srivastava, R., Cornett, L.E., Chaturvedi, C.M., 2010. Age-dependent expression of AVT and its oxytocic-like receptor VT3 in the shell gland of Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165 (1), 47e52. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648009002329>
- Surai. (2015). Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications. In *VETERINARY SCIENCE*.
- Surai, P. F., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J. P., Wishart, G. J., Cerolini, S., and Sparks, N. H. C. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 120(3), 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10039-1](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10039-1)
- Svoradová, A., Kuželová, L., Vašíček, J., Olexíková, L., and Chrenek, P. (2018). Cryopreservation of chicken blastodermal cells and their quality assessment by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Biotechnology Progress*, 34(3), 778–783. <https://doi.org/10.1002/btpr.2615>
- Tabatabaei, S., & Aghaei, A. (2012). Effect of l-carnitine on sperm quality during liquid storage of chicken semen. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 711–717. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1163-6>
- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., Mayo, J., Kohen, R., Allegra, M., and Hardelan, R. (2005). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–197. <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>

- Tene, J. R. (2014). *Utilización de bioestimulantes en la producción de semen de gallos e inseminación artificial en gallinas criollas* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3806>
- Toalombo, P. A. (2020). *Caracterización morfológica, productiva y genética de la gallina criolla del Ecuador*. Universidad de Córdoba, UCOPress. <https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>
- Tselutin, K., Seigneurin, F., & Blesbois, E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry science*, 78(4), 586-590.
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M. M., & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. *Small Ruminant Research*, 114(1), 120-125.
- Zaniboni, L., Rizzi, R., and Cerolini, S. (2006). Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. *Theriogenology*, 65(9), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.013>

CAPÍTULO 9: ANEXOS

Anexo 1. Resultados de las variables cinéticas de los espermatozoides de gallo criollo. *MT* (motilidad total), *MP* (motilidad progresiva), *VCL* (velocidad curvilínea), *VAP* (velocidad promedio), *VSL* (velocidad rectilínea), *STR* (rectitud), *LIN* (linealidad), *WOB* (oscilación), *ALH* (desplazamiento lateral de la cabeza), *BCF* (frecuencia de batida del flagelo).

| Parámetros | Fresco | | | Congelado / descongelado | | |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | Control | Melatonina | L-carnitina | Control | Melatonina | L-carnitina |
| MT (%) | 74,0 ± 4,94 | 72,7 ± 6,06 | 77,9 ± 3,47 | 48,0 ± 4,40 | 50,9 ± 3,71 | 58,5 ± 3,88 |
| MP (%) | 18,5 ± 3,47 | 18,4 ± 3,08 | 22,0 ± 2,74 | 4,9 ± 0,70 | 10,9 ± 1,25 | 13,1 ± 0,82 |
| VCL (µm/s) | 42,9 ± 2,81 | 42,5 ± 3,70 | 50,6 ± 2,83 | 27,8 ± 1,22 | 26,7 ± 1,55 | 31,2 ± 2,35 |
| VAP (µm/s) | 25,5 ± 1,89 | 25,1 ± 2,86 | 30,6 ± 2,36 | 14,8 ± 0,83 | 14,3 ± 1,27 | 17,2 ± 1,27 |
| VSL (µm/s) | 16,6 ± 1,80 | 15,7 ± 2,68 | 19,6 ± 2,39 | 7,9 ± 0,55 | 8,5 ± 1,21 | 9,6 ± 0,71 |
| STR (%) | 56,2 ± 3,24 | 53,2 ± 3,67 | 56,5 ± 3,07 | 48,1 ± 2,10 | 51,1 ± 2,50 | 51,6 ± 1,57 |
| LIN (%) | 37,0 ± 3,43 | 34,3 ± 3,66 | 37,1 ± 3,18 | 29,7 ± 1,75 | 29,4 ± 2,08 | 31,3 ± 1,45 |
| WOB (%) | 58,4 ± 2,47 | 56,8 ± 2,88 | 59,7 ± 2,18 | 53,8 ± 1,89 | 51,3 ± 2,25 | 54,8 ± 1,50 |
| ALH (µm) | 2,24 ± 0,16 | 2,24 ± 0,15 | 2,56 ± 0,13 | 1,74 ± 0,06 | 1,60 ± 0,06 | 1,89 ± 0,11 |
| BCF (Hz) | 4,72 ± 0,41 | 4,33 ± 0,41 | 4,78 ± 0,42 | 2,72 ± 0,19 | 2,60 ± 0,10 | 2,95 ± 1,17 |

Anexo 2. Fotografías del trabajo de campo, en orden cronológico desde la extracción y análisis de semen, posteriormente la inseminación artificial en gallinas.



Fotografía 1: Aprendizaje del masaje dorsal, en el laboratorio de reproducción Irquis. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 2: Aprendizaje del masaje dorsal. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 3: Práctica del masaje dorsal. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 4: semen extraído de 10 gallos, luego de un mes de prácticas. **Fuente:** Los autores.



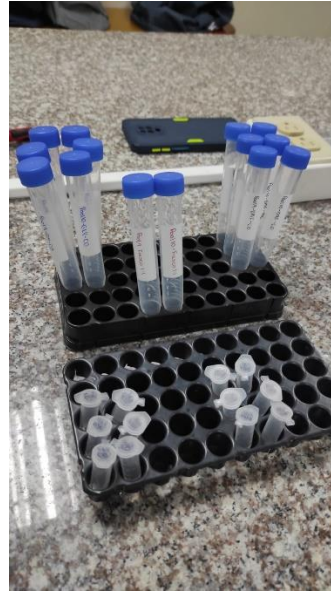
Fotografía 5: Elaboración de diluyente. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 6: Gallos del experimento. **Fuente:** Los autores.



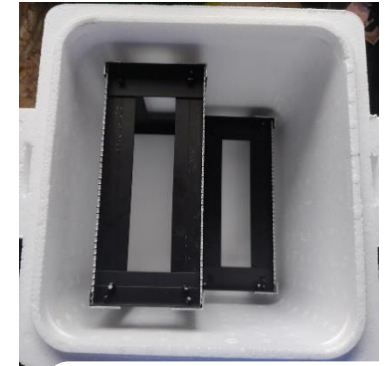
Fotografía 7: Preparación de materiales y reactivos previo a la congelación. **Fuente:** Los autores.



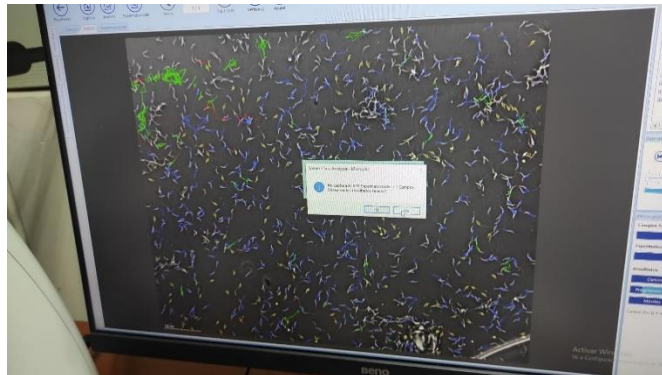
Fotografía 8: Preparación diluyente, semen y antioxidantes. **Fuente:** Los autores.



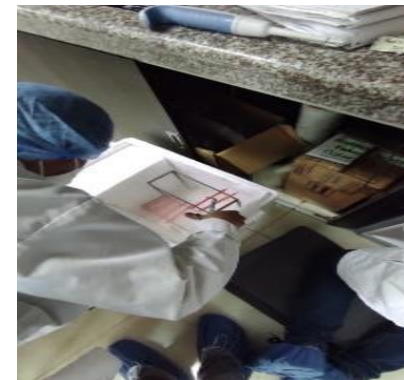
Fotografía 9: Mezcla de semen diluido y glicerol, antes de empajuelar. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 10: Diseño de una gradilla y caja de polietileno. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 11: Sistema CASA se visualiza espera de gallos. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 12: Empajuelado. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 13: Jaulas de las gallinas ponedoras, etiquetadas. **Fuente:** Los



Fotografía 14: Jaulas de las gallinas ponedoras. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 15: Preparación de materiales y laboratorio previo a la descongelación, para la posterior inseminación artificial **Fuente:**



Fotografía 16: Descongelación de pajuellas. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 17: Inseminación artificial **Fuente:** Los autores.



Fotografía 18: calentadores previos al ingreso de los huevos a la incubadora.
Fuente: Los autores.



Fotografía 19: Incubadora con los huevos del tratamiento.
Fuente: Los autores.



Fotografía 20: Huevos fertilizados vistos al ovoscopio. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 21: huevos fértiles, se observa embrión alantoides, amnios, yema y albumina. **Fuente:** Los autores.

