

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE GALLO

Prestador del servicio social:

Asael Salazar Rodríguez

Matrícula: 2163024326



Asesor interno:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Nº Eco. 25416



Asesor interno.

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

N.E.: 26809

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco.

Fecha de inicio y de terminación: Del 15 de abril al 15 de octubre de 2023

INDICE**Página**

1. INTRODUCCIÓN
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.
3. MARCO TEORICO
4. JUSTIFICACION.
5. OBJETIVOS
6. METAS COMPLETADAS.
7. MATERIAL Y MÉTODOS
8. RESULTADOS y DISCUSION
9. CONCLUSIÓN
10. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCIÓN

Las aves son animales vertebrados bastante complejos y como tales se reproducen sexualmente. Son ovíparas y destacan por tener comportamientos y rituales alrededor de la reproducción. Las aves cuentan con sexos separados y la fecundación siempre es interna. A diferencia de otros animales, no disponen de órganos reproductores externos por lo que la fecundación tiene lugar a través del contacto entre las cloacas del macho y la hembra de manera natural (Gil, 2016).

La práctica de la inseminación artificial (IA) se está difundiendo cada vez más en el sector avícola, permitiendo alcanzar niveles productivos que no podrían conseguirse sin ella y optimizar el trabajo del personal de la explotación. La inseminación artificial de las aves domésticas constituye hoy en día uno de los medios más eficientes y de vital importancia para la producción, en los aspectos económicos y comerciales del pollo de engorda y de las gallinas ponedoras (Giavarini, 1991).

Una de las grandes ventajas de la IA es hacer posible la fecundación entre individuos en los que, debido a su peso corporal, conformación y características económicas se hace difícil, por no decir imposible la inseminación natural y por lo tanto hay menos eficiencia en la producción. Por otra parte, también podemos reducir el número de machos necesarios para la inseminación de un elevado número de hembras, sin correr el peligro de disminuir la fertilidad. Con la inseminación natural un gallo puede fecundar, en el transcurso de una semana, aproximadamente 10 hembras, mientras que con la artificial puede fecundar de 100 a 150 hembras (Giavarini, 1991).

El éxito de la IA depende tanto del empleo de técnicas adecuadas relativas a la recogida y a la conservación del semen, como de unas óptimas condiciones de explotación y de alimentación de los reproductores, como también de las bases genéticas de machos que se tienen a disposición para obtener descendencia de buena calidad genética que cumpla con los parámetros de producción deseados en la granja.

El porcentaje de fertilidad en gran mayoría depende de la manera en que se realiza una adecuada crioconservación del semen, es por ello que esta investigación se tiene como objetivo evaluar la capacidad fertilizante del semen criopreservado del gallo (*gallus gallus*).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La inseminación artificial de las aves domésticas constituye hoy en día uno de los medios más eficientes y de vital importancia para la producción, en los aspectos económicos y comerciales, de la carne de ave, por lo tanto, como médico veterinario se tiene la responsabilidad de implementar métodos de reproducción efectivos para una mayor eficiencia productiva. Siendo así la IA la técnica por excelencia para maximizar la producción y mantener la estirpe genética.

Las investigaciones sobre el manejo reproductivo de las aves domésticas tienen su origen en los años treinta, siendo la IA uno de los métodos más funcionales y efectivos en cuanto a la producción en gran escala de pollos y en cuanto a la preservación de estirpes genéticas de aves domésticas (gallinas). Por lo tanto, para la implementación, el semen tiene que ser diluido en diluyentes específicos que mantengan la viabilidad y aseguren la funcionalidad de los espermatozoides en condiciones in vitro, así mismo la realización de la técnica de inseminación debe de ejecutarse de una manera adecuada para tener alto porcentaje de fertilidad (Mocé et al., 2010); Además, cabe mencionar que la implementación de la IA es una manera más funcional de producción para las grandes granjas productoras y es por ello que realizando un buen manejo espermático y una buena realización de inseminación se pueden tener altos porcentajes de fertilidad y así mismo disminuir los costos y tiempos de producción.

3. MARCO TEORICO

En la actualidad la avicultura no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida. Esto incluye la inseminación artificial, con semen fresco, diluido o criopreservado, y la fertilización in vitro de óvulos (Herrera et al., 2005).

Inseminación artificial en gallinas

La inseminación artificial (IA) se considera una herramienta valiosa para la industria avícola (Benoff et al., 1981) debido a la utilización más eficiente de los machos, lo que no es posible en condiciones naturales de apareamiento. Esto disminuye el costo de la producción avícola directamente al reducir el número de gallos necesarios para la producción de gametos masculinos (Benoff et al., 1981).

La IA es la primera herramienta biotecnológica que se introdujo en la producción avícola para aumentar mayor eficiencia reproductiva, ya que permite un uso más amplio de machos genéticamente superiores con alto rendimiento productivo (Bramwell, 2021).

El uso de IA en gallinas, puede mejorar la fertilidad; sin embargo, la IA a gran escala suele ser un impedimento para la realización de esta técnica reproductiva. Sin embargo, a medida que la gestión de reproductoras comerciales de pollos de engorde para maximizar la fertilidad se vuelve más desafiante, el uso de IA en operaciones avícolas comerciales se está volviendo más común y es probable que continúe. A medida que el costo de la inseminación artificial sea económicamente más favorable día a día, aumentará su implementación comercial ([Bramwell, 2023](#))

Además, la IA se usa de manera rutinaria en trabajos de mejoramiento genético con fines de investigación y preservación de estirpes. La IA consiste en la transferencia manual de semen a la vagina de la gallina, mediante una metodología no invasiva y específica para la correcta fertilización (Donoghue et al., 2000).

Fertilización *in vitro*

La fertilización *in vitro* se define como la técnica de reproducción asistida que involucra fecundación extracorpórea. La técnica consiste en una manipulación del ovulo del huevo de la gallina controlada para observar la interacción de los gametos del gallo y la gallina. Esos ovocitos serán fertilizados en el laboratorio (“*in vitro*”) y, posteriormente, se observará si hay penetración *in vitro* de proteínas en la membrana perivitelina (Bagnarello, 2021; Lemoine *et al.*, 2008). Existen diversos factores que pueden disminuir la capacidad fertilizante del esperma y por lo tanto no tener la capacidad de atravesar la membrana perivitelina, uno de ellos es la viabilidad espermática y otro es la inducción de la reacción acrosomal (Lemoine *et al.*, 2008).

Espermatozoide

Las características de los espermatozoides de las aves se han estudiado a profundidad por diferentes autores. Son de forma alargada y se subdividen en cabeza, cuerpo y cola (Herrera et al., 2005). Con longitud de 80 a 90 μm (Long, 2006). El espermatozoide es haploide, se encuentra desprovisto de citoplasma, constituido por un núcleo alargado, con cromosomas altamente condensados que impiden la actividad transcripcional para remplazar proteínas, un acrosoma que permite al espermatozoide interactuar y a su vez penetrar al ovocito y fertilizarlo. También cuenta con mitocondrias de 20 a 60 situadas en la parte anterior del flagelo (Long, 2006; Barbas et al., 2009).

Ovocito

En la superficie de cada yema de huevo se puede ver una pequeña mancha blanquecina llamada blastodisco. Este contiene una sola célula femenina. Si hay esperma presente cuando una yema ingresa al infundíbulo, un solo espermatozoide penetra en el blastodisco, lo fertiliza y el blastodisco se convierte en blastodermo. Técnicamente, el blastodermo es el verdadero huevo. Poco después de la fertilización, el blastodermo comienza a dividirse en 2, 4, 8 y más células. Las

primeras etapas del desarrollo embrionario han comenzado y continúan hasta que se pone el huevo. Luego, el desarrollo disminuye hasta que se incuba el huevo. Cuando el esperma y los óvulos se unen, este proceso se llama fertilización. Después de la fertilización, el óvulo puede desarrollarse y convertirse en pollo (Clauer, 2022).

Criopreservación

La criopreservación es un proceso que no existe de manera natural y que solo se realiza bajo manipulación por personal capacitado, por lo que requiere una alta adaptabilidad de las células para soportar los cambios osmóticos y el estrés térmico (Blesbois, 2007). El potencial de esta técnica es enorme, lo cual permite conservar la variabilidad genética de las aves y reducir los tremendos costos de la manutención y bioseguridad de las múltiples poblaciones de estirpes no comerciales que las casas de genética conservan para su uso potencial en el futuro (ABAD, 2003).

La criopreservación involucra la suspensión del semen en diluyentes con sustancias crioprotectoras, esta técnica permite su almacenamiento de manera “indefinida” en nitrógeno líquido, permitiendo la creación de un banco de genes, con un fácil manejo posterior (Herrera et al., 2005).

Técnica de inseminación

1. Obtención y recolección seminal. Los eyaculados se obtendrán por medio de la técnica de masaje dorso- ventral descrita para aves domésticas (Burrows y Quinn, 1937; Herrera *et al.*, 2005). Esta técnica se basa en las estimulaciones de las terminaciones nerviosas ubicadas en la cloaca con el fin de obtener una acción desencadenante de la eyaculación. Los eyaculados se recolectarán directamente de la cloaca por aspiración con una micropipeta graduada con un rango de 100 a 1000 µl (SL-1000, RANIN™, USA), para ser depositados en tubo eppendorf.
2. Inseminación. La hembra se le toma de las patas, colocándola debajo del brazo del que la está manipulando y mediante compresión manual de la porción inferior del abdomen, en dirección a la cloaca, esta se vuelve hacia el exterior, prolapsado el oviducto y dejando ver claramente la desembocadura del oviducto (lado izquierdo). En esta abertura se introduce la pipeta inseminadora, luego se afloja suavemente la presión ejercida sobre el ave y se inyecta el líquido seminal. Una vez inseminada el ave se vuelve a su jaula y se continúa con otra ave (Bergqvist, 1981).

4. JUSTIFICACION.

Las investigaciones de la anatomía aviar y los mecanismos de acción hormonal, que regulan la madurez y el funcionamiento de los órganos reproductivos y de la postura en el caso de las hembras, aún son motivo de investigaciones. El conocimiento de estos mecanismos puede permitir un desarrollo de los métodos tradicionales de producción aviar, ofreciendo alternativas de producción avícola con una mayor eficacia y que pueden vincularse con la investigación biomédica. Por lo tanto, este conocimiento es crítico para poder establecer prácticas de manejo que permitan una mayor eficiencia reproductiva, así contribuyendo al conocimiento de la conservación espermática para su aplicación en protocolos de reproducción asistida.

5. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la capacidad fertilizante del semen criopreservado del gallo (*gallus gallus*).

-

ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad fertilizante *in vitro* del semen criopreservado.
- Evaluar la capacidad fertilizante *in vivo* del semen criopreservado.
- Determinar la posible correlación entre la fecundación *in vitro* vs la *in vivo* mediante la medición de parámetros de fertilización.

6. METAS COMPLETADAS.

Se determinaron los parámetros de capacidad de reacción acrosomal así como los parámetros de fertilización *in vivo*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó en dos laboratorios de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la unidad Iztapalapa, en el laboratorio de andrología del Departamento de Ciencias de la Salud y en la unidad Xochimilco y en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, del Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Material Biológico.

Se utilizaron 5 machos y 30 hembras, de la granja AVICOLA JOCEF S.A. de C.V. Ubicada en el municipio de Jilotepec, Qro., clínicamente sanos de la raza “Lohmann Brown” en la granja. Las hembras fueron de una edad del segundo tercio del primer ciclo de postura y los machos de 5 meses, encontrándose maduros física y sexualmente.

Uso de animales

Se realizó de acuerdo con los protocolos de cuidado y bienestar animal señalados en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales, mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales”. Los animales recibieron alimento comercial balanceado (18% de proteína) y agua *ad libitum*. El alojamiento de cada ejemplar fue en jaulas metálicas de 70x70x90 cm, provistas de bebedero y comedero.

Obtención seminal

Los eyaculados se obtuvieron por medio de la técnica de masaje dorso-ventral descrita para aves domésticas (Burrows y Quinn, 1937; Herrera *et al.*, 2005). Esta técnica se basa en la acción desencadenante de la eyaculación que produce el masaje dorso abdominal posterior, al estimularse las terminaciones nerviosas que se encuentran en la zona de la cloaca.

Evaluación seminal.

Movilidad espermática: Se tomaron 10µl de muestra del eyaculado, se depositaron sobre un portaobjetos a 37°C, para observarse en un microscopio óptico a 40x, la proporción de espermatozoides que mostraron movimiento rectilíneo y progresivo (Herrera *et al.*, 2005)

Viabilidad espermática: Se colocaron 10 µl de semen diluido en un medio Lake más DNA y 1 µl de eosina/nigrosina (1:5) en un portaobjetos, se homogenizó la muestra y se dejó secar por 5 minutos. La muestra se observó en un microscopio óptico a 40x, se contaron 100 células, los espermatozoides teñidos se contabilizaron como muertos y los que no se tiñeron como vivos (Ricart *et al.*, 2015).

Morfología espermática: Con la misma laminilla con la que se observa la viabilidad de los espermatozoides, se contabilizaron los espermatozoides con deformidades en cabeza, cuello y cola. Se observó en un microscopio óptico a 40x, contando 100 células (Ricart *et al.*, 2015).

Criopreservación seminal.

Para la criopreservación se utilizó Dimetilacetamina (DMA) como crioprotector, siguiendo la técnica utilizada por Herrera y colaboradores (2005).

Protocolo de criopreservación:

Se congeló en un volumen final de 50 µl, el semen se diluyó con el medio a utilizar y DMA al 6%, Posteriormente los espermatozoides se sometieron al siguiente protocolo de criopreservación:

- 1.- En un tubo Eppendorf se depositó el diluyente con un volumen de 40 µl, posterior se adicionó DMA al 6% y un volumen de eyaculado de 5 µl.
- 2.- Se equilibró a una temperatura de 25°C durante 3 minutos (Santiago *et al.*, 2011).
- 3.- Se introdujo la muestra en una pajilla de 0.25 ml, sellada con alcohol polivinílico y se depositó en hielo durante 3 minutos (Peláez *et al.*, 2011).
- 4.- Las pajillas se sometieron a vapores nitrógeno líquido por 10 minutos (Santiago *et al.*, 2011).

5.- Finalmente se sumergieron las pajillas en nitrógeno líquido a -196°C y así permanecieron hasta su descongelación (Herrera *et al.*, 2005).

Protocolo de descongelación:

1.- Previo a la descongelación en una platina a 35°C se colocaron tubos Eppendorf, portaobjetos y cubreobjetos.

2.- Se tomó la pajilla del tanque de nitrógeno, para permanecer a temperatura ambiente por 3 segundos.

3.- Se introdujo la pajilla en agua a 35°C por 30 segundos.

4.- El contenido de dos pajillas se depositó en un tubo Eppendorf previamente calentados sobre una platina a 35°C .

5.- Se utilizaron 10 μl de semen? para estimar el porcentaje espermatozoides vivos y 10 μl para evaluar la movilidad espermática.

6.- El resto de que? se utilizó para evaluar los parámetros de capacitación y reacción acrosomal.

Capacidad fertilizante *in vitro* (Reacción Acrosomal).

Para determinar la capacidad fertilizante *in vitro*, se ha desarrollado la técnica de medición de la Reacción acrosomal, la cual se ha demostrado que se encuentra estrechamente correlacionada, por lo cual, los parámetros de reacción acrosomal (RA) se han determinado mediante la tinción con clortetraciclina (CTC). La CTC es un compuesto fluorescente que presenta fluorescencia a la luz ultravioleta y al quelar el calcio y ser expuestas al láser de un microscopio de fluorescencia momento en el que emite un color amarillo. Como sabemos la distribución del calcio cambia durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Ochoa *et al.*, 2014; Ricart *et al.*, 2015).

La técnica para evaluar los indicadores morfofisiológicos de espermatozoides con reacción acrosomal ha sido validada por estudios realizado por Camarillo & col., (2019), mediante la co-incubación de espermatozoides de gallo con membrana perivitelina (MPV), como inductor natural de la RA (Camarillo & col., 2019).

En un tubo Eppendorf con volumen final de 30 μ l conformado por 10 μ l de medio Lake, 10 μ l de eyaculado y 10 μ l de clortetraciclina (CTC) y 200 mcg /ml de MPV. Cada tubo se incubó a 38°C durante 40 minutos, los 10 μ l de CTC fueron depositados 10 min previos al tiempo establecido de incubación.

Se analizaron al menos 100 células de espermatozoides con incubados sin MPV y con MPV, por preparación a 1000 aumentos en un microscopio de fluorescencia a 260 nm, para determinar los patrones de fluorescencia para estimar el porcentaje de espermatozoides con viabilidad de lograr la RA.

Capacidad Fertilizante *in vivo*.

Se descongelaron las pajillas a 37 °C por 30 s., se hizo la inseminación intra vaginal utilizando 5 gallinas por tratamiento, 5 min después de haber sido descongelado (Rakha et al., 2016). Los huevos fueron recogidos el día después de la inseminación por 8 días, se utilizó una incubadora automática a una temperatura de 37.2 ° - 37.8 °C con una humedad relativa de 86 – 90% y el volteo cada hora. Los huevos fueron revisados por ovoscopía a los 14 días de incubación para determinar la fertilidad del huevo (Rakha et al., 2016).

Relación entre Fertilización *in vitro* VS Fertilización *in vivo*.

Se realizó la comparación de los resultados de fertilización *in vivo* vs los parámetros de espermatozoides descongelados con capacidad de Reacción acrosomal, para estimar la relación que pudo existir entre estos parámetros determinados.

8. RESULTADOS y DISCUSION

Evaluación básica espermática post descongelación

Viabilidad espermática post descongelación

El control y el de 200 µg/mL de MPV no mostraron diferencias significativas entre ellos (83.8% y 83.6% respectivamente), pero se observó una diferencia significativa.

Movilidad espermática post descongelación

El tratamiento control (61%) presenta diferencias significativas con mayor que el de los tratamientos de 200 µg/mL (56%)

Determinación de patrones de tinción de espermatozoides con reacción acrosomal

Los patrones de espermatozoides determinados fueron:

PATRON A: El espermatozoide Presentan fluorescencia uniforme en toda su morfología (100X) ver figura 5.

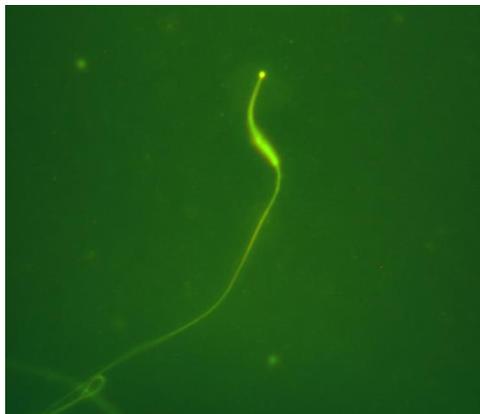


Figura Espermatozoide intacto o descapacitado, determinado con el uso de clortetraciclina. Lo que sugiere que la actividad de Ca^{2+} esta de manera homogénea en toda la superficie de la célula, relacionada con un estado metabólico pasivo o movilidad progresiva característica de espermatozoides no capacitados

PATRON B: Presentan fluorescencia distintiva, particularmente sobre la región acrosomal anterior de la cabeza. Se observa claramente una banda de fluorescencia brillante en la región ecuatorial (Figura 6).

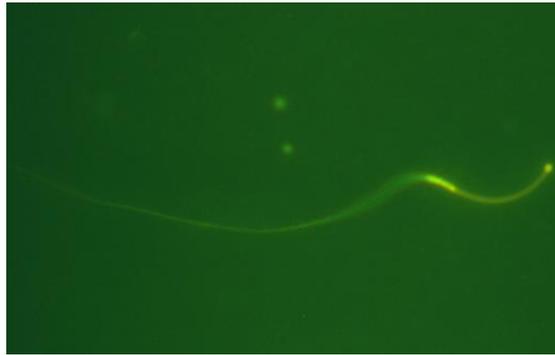


Figura. Espermatozoide capacitado, teñido con clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} se acumula en la zona donde se encuentran la región post ecuatorial y apical del cuello, sitio donde se localizan las mitocondrias, lo que sugiere una hiperactivación espermática, relacionada con el proceso de capacitación,

PATRON C: La falta de fluorescencia o la presencia de solamente una banda fluorescente en región ecuatorial indica la pérdida de membranas acrosomales.

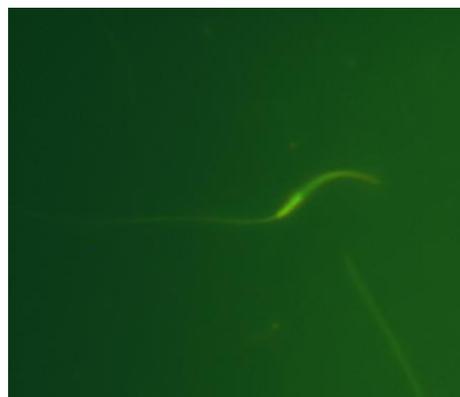


Figura Espermatozoide con reacción acrosomal, teñido con clortetraciclina. La actividad de Ca^{2+} sin denotar en la región acrosomal, sugiere la pérdida de este, evidenciando una menor actividad y presencia de Ca^{2+}

Espermatozoides descongelados con patrón c (reaccionados) co incubados con MVP

Ninguno de los diferentes tratamientos: control (65.33%) y con 200 µg/mL (69.33%) tienen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides reaccionados. Lo que indica que los tratamientos no arrestan los espermatozoides en un solo estado fisiológico, por lo cual es capaz de llevar a cabo todos los procesos para poder realizar la fertilización y por ende el espermatozoide sea viable. Los resultados obtenidos fueron mayores a los de Horrocks et al. (2000), debido al proceso de la criopreservación que se sabe produce un efecto de criocapacitación.

Fertilidad in vivo.

Fertilidad obtenida con semen conservado en diferente tratamiento

Tratamiento	N° de huevos		% de fertilidad
	Fértil	Infértil	
Eyaculado descongelado + Lake + DMA^b	28	15	65.12 ^a
Eyaculado descongelado + Lake + MPV 200 µg/mL	32	7	82.05 ^b

Se observa que el porcentaje de fertilidad fue mayor, cuando se co incubó el semen con MPV.

Los resultados demostraron que al utilizar las proteínas oviductales se puede inducir una reacción acrosomal espermática, la cual permite mantener la viabilidad espermática, además de disminuir los efectos negativos de la criopreservación llegando a ser igual de fértil que usar semen fresco.

Investigadores como Partyka et al. (2015 y 2018), Fattah et al. (2017), Noorani et al. (2015), han utilizado la suplementación de medio para la criopreservación teniendo como resultado cierta aproximación en la fertilidad a el resultado obtenido (70% al 78%) esto podría ser distinto por los protocolos de congelación, los medios utilizados, así como los crioprotectores.

9. CONCLUSIÓN

- La inducción de la reacción acrosomal utilizando MVP en semen criopreservado, demuestra que el efecto determinado como descapacitación espermática, es un estado fisiológico que se puede inducir la reacción acrosomal y puede ser un parámetro indicador de la posible capacidad fertilizante *in vivo*.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abad, J. (2003). Reproducción e Incubación en Avicultura. Biblioteca de Avicultura. Real Escuela de Avicultura. España.
- Bagnarello, F. (2021). Fertilización in vitro: conceptualización. Fertilización In Vitro. Pp 206-207.
- Barbas J., Mascarenhas R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and Tissue Banking, 10(1): 49-62.
- Benoff, F.H., Rowe, K., Fuguay, J.I., Renden, J.A. and Scott, A.R. (1981). Effect of semen collector on semen volume and sperm concentration in broiler breeder males. Poultry Science 60: 1062-1065.
- Bergqvist, E. (1981). Inseminación Artificial en Aves. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACION EXPERIMENTAL LA PLATINA. Chile.
- Blesbois E. (2007). Current status in avian semen cryopreservation. World's Poultry Science Journal, 63(2): 213-222.
- Bramwell, K. (2023). Artificial Insemination in Turkeys and Chickens. MSD Veterinary Manual. <https://www.msdsvetmanual.com/poultry/artificial-insemination/artificial-insemination-in-turkeys-and-chickens>

- Burrows W., Quinn J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16(1): 19-24.
- Camarillo R, Jiménez I, Guzmán A, Rosales A, Rodríguez F, Pérez-Rivero JJ, Herrera JA. 2019. Oviductal proteins effect in rooster spermatic cryopreservation. *CryoLetters*. 40(6): 352-356. ISSN: 0143-2044.
http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_40_6_2019.htm#352
- Donoghue A., Wishart G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62:213–232.
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017). l-carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148-153. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.10.009
- Giavarini, I. (1991). Ventajas de la inseminación artificial aplicada a la avicultura. *Selecciones avícolas*, 34(4), 246-259.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3571644>
- Gil, C. (2016). Reproducción de las aves. *Animales y biología. Biotecnología*, E. L. R. G. C <https://animalesbiologia.com/aves/temas/reproduccion-de-las-aves>
- Herrera J., Quintana J., López M., Betancourt M., Fierro R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology*, 51(5): 353-360.
- Horrocks, A. J., Stewart, S., Jackson, L., & Wishart, G. J. (2000). Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(1), 84-89. doi:10.1006/bbrc.2000.3766
- Lemoine M., Grasseau M., Brillard I., Blesbois E. (2008). A reappraisal of the factors involved in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction*, 136(4): 391.
- Long J. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poultry Science*, 85(2): 232-236.

- Mocé E., Grasseau I., Blesbois E. (2010). Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, 122(3), 359-366. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.10.010
- Ochoa F., Val D., Juárez A., Toscanol., Oliviol., Conejo J. 2014. Identificación del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de guajolote nativo durante el proceso de criopreservación. *Actas ibero. de Cons. Anim.*, 4, 123-125.
- Peláez J., Bongalhardo D.C. y Long J.A. 2011. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poult Sci* 90, 435-443.
- Partyka A., Łukaszewicz E., Nizański W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497-1504. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.006
- Rakha B., Ansari M., Akhter S., Hussain I., Blesbois E. (2016) Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 45-55 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.004>
- Ricart M.C., Breininger E., Rodríguez P.C. y Beconi MT. 2015. Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrología* 47, 30-36.
- Santiago J., Castaño C., Toledano A., Coloma M., López A., Prieto M., Campo J. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, 90 :2047–2053 doi: 10.3382/ps.2011-01355