

CALIDAD *IN VITRO* DEL SEMEN CRIOCONSERVADO DE GALLOS DE LA RAZA GALLINA VALENCIANA DE CHULLILLA. RESULTADOS PRELIMINARES

Blanch, E.¹, Tomás, C.¹, Sansano, S.², Gómez, E.A.¹, Casares, L.², Giménez, I.²
y Mocé, E.¹

¹CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400-Segorbe (Castellón). España.

²Rara Avis Biotec S.L. Valencia. España.

E-mail: moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

La disminución del censo o la desaparición de razas autóctonas a favor de otras estirpes mucho más productivas ha sido un problema ligado a la implantación de los sistemas de producción intensivos. Prácticamente, la mitad de las razas de aves se encuentran en peligro de extinción (Blesbois et al., 2007). Todas estas pequeñas poblaciones están expuestas a fallos en el manejo que provocan incrementos bruscos de la consanguinidad. Es por ello que estos recursos deberían ser salvaguardados mediante programas de conservación que, idealmente, combinaran el mantenimiento de los animales *in vivo* y la creación de bancos de recursos genéticos (Blesbois, 2007). Actualmente, el método de conservación de recursos genéticos más verosímil en las aves es la crioconservación de semen, debido a las características que presentan sus óvulos (Blesbois et al., 2007).

Para el semen de gallos se han descrito varios protocolos de crioconservación, aunque los más utilizados en la actualidad son los que utilizan glicerol o dimetilacetamida (DMA) como crioprotectores. Cada uno de estos crioprotectores (CPA) necesita de un manejo y protocolo específicos, ya que el DMA ofrece buenos resultados cuando se usan velocidades rápidas de congelación mientras que el glicerol funciona mejor con pajuelas y velocidades de congelación más lentas (revisado por Mocé et al., 2010). Por otra parte, se han observado grandes diferencias en la resistencia a la congelación entre razas (Blesbois et al., 2007).

La Gallina Valenciana de Chulilla es una raza autóctona de la Comunidad Valenciana, catalogada como raza en peligro de extinción. Por ello, se ha establecido un programa de conservación de esta raza en el que se contempla la creación de un banco de semen.

El objetivo de este trabajo fue comparar la calidad *in vitro* del semen crioconservado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla procesado con dos protocolos de congelación distintos (en uno se utilizó DMA y en otro glicerol).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España), excepto el yoduro de propidio (PI) y el SYBR-14, que fueron adquiridos en Invitrogen (Barcelona, España). Para la valoración del semen se utilizó el diluyente BPSE-I, para la congelación con glicerol (G) el LPC, y el FEB para el DMA. La calidad de las muestras congeladas con glicerol se evaluó con diluyente Lake 7.1 (L7.1). La composición está detallada en Mocé et al. (2010). La motilidad en las muestras frescas o congeladas con DMA se valoró con BPSE suplementado con BSA (0,3 %) y para el análisis por citometría se utilizó el BPSE. En el caso de las muestras congeladas con G, para evaluar la motilidad se utilizó el medio L7.1 suplementado con G (11 %; Purdy et al., 2009) y BSA, y para la citometría se usó L7.1-G (durante la incubación con las tinciones) y L7.1 para la dilución final y el análisis de las muestras.

Los gallos (n = 37) pertenecían a la raza Gallina Valenciana de Chulilla. El semen fue extraído por el método de masaje abdominal (Burrows y Quinn, 1937) y almacenado en baño de agua con hielo. Los eyaculados no contaminados fueron mezclados y se trasladaron al laboratorio para ser procesados.

Cada *pool* (n = 14) fue dividido y cada mitad congelada con un protocolo distinto. Para el semen congelado con G, se siguió el protocolo descrito por Blesbois et al. (2008). Brevemente, el semen fue diluido (1:1; v:v) con LPC a 5 °C, tras 5 minutos (min) a 5 °C fue diluido (2:1; v:v) con LPC suplementado con 33% de G (concentración final de G: 11%), y tras 20 min de equilibrado a 5 °C el semen se envasó en pajuelas de 0,25 mL. Para la congelación se usó un congelador programable (Mini-Digitcool, IMV, Humeco, Huesca, España) con las velocidades de congelación: de 4 °C a -35 °C, a -7 °C/min y de -35 °C a -140 °C, a -60 °C/min, siendo posteriormente las pajuelas almacenadas en nitrógeno líquido. Cuando se utilizó el DMA se siguieron los protocolos de Woelders et al. (2006) y Blesbois et al. (2007), con ligeras modificaciones. Brevemente, la concentración de las muestras se

ajustó a 1500×10^6 espermatozoides/mL con FEB atemperado a 5 °C y tras un equilibrado de 5 min a 5 °C, estas muestras fueron diluidas (dilución 4:1; v:v) con medio FEB suplementado con 25,5% de DMA (concentración final de DMA: 5,1% y 1200×10^6 espermatozoides/mL), procediendo inmediatamente a su envasado en pajuelas de 0,25 mL. La congelación se realizó en congelador programable a una velocidad de -60 °C/min de 4 °C a -140 °C, y posteriormente las pajuelas fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

La descongelación se realizó en baño de agua a 5 °C, en 3 min (G) ó 30 segundos (DMA). En cada *pool* de semen fresco, se midió el volumen (con una pipeta), y se calculó la concentración en una alícuota fijada en una solución de PBS con glutaraldehído 0,25 % (dilución 1/200) con ayuda de una cámara de recuento celular (*Neubauer improved*). La integridad de la membrana plasmática se determinó con la tinción dual SYBR14-PI, mediante un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, EEUU) con un láser argón de 488 nm según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). Las morfoanomalías se determinaron en espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina según el protocolo de Blesbois et al. (2008). Por otra parte, la motilidad individual se evaluó con un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis system; ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España), según el protocolo descrito por Blesbois et al. (2008). En el semen descongelado, se evaluaron la integridad de la membrana plasmática y la motilidad individual.

Los datos fueron analizados con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) usando un modelo mixto en el que se incluyó el pool como efecto aleatorio. El ajuste Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias entre medias ($P < 0,05$). Para el análisis de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos (membrana plasmática intacta), el crioprotector fue incluido como efecto fijo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del semen fresco (espermatozoides móviles, vivos y vivos con morfología normal) es elevada (Tabla 1), y similar a la de otras razas (Blesbois et al., 2008; Purdy et al., 2009; Siudzińska y Łukaszewicz, 2008, Tabatabaei et al., 2010). La concentración y el volumen (media: 0,25 mL/gallo) obtenidos, son similares o ligeramente inferiores a los observados en otras razas (Purdy et al., 2009; Siudzińska y Łukaszewicz, 2008, Tabatabaei et al., 2010).

Por otra parte, la calidad del semen descongelado fue más elevada cuando se utilizó el glicerol que cuando se utilizó el DMA como crioprotector (Tabla 2), lo que corrobora resultados previos de otros autores utilizando un nivel de DMA similar (5,6 %) aunque con protocolos de congelación ligeramente distintos (Chalah et al., 1999; Purdy et al., 2009; Mocé et al., 2010; entre otros). Estos resultados eran esperables, ya que el glicerol es el crioprotector más efectivo para el semen de gallos, aunque es anticonceptivo para las hembras y es necesaria su eliminación antes de la inseminación (Donoghue y Wishart, 2000). Además, podemos destacar que la calidad de semen obtenida con el glicerol es más elevada en nuestro trabajo (67,5 y 80,7% de espermatozoides móviles y vivos, respectivamente) que en trabajos previos en los que se evaluó la calidad antes de eliminar el glicerol (motilidad: 32-57%; viabilidad: 38-56%; Purdy et al., 2009). Las diferencias entre trabajos pueden ser debidas a las razas utilizadas o bien al protocolo de congelación utilizado (congelador programable frente a pajuelas congeladas a 6,4 cm del nitrógeno líquido, velocidad aproximada: 10 °C/min). No obstante, habrá que estudiar en futuros trabajos cómo afecta el protocolo de eliminación del glicerol a la calidad del semen. Sin embargo, la calidad del semen congelado con DMA (25,4 y 39,9% de espermatozoides móviles y vivos, respectivamente) es inferior a la observada por otros autores (alrededor de 50 y 70% de espermatozoides móviles y vivos, respectivamente; Woelders et al., 2006), probablemente debido a diferencias en la velocidad de congelación (60 °C frente a 200 °C/min). No obstante, la motilidad del semen congelado con DMA fue superior y el porcentaje de espermatozoides vivos ligeramente inferior al obtenido por otros autores (15 % móviles y 60 % vivos; Purdy et al., 2009). En este caso, las diferencias pueden deberse a la velocidad de descongelación utilizada (5 °C, 3 min frente a 50 °C, 20 segundos) y no tanto a la forma de congelación (congelador programable a 60 °C/min o a 1 cm del nitrógeno líquido, a velocidad estimada de 59 °C/min).

En conclusión, la calidad *in vitro* del semen congelado de los gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla es más elevada cuando se utiliza el glicerol que cuando se utiliza el

DMA como crioprotector. No obstante, la capacidad fecundante *in vivo* de los espermatozoides congelados con estos protocolos tendrá que ser estudiada en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Blesbois, E. 2007. *Worlds Poult Sci J* 63: 213-222. • Blesbois, E., Seigneurin, F., Grasseau, I., Limouzin, C., Besnard, J., Gourichon, D., Coquerelle, G., Tixier-Boichard, M. 2007. *Poult Sci* 87: 555-564. • Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., Mignon-Grasteau, S., Saint Jalme, M., Mialon-Richard, M.M. 2008. *Theriogenology* 69: 252-261. • Burrows, W.H., Quinn, J.P. 1937. *Poult Sci* 14: 251-254. • Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E., Brillard, J.P. 1999. *Cryobiology* 39: 185-191. • Donoghue, A.M., Wishart, G.J. 2000. *Anim Reprod Sci* 62: 213-232. • Mocé, E., Grasseau, I., Blesbois, E. 2010. *Anim Reprod Sci* 122: 359-366. • Purdy, P.H., Graham, J.K. 2004. *Cryobiology* 48: 36-45. • Purdy, P.H., Song, Y., Silversides, F.G., Blackburn, H.D. 2009. *Poult Sci* 88: 2184-2191. • Siudzińska, A., Łukaszewicz, E. 2008. *J Appl Poult Res* 17: 101-108. • Tabatabaei, S., Chaji, M., Mohammadabadi, T. 2010. *J Anim Vet Adv* 9: 195-198. • Woelders, H., Zuidberg, C.A., Hiemstra, S.J. 2006. *Poult Sci* 85: 216-222.

Agradecimientos: financiado por INIA RZ2008-00027-00-00 y co-financiado por fondos FEDER. Agradecemos la financiación del MICINN (C. Tomás, FPI Ref. BES-2007-17063; Madrid), CAPA (E. Blanch, CAPA, DOGV5324; Valencia) e INIA-CCAA cofinanciado por el Fondo Social Europeo (E. Mocé). E. Mocé está en la actualidad contratada mediante fondos del Subprograma Ramón y Cajal del MICINN (ref. RYC-2010-06162; Madrid).

Tabla 1. Calidad de pools de semen fresco (n=14) de gallos de raza Gallina Valenciana de Chulilla

	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Nº machos en el pool	26	5	17	31
Volumen (mL)	6,5	1,4	3,9	9,8
Concentración (x 10 ⁶ /mL)	2916	503	2160	3830
Móviles totales (%)	77	7	59	85
Móviles progresivos (%)	61	8	40	73
Vivos (%)	94	2	90	96
Vivos anómalos (%)	8	3	4	13

Tabla 2. Parámetros de calidad *in vitro* de pools de semen congelado-descongelado (n = 14) de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla

Crioprotector	Móviles totales (%)		Móviles progresivos (%)		Vivos (%)	
	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.
Glicerol (11 %)	67,5 ^a	1,7	52,1 ^a	2,7	80,7 ^a	1,8
DMA (5,1 %)	25,4 ^b	1,7	19,4 ^b	2,7	39,9 ^b	1,8

DMA: dimetilacetamida; l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar; ^{a, b}: dentro de la misma columna, indican diferencias entre crioprotectores (P < 0,05)

IN VITRO QUALITY OF CRYOPRESERVED ROOSTER SPERM FROM "GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA" BREED. PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT: The "Gallina Valenciana de Chulilla" is an endangered autochthonous chicken breed from the Comunidad Valenciana which is currently being preserved. The objective of this study was to compare the *in vitro* quality (sperm motility and plasma membrane integrity) of sperm cryopreserved with two different protocols (each of them used a different cryoprotectant: glycerol or dimethylacetamide-DMA). Samples cryopreserved with glycerol exhibited higher *in vitro* sperm quality after cryopreservation than samples cryopreserved with DMA (67.5±1.7% vs. 25.4±1.7% total motile sperm and 80.7±1.8% vs. 39.9±1.8% sperm with intact plasma membrane). In conclusion, the protocol where glycerol was used preserved better the *in vitro* sperm quality after thawing than the DMA protocol.

Keywords: freezing, glycerol, semen, chicken.