EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL Y DE LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE LA CALIDAD *IN VITRO* Y LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN CRIOCONSERVADO DE GALLOS DE RAZA GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA

Tomás[1], C., Blanch[1], E., Casares[2], L., Gómez[1], E.A., Sansano[2], S., Giménez[2], I. y Mocé, E.[1]
[1]CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400-Segorbe (Castellón). España. [2]Rara Avis Biotec S.L. Valencia. España. moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

Para la congelación del semen de gallos se utiliza mayoritariamente el glicerol (G), ya que algunos autores observaron que este crioprotector es el mejor para líneas subfértiles (Blesbois, 2007). No obstante, es necesaria su eliminación como paso previo a la inseminación por su efecto anticonceptivo sobre la hembra si su concentración excede el 1% (Lake et al., 1980).

La concentración de G más utilizada en los protocolos actuales es del 11% (Long et al., 2010; Mocé et al., 2010; Purdy et al., 2009) y la tasa de dilución (TD) para su eliminación es de 1:4 (Seigneurin y Blesbois, 1995). No obstante, los protocolos más antiguos utilizaban 8% G y TD de 1:8 (Lake et al., 1981). Por otra parte, existen grandes diferencias en la resistencia a la congelación entre razas, tanto en calidad *in vitro* (Long, 2006) como en fertilidad *in vivo* (Blesbois et al., 2007). Esto tiene gran importancia en el establecimiento de los bancos de semen, ya que determinará el número de pajuelas que será necesario guardar para el restablecimiento de las poblaciones.

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

El objetivo de este trabajo fue comparar la calidad *in vitro* y la fertilidad *in vivo* del semen crioconservado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla procesado con dos concentraciones de G (8 y 11%) y dos TD (1:4 y 1:8) para eliminar el G.

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 fresco se utilizó el diluyente BPSE-I y para la congelación con glicerol (G) el LPC. Para la dilución del semen post-descongelación se utilizó el medio Lake centri (LC). El diluyente Lake 7.1 (L7.1) se utilizó para resuspender los espermatozoides después de eliminar el G y para valorar las muestras congeladas. La composición de los diluyentes está detallada en Mocé et al. (2010) y Lake y Ravie (1979). La motilidad en las muestras frescas se valoró con BPSE suplementado con BSA (0,3 %) y para el análisis por citometría de flujo (EPICS XL, Coulter Corporation Inc., Miami, FL, EE.UU.) se utilizó el BPSE. En el caso de las muestras congeladas, para evaluar la motilidad se utilizó el medio L7.1 suplementado con G (11 % u 8%; 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. Para la evaluación de la motilidad de las muestras descongeladas tras la eliminación del glicerol se utilizó L7.1 suplementado con BSA.

Los gallos (n = 26) pertenecían a la raza Gallina Valenciana de Chulilla. Para las inseminaciones se utilizaron gallinas ponedoras (n = 40) de la línea Lohmann Brown Classic. El semen fue extraído y almacenado según el protocolo descrito en Blanch et al., (2011). Los eyaculados válidos se mezclaron para constituir un *pool* (n = 9) y cada *pool* fue dividido y cada mitad congelada con una concentración de G distinta, siguiendo el protocolo descrito por Blesbois et al., (2008), detallado en Blanch et al., (2011).

La descongelación se realizó en baño de agua a 5 ºC, en 3 min. Para preparar las dosis de inseminación se descongelaron un total de 450 x 10^6 espermatozoides/gallina. Cada una de las concentraciones de glicerol se subdividió en dos alícuotas, siendo cada una diluida con un protocolo distinto. Para eliminar el G se realizaron diluciones seriadas con LC (1:4 y 1:8) según protocolos descritos previamente (Lake et al., 1981; Mocé et al., 2010). Después de la última dilución el contenido total de cada uno de los tratamientos se dividió en tubos que contenían el volumen necesario para una dosis de inseminación y se centrifugaron a 550 g

durante 15 min a 5 ºC. El sobrenadante fue eliminado y cada pellet se resuspendió con 75 µl de L7.1 (dilución 1:1, aproximadamente).
Cada gallina fue inseminada por vía intravaginal con una pipeta automática (Microman® M250, Gilson, Grupo Taper S.A., Alcobendas, Madrid, España). Cada gallina recibió dos inseminaciones artificiales (IA; 300 x 10^6 espermatozoides/IA en 150 a 160 µl) separadas 48 h (d 0 y d 2). Se inseminaron 10 gallinas por cada tratamiento (concentración G x TD), en 15 min desde la eliminación del sobrenadante. Los huevos se recogieron desde el día 2 hasta el día 5, fueron incubados y a los 7 días se evaluaron en el ovoscopio. La tasa de fertilidad (%) se calculó como número de huevos fecundados/número de huevos incubados x 100.
La evaluación de la motilidad y de la viabilidad se realizaron según los protocolos descritos en Blanch et al., (2011).
Los datos de calidad de semen fueron analizados con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). El ajuste Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias entre medias ($P<0,05$). Para el análisis de los parámetros de calidad seminal, se usó un modelo mixto en el que se incluyó el *pool* como efecto aleatorio. Para el análisis de los datos de calidad de semen nada más descongelar se incluyó la concentración de G como efecto fijo y en el análisis de la calidad del semen tras la eliminación del G se incluyeron la concentración de G, la TD y su interacción como efectos fijos. Los datos de tasa de fertilidad se analizaron con un GLM incluyendo la concentración de G, la TD y su interacción como efectos fijos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del semen fresco fue elevada (90%, 80% y 96% espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos, respectivamente; datos no mostrados en tablas). La calidad del semen descongelado fue elevada y similar para las dos concentraciones de glicerol antes (Tabla 1) o después de eliminar el glicerol con las dos TD (Tabla 2). De hecho, estos resultados de calidad *in vitro* son más elevados que los de otros autores (Long, 2006; Mocé et al., 2010; Purdy et al., 2009; Seigneurin y Blesbois, 1995).
Es difícil realizar comparaciones con otros trabajos en los resultados de fertilidad, por las diferencias que existen en el número de IA realizadas, dosis de IA o días de recogida de huevos. Además, no tenemos constancia de que existan trabajos similares en los que se hayan comparado estas dos concentraciones de G y estas dos TD. Sorprende la escasa fertilidad que presentaron nuestras dosis congeladas con 11% G para las dos TD utilizadas (Tabla 2), ya que es un protocolo ampliamente contrastado (Blesbois et al., 2008; Chalah et al., 1999; Seigneurin y Blesbois, 1995) que ha dado también buenos resultados en otras poblaciones de gallinas subfértiles o en peligro de extinción (del 25 al 59% de fertilidad; Blesbois et al., 2007). En el caso de la TD 1:4, la baja fertilidad podría deberse al nivel de G tras la centrifugación y dilución del pellet (1,1%), aunque con la TD 1:8 la fertilidad debería haber mejorado (G en la dosis de inseminación: 0,44%). Por lo tanto, los bajos resultados obtenidos con 11% G parecen deberse a la concentración de partida. Los resultados mejoraron al congelar con 8% G y, a pesar de que los resultados fueron inferiores a los obtenidos por otros autores con TD1:8 (90% fertilidad; Lake et al., 1981), son similares a los de otros autores que utilizaron líneas de gallinas en peligro de extinción (2-9%; Fontgibell y Francesch, 1998). No obstante, nuestros resultados de fertilidad mejoraron al usar 8% G y TD 1:4, aunque no nos consta que esta combinación haya sido utilizada previamente. Probablemente las diferencias de fertilidad entre tratamientos sean debidas a los daños osmóticos que se producirían en los espermatozoides durante el proceso de dilución del G (mayores a más G y mayor TD), como sugieren Hammersted y Graham (1992).
En conclusión, la calidad *in vitro* del semen congelado de los gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla es elevada con las dos concentraciones de G, aunque los mejores resultados de fertilidad se obtienen al congelar con 8% G y eliminar el G con TD 1:4. Estos resultados pueden ser útiles para otras poblaciones de gallinas en peligro de extinción en las que no se obtengan buenos resultados de fertilidad al utilizar protocolos estándar de congelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Blanch, E., Tomás, C., Sansano, S., Gómez, E.A., Casares, L., Giménez, I. & Mocé, E. 2011. AIDA I: 407-409. • 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. 86: 555-564. • Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., Mignon-Grasteau, S., Saint Jalme, M. & Mialon-Richard, M.M. 2008. Theriogenology 69: 252-261. • Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E. & Brillard, J.P. 1999. Cryobiology 39: 185-191. • Fontgibell, A. & Francesch, A. 1998. Arch. Zootec. 47: 335-341. • Hammersted, R.H. & Graham, J.K. 1992. Cryobiology 29: 26-38. • Lake, P.E. & Ravie, O. 1979. J. Reprod. Fert. 57: 149-155. • Lake, P.E., Buckland, R.B. & Ravie, O. 1980. Cryo-Letters 1: 299-304. • Lake, P.E., Ravie, O. & McAdam, J. 1981. British Poult. Sci. 22: 71-77. • Long, J.A. 2006. Poult. Sci. 85: 232-236. • Long, J.A., Bongalhardo, D.C., Peláez, J., Saxena, S. Settar, P., O'Sullivan, N.P. & Fulton, J.E. 2010. Poult. Sci. 89: 966-973. • Mocé, E., Grasseau, I. & Blesbois, E. 2010. Anim. Reprod. Sci. 122: 359-366. • Purdy, P.H., Song, Y., Silversides, F.G. & Blackburn, H.D. 2009. Poult. Sci. 88: 2184-2191. • Seigneurin, F. & Blesbois, E. 1995. Theriogenology 43: 1351-1358.

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; E. Mocé; ref. RYC-2010-06162; Madrid) and CAPA (E. Blanch, CAPA, DOGV5324; Valencia).

Tabla 1. *Parámetros de calidad in vitro de pooles de semen congelado-descongelado (n = 9) de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla antes de la eliminación del glicerol*

Concentración de glicerol	Móviles totales (%)		Móviles progresivos (%)		Vivos (%)	
	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.
8%	68,2	3,7	39,0	4,1	70,2	3,1
11%	70,0	3,7	40,1	4,1	70,3	3,1

l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar.

Tabla 2. *Calidad in vitro y de fertilidad in vivo* de pooles de semen crioconservado *de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla, después de la eliminación del glicerol*

		Móviles totales (%)		Móviles progresivos (%)		Fertilidad (%)	
		l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.
Glicerol	8%	60,3	2,2	48,6	2,6	$21,4^{a}$	1,7
	11%	56,0	2,2	43,6	2,6	$1,6^{b}$	1,7
Dilución	1:4	59,5	2,2	47,8	2,6	$15,7^{\alpha}$	1,7
	1:8	56,8	2,2	44,4	2,6	$7,3^{\beta}$	1,7
Glicerol x dilución	8%, 1:4	62,3	3,0	49,8	3,1	$31,4^{A}$	2,4
	8%, 1:8	58,3	3,0	47,4	3,1	$11,5^{B}$	2,4
	11%, 1:4	56,7	3,0	45,8	3,1	0^{C}	2,4
	11%, 1:8	55,3	3,0	41,4	3,1	$3,1^{BC}$	2,4

l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar; ^{a,b}: indican diferencias entre concentraciones de glicerol ($P < 0,05$); $^{\alpha,\beta}$: indican diferencias entre diluciones ($P < 0,05$); ^{A,B,C,D}: medias con letras no comunes indican diferencias entre grupos ($P < 0,05$).

EFFECT OF GLYCEROL CONCENTRATION AND DILUTION RATE ON THE QUALITY *IN VITRO* AND THE FERTILIZING ABILITY OF CRYOPRESERVED SPERM FROM ROOSTERS BELONGING TO THE 'GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA' BREED

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 and fertilizing ability of sperm cryopreserved with two different glycerol (G) concentrations (8 and 11%) and two dilution rates (DR; 1:4 and 1:8) for the G removal. The quality was similar form both G concentrations and DR (55 to 62% total motile sperm). However, the fertilizing ability of the sperm cryopreserved with 11% G was close to cero while the group 8% G and DR 1:4 exhibited the highest fertilizing ability (31% of fertilized eggs). In conclusion, the combination 8% G and DR 1:4 is recommended for the cryopreservation of the semen from this breed.

Keywords: freezing, glycerol, dilution rate, chicken.