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

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

INTRODUCCIÓN

El glicerol (G) se usa normalmente a una concentración del 11% (v:v) en los diluyentes de congelación de semen de gallos (Long et al., 2010; Mocé et al., 2010; Purdy et al., 2009), y con él se consiguen buenos resultados cuando se utiliza semen de líneas de gallos subfértiles (Blesbois, 2007). Sin embargo, es anticonceptivo en gallinas cuando excede el 1% (v:v) de concentración (Lake et al., 1980), por lo que ha de ser eliminado (mediante dilución y posterior centrifugación) antes de la inseminación artificial (IA). La dilución debe realizarse de forma lenta, existiendo protocolos que tienen desde 6 pasos y tasa de dilución (TD) 1:4 (v:v; Mocé et al., 2010) hasta 35 pasos y TD 1:2,6 (v:v; Purdy et al., 2009).

Ante la baja fertilidad obtenida en experimentos previos con semen congelado de la raza de gallina valenciana de Chulilla (G 11% y TD 1:4 en 6 pasos; Tomás et al., 2013) nos planteamos si las bajas fertilidades eran debidas a una baja dilución del G o al proceso de congelación y descongelación. Así pues, en el presente trabajo estudiamos el efecto de la TD del G (1:2,6 y 1:22; v:v) sobre la calidad in vitro y la fertilidad in vivo del semen fresco y descongelado de gallos de la raza Gallina Valenciana de Chulilla, utilizando el protocolo de dilución de 35 pasos (Purdy et al., 2009) para minimizar los choques osmóticos.

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 inicial se utilizó el diluyente BPSE-I y el Lake pre-congelación (LPC) para la congelación. Para la dilución del semen post-descongelación se utilizó el diluyente 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 descongeladas o frescas (diluidas con G). La composición de los diluyentes está detallada en Blanch et al. (2014). La motilidad en las muestras frescas sin G, 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. Se utilizó el medio L7.1 suplementado con G (11 %; Purdy et al., 2009) y BSA para evaluar la motilidad de las muestras descongeladas antes de eliminar el G, 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. En las muestras descongeladas y frescas tras eliminar el G se utilizó L7.1 suplementado con BSA para evaluar la motilidad.

Los gallos (n=26) pertenecían a la raza Gallina Valenciana de Chulilla. Para las inseminaciones se utilizaron gallinas ponedoras (n = 27) de la línea Lohmann Brown Classic. El semen fue extraído, almacenado y la calidad de las muestras fue evaluada según protocolos descritos en Blanch et al. (2014). Los eyaculados válidos se mezclaron para constituir un *pool* y cada *pool* fue conservado en fresco (n=2) o congelado (n=3) con 11% (v:v) G, siguiendo el protocolo descrito por Blesbois et al., (2008), detallado en Blanch et al., (2014). La descongelación se realizó en baño de agua a 5 ºC, en 3 min y la evaluación de la motilidad y de la viabilidad se realizaron según los protocolos descritos en Blanch et al., (2014). Fueron tomados los siguientes datos: espermatozoides móviles totales (TM;%), móviles progresivos (TMP;%), vivos (espermatozoides con membrana plasmática intacta; %) y concentración (espermatozoides/mL).

Para eliminar el G del semen fresco y descongelado se realizaron diluciones seriadas con LC según el protocolo de Purdy et al., (2009), y para alcanzar la TD 1:22 se hizo una ampliación del protocolo que consistió en 5 diluciones de 50μL, 10 diluciones de 100μL y 18 diluciones de 18μL por pajuela de 0,25 mL. El tiempo transcurrido entre una dilución y la siguiente fue de 2 minutos. Después de la última dilución el contenido total se dividió en

tubos, que fueron centrifugados a 300g durante 25 min a 5 ºC. El sobrenadante fue eliminado, los pellets de cada tratamiento fueron mezclados y la concentración fue ajustada a 1,2 x 10^9 espermatozoides/mL con L7.1. Cada gallina fue inseminada por vía intravaginal con una pipeta automática, recibiendo dos IA (180 x 10^6 espermatozoides/IA en 150 μL) separadas 48 h (d0 y d2). Se inseminaron entre 5-8 gallinas en cada tratamiento (5 gallinas en el semen fresco, TD 1:22; 7 gallinas en el semen fresco TD 1:2,6 y semen congelado, TD 1:22; y 8 gallinas en el semen congelado, TD 1:2,6), y las IA se realizaron 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. Se recogieron un total de 105 huevos (28 de semen fresco, TD 1:2,6; 18 de semen fresco, TD 1:22; 31 de semen congelado TD 1:2,6; y 28 de semen congelado TD 1:22).

Los datos se analizaron con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Los parámetros de calidad seminal se analizaron con un modelo mixto en el que se incluyó el *pool* como efecto aleatorio y el tipo de semen (TS), la TD y su interacción como efectos fijos. El ajuste Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias entre medias ($P<0,05$). Los datos binomiales de fertilidad se analizaron con un modelo de regresión logística incluyendo el día de recogida de huevos, TS, TD y la interacción TSxTD como efectos fijos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del semen fresco fue elevada (79% TM, 67% TMP, 93,8% vivos, 1,96x10^9 espermatozoides/mL). La calidad del semen congelado fue elevada antes de eliminar el glicerol (62,6% TM, 50,6% TMP 74,8% vivos), siendo los resultados similares a los obtenidos en estudios previos (entre 48 y 71% TM, 32% TMP y 78% vivos; Mocé et al., 2014; Blanch et al., 2012; Purdy et al., 2009)

Tanto la TD como el TS tuvieron un efecto significativo (Tabla 1) para los TM (%), presentando la TD más baja (1:2,6) mejores motilidades que la tasa de TD más alta (1:22) y presentando el semen fresco más TM que el congelado. La interacción no fue significativa, ya que ambos tipos de semen presentaron más TM al usar la TD 1:2,6. En el caso de los TMP (%), solo la TD tuvo un efecto significativo (Tabla1), presentando nuevamente la TD 1:2,6 mejores resultados que la TD 1:22. Estos resultados corroboran los de otros autores que observaron una alteración en la calidad del semen fresco de gallos al usar diluciones superiores a 1:10 (v:v; Parker y McDaniel, 2014).

El semen fresco presentó mayor capacidad fecundante que el congelado (Tabla 1), lo que corrobora resultados previos (Wishart, 1985). Se ha estimado que la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados se reduce al 1,6% de la que presenta el semen fresco (Wishart, 1985), por lo que esta diferencia de fertilidad al usar dosis de IA similares para ambos tipos de semen es lógica. No obstante, ni la TD ni el día de recogida de huevos afectaron a la fertilidad. Por otra parte, se observó una interacción entre TS y TD. Así, el semen fresco presentó mayor fertilidad (Tabla 1) con la TD 1:22 que con la TD 1:2,6, mientras que el semen congelado presentó una fertilidad similar (y baja) con ambas TD. Es probable que estos resultados observados en las dosis frescas sean debidos a la cantidad de G residual en la dosis de IA, ya que ésta era todavía anticonceptiva en la TD 1:2,6 (1,4% versus 0,2% para la TD 1:22). En el caso del semen congelado, el G residual en las dosis procesadas con la TD 1:2,6 (0,98%) se encontraba al límite de la anticoncepción, pero en este caso la dilución 1:22 no mejoró la fertilidad. Aunque el G tiene efectos perniciosos sobre los espermatozoides (Hammerstedt y Graham, 1992), los efectos dañinos que el propio proceso de congelación-descongelación provoca sobre los espermatozoides podrían explicar la diferente respuesta que presentan el semen fresco y descongelado al mismo protocolo de dilución. Además, el bajo porcentaje de espermatozoides móviles que presentan las dosis de IA de semen descongelado podría agravar el problema de subfertilidad y quizás se podría compensar al incrementar el número de espermatozoides en la dosis de IA.

En conclusión, la calidad de la dosis de inseminación es mayor cuanto menor es la TD, aunque esta mayor calidad no se refleja en una mayor fertilidad ni en el semen fresco ni en el descongelado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Blanch, E., et al., 2014. Theriogenology 81: 1174-1180. •Blanch, E., et al., 2012. Reprod. Domest. Anim. 47: 121. • Blesbois, E., et al., 2008. Theriogenology 69: 252-261. • Blesbois, E., 2007. Worlds Poult. Sci. J.63: 213-222. •Hammerstedt, R.H. et al.,1992. Cryobiology 29: 26-38. • Lake, P.E., et al., 1980. Cryo-Letters 1: 299-304. •Long, J.A., et al., 2010. Poult. Sci. 89: 966-973. •Mocé E., et al., 2014. Reprod. Domest. Anim. 49: 98. • Mocé, E., et al., 2010. Anim. Reprod. Sci 122: 359-366. •Parker, H.M., et al., 2004 Int. J. Poult. Sci. 3: 588-592. • Purdy, P.H., et al., 2009. Poult. Sci. 88: 2184-2191. •Tomás, C., et al., 2013 XV Jornadas sobre producción animal. 1: 425-427. •Wishart. G.J., 1985. Br. Poult. Sci. 26: 375-380.

Agradecimientos: financiado por INIA RZ2008-00027-00-00, MICINN (E. Mocé, ref. RYC-2010-06162) co-financiados con fondos FEDER, y por becas de formación y especialización del IVIA (A. Fajardo, L. Casares-Crespo).

Tabla 1. *Calidad in vitro (l.s.m± e.e.) y fertilidad in vivo de pooles de semen fresco (n=2) y congelado (n=3) de gallos de la raza gallina valenciana de Chulilla y tasas de dilución (TD) 1:2,6 y 1:22 (v:v) para eliminar el glicerol.*

Efecto fijo			Móviles totales (%)	Móviles progresivos (%)	Fertilidad (%)* [n]
TD		1:2,6	$39,8^{B}$ ±1,9	$29,3^{B}$ ±2,0	11,3 ±4,1 [59]
		1:22	$20,5^{A}$ ±1,9	$15,5^{A}$ ±2,0	22,5 ±9,9 [46]
Tipo de semen (TS)	Fresco		$36,0^{\beta}$ ±1,9	27,5 ±2,0	$38,3^{\beta}$ ±8,7 [46]
	Congelado		$24,3^{\alpha}$ ±1,9	17,3 ±2,0	$5,6^{\alpha}$ ±3,2 [59]
Interacción (TS x TD)	Fresco	1:2,6	47,5 ±2,7	36,0 ±3,0	$13,9^{y}$ ±6,5 [28]
	Fresco	1:22	24,5 ±2,7	19,0 ±3,0	$70,4^{z}$ ±10,3 [18]
	Congelado	1:2,6	32,0 ±2,7	22,5 ±3,0	$9,1^{y}$ ±5,1 [31]
	Congelado	1:22	16,5 ±2,7	12,0 ±3,0	$3,4^{y}$ ±3,4 [28]

l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar; [n]: número de huevos; ^{A,B}: indican diferencias entre tasas de dilución (P<0,05); $^{\alpha,\beta}$: indican diferencias entre tipos de semen (P<0,05); ^{y,z}: indican diferencias entre grupos (TS x TD; P<0,05). *Los resultados se presentan como predicciones en la escala de los datos ± error estándar asociado.

EFFECT OF DILUTION RATE ON THE IN VITRO QUALITY AND THE FERTILIZING ABILITY OF FRESH AND CRYOPRESERVED SPERM FROM ROOSTERS BELONGING TO THE "GALLINA VALENCIANA DE CHULILLA" BREED

ABSTRACT: The glycerol (G; 11%; v:v) is a cryoprotectant which offers good results for the cryopreservation of local breed rooster sperm. In this study the in vitro quality and fertilizing ability of fresh and cryopreserved sperm processed with two different dilution rates (DR; 1:2,6 and 1:22) for the G removal were compared. The DR 1:2,6 exhibited higher *in vitro* quality than DR 1:22 and fresh sperm presented higher quality and fertility than cryopreserved sperm. In addition, an interaction between the type of semen and the DR was observed in the fertility rate, the fresh sperm exhibiting higher fertilizing ability with the high DR than with the low DR, while cryopreserved sperm presented similar fertilizing ability for both DR. In conclusion, the quality of the doses is higher if a low DR (1:2,6) is used but this quality at low DR does not translate into higher fertility.

Keywords*:* glycerol, chicken, fowl, semen.