

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE GALLO DE COMBATE: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL

Cryopreservation of Fighting rooster spermatozoa: effect of different concentrations of glycerol

Andrés Moscoso Piedra^{1*}, Jaime Reinoso León¹, Jorge Samaniego², Daniel Argudo Garzón¹,
Juan C. Alvarado¹, Diego A. Galarza²

¹ Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

² Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, EC010205, Cuenca, Ecuador.

*Corresponding author:
Andrés Moscoso Piedra.
Tel.: +593 74-09509; E-mail:
amoscosop@ucacue.edu.ec

Recibido: 23/02/2022

Aceptado: 19/05/2022

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

Glycerol (Gly) is the cryoprotective agent (CPA) most widely used to cryopreserve rooster semen. However, its cryoprotection, toxicity, and efficacy may vary in different breeds of roosters (e.g., fighting rooster). In this sense, this investigation evaluated the effect of different concentrations of Gly added to the Lake-Ravie extender on the kinetic variables and plasma membrane integrity (PMI, equivalent to viability) of rooster spermatozoa. A total of 42 semen ejaculates from 6 Spanish fighting roosters (collected in 7 weekly sessions) by dorsal massage technique were used to conform 7-pools. Each pool was divided into 6-aliquots and then 6 treatments were formed according to Gly concentrations: 0 (control), 2% (Gly-2), 4% (Gly-4), 6% (Gly-6), 8% (Gly-8), and 10% (Gly-10). The samples were frozen in static liquid nitrogen vapors, and their post-thaw sperm quality was analyzed using the CASA system (SCA-2018®) and Fluorescence (PI). Results after thawing showed that total (MT, %) and progressive (MP, %) motilities were higher ($P < 0.01$) with the Gly-8 treatment compared to the control group and the Gly-4 and Gly-6 treatments. Regarding the post-thaw kinetics, the oscillation (WOB, %) and the beat-cross frequency (BCF, Hz) were higher ($P < 0.05$) in the Gly-6, Gly-8, and Gly-10 treatments compared to their control. Finally, the PMI (%) was greater with the Gly-8 treatment compared to the Gly-2 treatment ($P < 0.05$) and the control group ($P < 0.01$). In conclusion, the addition of 8% glycerol to the freezing medium produced better sperm cryosurvival based on higher kinetics and integrity of the plasma membrane of fighting rooster spermatozoa.

Keywords: Fighting rooster, semen, glycerol, freezing, Lake-Ravie

RESUMEN

El glicerol (Gly) es el agente crioprotector (ACP) más utilizado para criopreservar semen de gallo. Sin embargo, su crioprotección, toxicidad y eficacia pueden variar en diferentes razas de gallos (Ej. gallo de combate). Por lo tanto, esta investigación evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Gly adicionando al diluyente Lake-Ravie sobre las variables cinéticas e integridad de la membrana plasmática (IMP, equivalente a la viabilidad) de espermatozoides de aves de combate. Un total de 42 eyaculados de 6 gallos de combate Españoles (recolectados en 7 sesiones semanales) mediante masaje dorsal, fueron usados para conformar 7 agrupaciones (pools). Cada pool fue dividido en 6 alícuotas y entonces 6 tratamientos fueron conformados según las concentraciones de GLY: 0 (control), 2% (Gly-2), 4% (Gly-4), 6% (Gly-6), 8% (Gly-8), y 10% (Gly-10). Las muestras fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido estático y analizadas su calidad espermática post-descongelación mediante el sistema CASA (SCA-2018®) y fluorescencia (PI). Los resultados después de la descongelación demostraron que la motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %) fueron mayores ($P < 0,01$) con el tratamiento Gly-8 comparado con el control y los tratamientos Gly-4 y Gly-6. En cuanto a la cinética, la oscilación (WOB, %) y la frecuencia de batida de flagelo (BCF, Hz) después de la descongelación fueron mayores ($P < 0,05$) en los tratamientos Gly-6, Gly-8 y Gly-10 en comparación con su control. Finalmente, la IMP (%) fue superior con el tratamiento Gly-8 comparada con Gly-2 ($P < 0,05$) y control ($P < 0,01$). En conclusión, la adición de glicerol al 8% al medio de congelación produjo una mejor criosupervivencia espermática basada en una mejor cinética e integridad de la membrana plasmática de espermatozoides de aves de combate.

Palabras claves: Aves de combate, semen, glicerol, congelación, Lake-Ravie

INTRODUCCION

La crianza de gallos de combate en el Ecuador ha ganado un especial interés por sus criadores y aficionados. En la región sur del Ecuador, se han identificado varios ecotipos de gallos de combate tales como chilenos, cubanos y puertorriqueños (Hernández-Encalada and Jara-Solano, 2019). El cruzamiento y mejora genética de esta raza han sido direccionados a aumentar las habilidades de combate. Sin embargo, hasta el momento, los cruzamientos de estas aves se siguen haciendo de manera tradicional mediante un apareamiento directo. La aplicación de biotecnologías reproductivas que permitan maximizar la eficiencia reproductiva en esta especie ha sido deficiente o nula en Ecuador. De hecho, en un estudio reciente se inició con la caracterización de las variables espermáticas de gallos de combate recolectados mediante el masaje dorsal y electroeyaculación (Moscoso et al., 2021). Este estudio constituye un primer paso para poder iniciar los procesos de criopreservación y la creación de bancos de dosis seminales de esta raza para aplicar en programas de inseminación artificial (IA).

Durante la criopreservación, los espermatozoides de gallo sufren varios cambios estructurales, bioquímicos y funcionales que reducen la motilidad, viabilidad y fertilidad (Glozzi et al., 2011). Para mitigar los efectos deletéreos propios de la criopreservación, la adición de los agentes crioprotectores (ACP) son indispensables para la criosupervivencia espermática. El glicerol (Gly) actúa como un ACP que evita la formación de cristales de hielo intracelular durante el proceso de congelación-descongelación, reduciendo en lo posible, los daños en los espermatozoides (Svoradová et al., 2018). Sin embargo, el glicerol al ser una sustancia química podría resultar tóxico en concentraciones no indicadas produciendo una disminución de la motilidad y fertilidad de los espermatozoides de gallo (Svoradová et al., 2018). El Gly es el ACP más utilizado en semen de gallo en concentraciones superiores al 8% (v/v) (Blesbois, 2007). Actuales protocolos de criopreservación de esperma de gallo utilizan una concentración de glicerol del 11% (Blesbois et al., 2008; Purdy et al., 2009; Long et al., 2010; Mocé et al., 2010). Sin embargo, existen reportes que indican que el semen de gallo congelado con 4% de glicerol (v/v), a pesar de tener una calidad espermática más baja, producen una capacidad de fertilización similar en comparación con las muestras procesadas con concentraciones más altas de glicerol (6 – 8%, v/v) (Blanch et al., 2014).

Por otro lado, otros autores observaron que la calidad y la capacidad fecundante de espermatozoides criopreservados con Gly o dimetilacetamida (DMA) varía según las razas de los gallos (Long, 2006; Blesbois et al., 2007). Una reciente investigación evaluó diferentes concentraciones de Gly (2, 4, 6 y 11%) sobre la criosupervivencia de espermatozoides de gallo de raza HeiFeng (China); los resultados demostraron que, a pesar de que los parámetros de calidad espermática *in vitro* (motilidad, cinética, viabilidad) fueron mejores con el 11% de gly, la fertilidad fue mayor con el 6% de Gly después de una IA (Wu et al., 2020). Por lo tanto, en virtud de la optimización de la criopreservación de esperma de gallo de combate, es necesario determinar qué concentración de Gly proporciona una mejor respuesta de motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de espermatozoides para preservarlos en bancos criogénicos. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes

concentraciones de glicerol (2, 4, 6, 8 y 10%, v/v) adicionados a un diluyente de base sintética sobre la motilidad, cinética e integridad de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de gallo de combate.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales y colección de semen

Seis gallos españoles de combate, sexualmente adultos, de 1 a 2 años de edad con un peso de $1,75 \pm 0,76$ kg y clínicamente sanos fueron usados en este experimento. Todos los gallos donantes fueron separados en jaulas individuales de malla metálica de $0,42 \text{ m}^3$ ($0,60 \times 0,70 \times 1,0$ m de largo, ancho y alto, respectivamente) alojados en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca ($2^{\circ}88'160''\text{S}$ $78^{\circ}9'58'18''\text{O}$, a 2600 metros sobre el nivel del mar). Todos los gallos recibieron las mismas condiciones de alimentación y manejo basado en 120 g / gallo / día de alimento comercial (16% de proteína cruda, 3% de grasa, 4% de fibra cruda) y acceso libre al agua. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Consejo Directivo de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca, y la investigación se llevó a cabo de acuerdo con el capítulo 7,8 del Código Sanitario para los animales terrestre de la OIE - 2019© (07/08/2019), relativo a la protección de los animales utilizados en los experimentos científicos.

Cuatro semanas antes del inicio del experimento, los gallos donantes fueron entrenados al método de recogida de semen mediante masaje dorsal. Antes de cada sesión se aplicó gentamicina directamente en la cloaca ($50 \mu\text{g/mL}$) para evitar la contaminación de las muestras, además de ello el animal fue sometido a un ayuno de 8 horas antes de cada colecta para evitar contaminación de las muestras. Este procedimiento fue realizado según lo detallado por Moscoso et al. (2021) y consistió en aplicar masajes dorsales repetitivos con una mano del operador, y al mismo tiempo hacer una presión directa sobre la cloaca con la otra mano. Se recogieron un total de 42 eyaculados de semen de seis gallos en siete sesiones semanales de colecta (7 eyaculados / gallo).

Procesamiento de semen y tratamientos

En cada sesión de colecta, los seis eyaculados de semen fueron agrupados para conformar un pool que inmediatamente fue pre-diluido (1:1) con el diluyente Lake-Ravie (glutamato de sodio [1,92 g], glucosa [0,8 g], acetato de magnesio $4\text{H}_2\text{O}$ [0,08 g], acetato de potasio [0,5 g], polivinilpirrolidona [Mr 10 000; 0,3 g] y 100 ml de H_2O [pH final 7,08, osmolalidad final 343 mOsm /kg]) (Lake and Ravie, 1984) a temperatura ambiente y enfriado a 5°C hasta transportar al laboratorio en un tiempo menor a 20 minutos. Una alícuota de pool crudo (sin diluir) fue tomada para calcular la concentración mediante conteo celular usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda- Königshofen, Germany). El procesamiento de las muestras espermáticas se desarrolló en dos pasos. El primer paso consistió en dividir cada pool en seis alícuotas de igual volumen y concentración inicial de 4 mL y 400×10^6 espermatozoides/mL respectivamente, ajustadas con el diluyente Lake-Ravie previamente enfriado. Estas muestras fueron mantenidas a 5°C durante 45 minutos. El segundo paso consistió en añadir a cada alícuota el mismo volumen inicial (4

mL) de diluyente Lake-Ravie adicionada con diferentes dosis crecientes de glicerol (0, 4, 8, 12, 16 y 20%, v/v) para conformar seis tratamientos: 0 (control), 2 (Gly-2), 4 (Gly-4), 6 (Gly-6), 8 (Gly-8) y 10 % (Gly-10) de glicerol con un volumen final de 8 mL y una concentración de 200×10^6 espermatozoides/mL. Con este propósito, las concentraciones finales de Gly y de espermatozoides fueron reducidas a la mitad. Todas las muestras expuestas a Gly en diferentes concentraciones fueron mantenidas en equilibrio a 5°C durante 10 minutos y entonces cargadas en pajuelas de 0,25 mL (IMV, L'Aigle, France) previamente identificadas y selladas con alcohol de polivinilo (Sigma P8136, St. Lois, MO, USA).

Congelación de pajuelas

Las pajuelas se congelaron utilizando dos rampas colocadas dentro de una caja criogénica de espuma de poliestireno de $31 \times 31 \times 30,3$ cm de largo, ancho y alto respectivamente, que contenía 3,4 L de nitrógeno líquido (NL₂) (hasta 4 cm de altura). El NL₂ se colocó previamente 30 min antes del proceso de congelación para equilibrar los vapores de NL₂ dentro de la caja criogénica. Las pajuelas se expusieron a los vapores de NL₂ y se colocaron en la primera rampa a 17 cm por encima de la superficie de NL₂ durante 4 minutos, y luego se colocaron en una segunda rampa inferior a 1 cm por encima de NL₂ durante 2 minutos más. Este protocolo de congelación en dos rampas generó dos velocidades de enfriamiento por aceleración: la primera rampa produjo una velocidad de enfriamiento de 7 °C/min (+5 °C hasta -35 °C); y la segunda rampa una velocidad de 60 °C/min (-35 °C hasta -140 °C). Finalmente, las pajuelas se sumergieron en NL₂ para enfriarlas a -196 °C y se mantuvieron durante tres meses hasta su análisis de calidad espermática post-descongelación (Santiago-Moreno et al., 2011).

Un total de 168 pajuelas fueron congeladas y analizadas considerando qué se utilizaron 4 pajuelas por cada tratamiento (6 tratamientos y 7 pools). Las descongelaciones fueron realizadas después de dos meses de su criopreservación sumergiendo las pajuelas en agua enfriada a 5 °C durante 3 minutos y entonces su contenido fue recogido en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y mantenido en refrigeración hasta su análisis de calidad espermática.

Análisis de calidad espermática

Los parámetros cinéticos de los espermatozoides de gallos de combate frescos y criopreservados con diferentes dosis de glicerol fueron analizados mediante el sistema CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4, software. Microptic S.L., Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse model 50i; contraste negativo). Para este propósito, 5 µL de cada muestra espermática fue colocada en un portaobjetos (22 °C) y se cubrió con un cubreobjetos. El sistema registró un mínimo de 3 campos y 200 trayectos de espermatozoides para cada muestra con un aumento de 10X (velocidad de adquisición de imágenes de 25 fotogramas / segundo). Se evaluaron los siguientes parámetros cinéticos espermáticos, tal como lo describieron previamente Moscoso et al. (2021): porcentaje de espermatozoides móviles totales (MT), porcentaje de espermatozoides progresivos (MP), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad de trayectoria promedio (VAP, µm/s), velocidad en rectilínea (VSL, µm/s), rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %), oscilación (WOB, %), amplitud del

desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm) y frecuencia de batida de flagelo (BCF, Hz).

La integridad de la membrana plasmática (IMP), equivalente a la viabilidad de los espermatozoides, fue analizada mediante microscopía de fluorescencia (contando 200 células), utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de súper alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.), utilizando yoduro de propidio (PI, Sigma P-4170) como se describió previamente por Ugarelli et al. (2017).

Análisis Estadístico

Un diseño completamente al azar (DCA) con 6 tratamientos, 7 repeticiones y 4 unidades experimentales (pajuelas descongeladas) por tratamiento fueron usados en el análisis de este estudio. Los análisis estadísticos fueron realizados en un software STATISTICA® versión 12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, EE. UU.) para Windows. Los datos de las variables espermáticas que no presentaron una distribución normal, determinadas por la prueba de Shapiro-Wilk, fueron transformaron a Arcoseno (variables paramétricas porcentuales) o Log-10 (variables paramétricas numéricas) previo a los análisis estadísticos. Un ANOVA unidireccional bajo un modelo lineal general (GLM) y la prueba PosHoc de Tukey fueron utilizados para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de glicerol (0, 2, 4, 6, 8 y 10%) sobre la calidad espermática post-descongelación. Asimismo, el valor del semen fresco fue incluido en la comparación múltiple para comprobar el efecto significativo de la criopreservación en los distintos parámetros cinéticos. La significación se fijó en $P < 0,05$. Todos los resultados están presentados como valores promedios $\pm$ EEM (error estándar de la media).

RESULTADOS

Los valores promedios $\pm$ EEM de los diferentes parámetros cinéticos evaluados en el sistema CASA se muestran en la Tabla 1. La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides criopreservados se expone en la Figura 1. Los resultados demostraron que, tanto las muestras frescas, como las muestras descongeladas del tratamiento Gly-8, produjeron porcentajes mayores ($P < 0,01$) de MT y MP que los tratamientos control, Gly-4 y Gly-6 post-descongelación. Sin embargo, los tratamientos Gly-2, Gly-8 y Gly-10, a pesar de ser menores, no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) de los porcentajes de MT y MP post-descongelación en comparación con las muestras frescas. Las velocidades (VCL, VAP y VSL) no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos y muestras frescas. El porcentaje de rectitud (STR) después de la descongelación fue mayor ($P < 0,05$) en los tratamientos Gly-2 y Gly-6 comparados con su contraparte control. Con la misma tendencia, el porcentaje de WOB y el valor de BCF después de la descongelación fueron mayores ($P < 0,05$) en los tratamientos Gly-6, Gly-8 y Gly-10 en comparación con su control.

El efecto crioprotector del glicerol se evidenció en todos los tratamientos de glicerol (Gly-2 a Gly-10) al mostrar porcentajes de IMP más altos ($P < 0,05$) comparados con su grupo control. No obstante, las muestras espermáticas criopreservadas con tratamiento Gly-8 mostró ser más efectivo en la criopreservación de espermatozoides de gallos de combate al producir un mayor porcentaje de IMP comparado

con el control ($P < 0,01$) y el tratamiento Gly-2 ($P < 0,05$) (Figura 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de espermatozoides de gallo de combate frescos y criopreservados usando el diluyente Lake-Ravie y la adición de concentraciones crecientes de glicerol (v/v).

Parámetros	Pool Fresco (n=7)	Post-descongelación					
		Tratamientos con Glicerol (v/v)					
		Gly-0 (n=28)	Gly-2 (n=28)	Gly-4 (n=28)	Gly-6 (n=28)	Gly-8 (n=28)	Gly-10 (n=28)
MT (%)***	90,0 ± 15,97 ^a	21,1 ± 6,81 ^e	53,1 ± 4,82 ^{abc}	46,2 ± 4,32 ^{bce}	47,3 ± 5,32 ^{bce}	68,1 ± 4,61 ^a	64,0 ± 5,05 ^{abc}
MP (%)**	55,3 ± 10,72 ^a	7,4 ± 4,57 ^c	29,5 ± 3,23 ^{ab}	20,1 ± 3,23 ^{bc}	20,7 ± 3,57 ^{bc}	32,0 ± 3,10 ^{ab}	23,0 ± 3,39 ^{abc}
VCL (μm/s)	75,0 ± 11,36	58,4 ± 4,84	62,3 ± 3,43	57,0 ± 3,43	57,7 ± 3,79	63,3 ± 3,28	52,3 ± 3,59
VAP (μm/s)	61,3 ± 10,93	40,7 ± 4,66	50,8 ± 3,30	45,5 ± 3,30	48,2 ± 3,64	51,0 ± 3,16	40,2 ± 3,46
VSL (μm/s)	53,2 ± 10,14	35,2 ± 4,33	43,4 ± 3,06	39,0 ± 3,06	42,3 ± 3,38	44,8 ± 2,93	33,9 ± 3,21
STR (%)**	80,7 ± 6,36 ^{ab}	71,3 ± 2,71 ^b	78,1 ± 1,92 ^a	76,2 ± 1,92 ^{ab}	77,0 ± 2,12 ^a	76,1 ± 1,84 ^{ab}	73,3 ± 2,01 ^{ab}
LIN (%)	64,6 ± 6,68	54,9 ± 2,85	60,6 ± 2,01	59,2 ± 2,01	61,5 ± 2,23	61,7 ± 1,93	58,3 ± 2,11
WOB (%)*	77,4 ± 4,83 ^{ab}	67,2 ± 2,06 ^b	73,8 ± 1,45 ^{ab}	73,5 ± 1,45 ^{ab}	74,9 ± 1,61 ^a	74,9 ± 1,39 ^a	73,0 ± 1,53 ^a
ALH (μm)	2,3 ± 0,29	2,3 ± 0,12	2,1 ± 0,09	1,9 ± 0,09	1,9 ± 0,10	2,1 ± 0,08	2,0 ± 0,09
BCF (Hz)*	7,8 ± 4,31 ^{ab}	5,4 ± 1,84 ^b	6,9 ± 1,30 ^{ab}	6,5 ± 1,30 ^{ab}	6,7 ± 1,44 ^a	7,1 ± 1,24 ^a	9,9 ± 1,36 ^a

MT: motilidad total; MP: motilidad progresiva; VCL: velocidad con trayectoria curvilínea; VAP: velocidad promedio; VSL: velocidad con trayectoria rectilínea; STR: rectitud; LIN: linealidad; WOB: oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; y BCF: frecuencia de batida de flagelo. Letras Diferentes en cada fila y en cada parámetro difieren estadísticamente según ANOVA y la prueba de Tukey (a – e, $P < 0,05$).

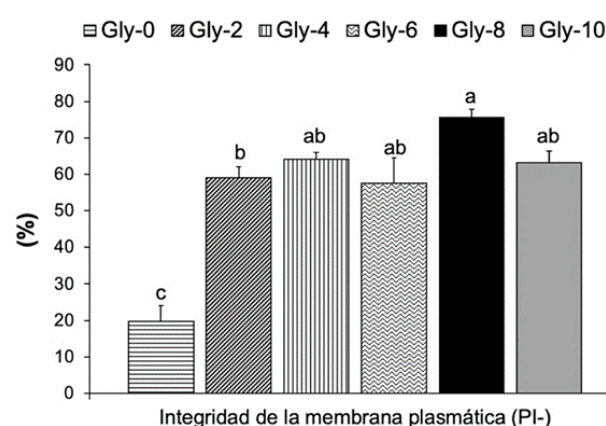


Figura 1. Integridad de la membrana plasmática (tinción fluorescente con ioduro de propidio, PI-) de espermatozoides de gallo de combate criopreservados con diferentes concentraciones de glicerol (0, 2, 4, 6, 8 y 10%, v/v) adicionado al diluyente Lake-Ravie. Letras diferentes en cada barra expresa diferencias significativas, a – b, $P < 0,05$; a – c, $P < 0,01$; ab – c, $P < 0,05$.

En general, una reducción ($P < 0,001$) significativa de los porcentajes de motilidad total (MT) y progresiva (MP) fueron evidenciados después de la descongelación en las muestras espermáticas congeladas sin glicerol (control) y con el 4% (Gly-

4) y 6% (Gly-6). Asimismo, las muestras espermáticas congeladas con el 8% de glicerol (Gly-8) mostró porcentajes más altos de MT que aquellas muestras congeladas sin glicerol (control, $P < 0,001$), y con 4 y 6 % de glicerol ($P > 0,05$). Con la misma tendencia, el porcentaje de MP fue superior ($P < 0,05$) después de congelar las muestras espermáticas con el 2% (Gly-2) y 8% (Gly-8) de glicerol en comparación con las muestras congeladas sin glicerol (control) (Fig. 1)

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demuestran que, en comparación con los espermatozoides frescos, los espermatozoides criopreservados con dosis altas de glicerol, 8 % (Gly-8) y 10% (Gly-10) sufren menos reducciones de calidad espermática en términos de motilidad y cinética espermática. De hecho, la adición de glicerol al 8% (v/v) al diluyente de base sintética Lake-Ravie y la congelación de los espermatozoides de gallo de combate en pajuelas de 0,25 ml en vapores de NL_2 estático en un sistema de dos rampas de congelamiento, produjo mejores resultados de criosupervivencia celular basado en una mejor cinética (ej. MT y MP) e integridad de la membrana plasmática (ej. IMP). A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, Abouelezz et al. (2015), Hammerstedt y Graham, (1992), Blesbois y Brillard, (2007) y Mphaphathi et al. (2012) usaron concentraciones altas de glicerol (ej. 8% a 11%, v/v), y

entonces demostraron que la viabilidad y motilidad espermática sufrieron una reducción significativa de sus valores (aproximadamente, se redujeron un 40 a 50% de sus valores iniciales).

El Gly es un ACP penetrante que beneficia especialmente al espermatozoide de aves a controlar la formación de cristales de hielo intracelular (letales) y las velocidades de tendencia del agua a través de las membranas plasmática en el proceso de congelamiento y el descongelamiento (Levin and Miller 1981; Woelders et al., 2006). Asimismo, el Gly ayuda a proteger el contenido de ATP celular y la retención de las macromoléculas superficiales fundamentales para evitar el daño criogénico y decadencia estructural (Hammerstedt y Graham, 1992).

En las últimas décadas, el glicerol ha constituido el ACP más utilizado para criopreservar semen de gallo proporcionando una buena crioprotección al espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación. A pesar de existir otros ACP efectivos distintos al glicerol (ej. DMA, *N*-metilacetamida) que se usan para la criopreservación de los espermatozoides de gallo (Woelders et al., 2006; Sasaki et al., 2010; Santiago-Moreno et al., 2011), el glicerol 8% (v/v) se sigue usando en la actualidad para criopreservar semen de gallo, y su eficacia incluso se compara con el DMA, independientemente si su forma de adición a la muestra espermática es directa o diluida en porciones (Behnamifar et al., 2021). Sin embargo, otros autores recomiendan concentraciones más altas (11%) en razas de gallos en peligro de extinción y su respuesta exhibió una gran variabilidad en la criosupervivencia de sus espermatozoides (Long, 2006; Blesbois et al., 2007). Por otro lado, se ha usado aditivos como la (metilcelulosa) como absorbente de humedad junto con el glicerol para mejorar la supervivencia espermática y se demostró que esta adición reduce los efectos anticonceptivos del Gly cuando se insemina con semen fresco, pero no mantiene la capacidad fertilizante en semen congelado-descongelado cuando se usa en combinación con 3 o 4% de glicerol (Phillips et al., 1996). Por tanto, los protocolos de criopreservación de semen de gallo son susceptibles de ser optimizados, al menos cuando se utilizan con razas especiales o de difícil manipulación como es el gallo de combate.

Reportes previos han demostrado que al usar altas concentraciones de Gly (> 11%) para criopreservar espermatozoides de gallo, permite lograr un alta criosupervivencia espermática pero los resultados de fertilidad son más deseables cuando la concentración de glicerol es menor (ej. 4%) (Blanch et al., 2012; Tomás et al. 2013). Blanch et al. (2014) demostraron que el semen de gallo de la raza "Gallina Valenciana de Chulilla" congelado con el 6 al 8% (v/v) de glicerol obtuvo mejores porcentajes de calidad espermática (motilidad e integridad de membrana espermática), sin embargo, con el 4% de Gly mostró una calidad seminal más baja, pero con una capacidad de fertilización similar a las altas concentraciones de Gly. Además, se demostró que el semen de gallo congelado con el 4 y 6% de Gly no fueron suficientes para proteger completamente la membrana plasmática del espermatozoide y la función de motilidad del daño criogénico (Blanch et al., 2014). Por esta razón, los actuales protocolos de criopreservación de semen de gallo usan concentraciones de Gly entre el 8 y 11%, sin embargo, para su uso en la IA, el semen descongelado es

centrifugado antes de su deposición en el oviducto. El presente trabajo demostró que suplementando con 8% de glicerol a un diluyente de base sintética se obtuvo los resultados más deseables de motilidad, cinética e integridad de membrana plasmática, siendo consistentes con los resultados de los trabajos antes mencionados.

Los resultados obtenidos en esta investigación son sólidos confirmando que altas concentraciones de glicerol 8 % (Gly-8) y 10 % (Gly10) producen una mejor cinética como la MT y ALH (batida del flagelo) comparado con las dosis bajas o sin glicerol (control). De hecho, con el 8% de glicerol se consiguió una mayor integridad de la membrana plasmática comparado con los otros tratamientos de menor concentración de Gly. Es importante considerar que los factores "raza" e individuo (macho) podrían influir en el momento de la criopreservación a diferencia de los resultados obtenidos en razas ya definidas (Blesbois, 2007). En efecto, nosotros especulamos que esta raza de gallo podría influir en la congelabilidad de los espermatozoides debido a que no es una raza completamente estudiada ni definida, como ya se ha demostrado en otras razas de gallos en referencia a la calidad del semen, respuesta a la congelación-descongelación de espermatozoides y la capacidad de fecundación (Long, 2006). Así mismo otros autores concuerdan que concentraciones bajas de glicerol tienen la capacidad de sintetizar y metabolizar el glicerol para convertirlo en una fuente de energía extra para los espermatozoides (Mohri y Masaki, 1967). Finalmente, los resultados de esta investigación son un punto de partida para la optimización de la criopreservación de espermatozoides de aves de combate, dado que su raza y condiciones de manejo (alta competencia y temperamento) constituyen un hándicap al momento de iniciar programas de cruzamiento y mejora genética en gallos utilizando material genético crio preservado.

CONCLUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demostraron que la congelación espermatozoides de gallo de combate con el 8% de glicerol produjo una mejor criosupervivencia espermática basada en mejor motilidad, cinética e integridad de la membrana plasmática.

Contribuciones de los autores

Preparación y ejecución: JR, AG, AM; Desarrollo de la metodología: AM, AG; Concepción y diseño: DA, JA; Edición del artículo: AG, AM; Supervisión del estudio: JS, AG, AM.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento al Laboratorio de biotecnologías de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad de Cuenca, por la colaboración en esta investigación para la evaluación de los parámetros cinéticos.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration

- and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015; 50(1): 135–41.
- Blanch E, Tomás C, Casares L, Gómez EA, Sansano S, Giménez I, Mocé E. Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed “Gallina Valenciana de Chulilla” using low glycerol concentrations. *Theriogenology*. 2014; 81(9): 1174–80.
 - Blanch E, Tomás C, Casares-Crespo L, Gómez EA, Sansano S, Giménez I, Mocé E. Effect of glycerol level on quality and fertilizing ability of cryopreserved rooster sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47:121
 - Behnamifar A, Bernal B, Torres O, Luis-Chincoya H, Gil MM, García-Casado P, Rahimi S, Woelders H, Santiago-Moreno, J. Research Note: Evaluation of two methods for adding cryoprotectant to semen and effects of bovine serum albumin on quality characteristics of cryopreserved rooster spermatozoa. *Poultry Science*. 2021; 100(6): 101093.
 - Blesbois E. Current Status in Avian Semen Cryopreservation. *World's Poultry Sci J*. 2007;63: 213–22.
 - Blesbois E, Brillard JP. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*. 2007; 1(10): 1472–1481.
 - Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*. 2008; 69:252–61.
 - Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Coquerelle G, Rault P, Tixier-Boichard M. Semen cryopreservation for ex-situ management of genetic diversity in chicken. *Poult Sci*. 2007;87:555–64.
 - Gliozzi TM, Zaniboni L, Cerolini S. DNA Fragmentation in Chicken Spermatozoa during Cryopreservation. *Theriogenology*. 2011; 75(9): 1613–22.
 - Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29:26–38.
 - Hernández-Encalada CS, Jara-Solano DI. Caracterización genética de gallos de pelea (*Gallus gallus*) del cantón Cuenca mediante mtDNA D-Loop. (Bachelor's thesis). 2019. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/33542>
 - Lake PE, Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci*. 1984; 25: 145–150
 - Levin RL, Miller TW. An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells. *Cryobiology*. 1981; 18(1): 32–48.
 - Long JA. Avian sperm cryopreservation: what are the biological challenges. *Poult Sci*. 2006; 85: 232–6.
 - Long JA, Bongalhardo DC, Peláez J, Saxena S, Settar P, O'Sullivan NP, Fulton JE. Rooster semen cryopreservation: effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poult Sci*. 2010; 89: 966–73
 - Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim Reprod Sci*. 2010; 122: 359–66.
 - Mohri H, Masaki J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. *Reproduction*. 1967; 14(2): 179–194.
 - Moscoso A, Muñoz M, Argudo D, Samaniego J, Maldonado M, Cabrera B, Alvarado JC, Galarza DA. Comparison of characterization of fighting rooster (*Gallus gallus*) semen ejaculates recovered by electroejaculation and dorsal massage techniques. *Spermova*. 2021; 11(1): 32–38
 - Mphaphathi ML, Luseba D, Sutherland B, Nedambale TL. Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. *Open Journal of Animal Sciences*. 2012; 2(3): 204–10.
 - Phillips JJ, Bramwell RK, Graham JK. Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poultry Science*. 1996; 75(7): 915–23.
 - Purdy PH, Song Y, Silversides FG, Blackburn HD. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poult Sci*. 2009; 88: 2184–91
 - Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, Campo JL. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult. Sci*. 2011; 90: 2047–2053.
 - Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y. A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using nmethylacetamide as a cryoprotective agent. *J Poult Sci*. 2010; 47: 297–301.
 - Svoradová A, Kuželová L, Vašíček J, Baláži A, Hanusová E, Chrenek P. In vitro effect of various cryoprotectants on the semen quality of endangered Oravka chicken. *Zygote*. 2018; 26(1): 33–39
 - Tomás C, Blanch E, Casares L, Gómez EA, Sansano S, Giménez I, Mocé E. Efecto de la concentración de glicerol y de la tasa de dilución sobre la calidad *in vitro* y la capacidad fecundante del semen criopreservado de gallos de raza gallina valenciana de Chulilla. In: Calvo JH, Casas I, Joy M, Álvarez J, Varona L, Panea B, editors. *XV Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario; 2013: 425–7
 - Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de Alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2017; 28(1): 130.
 - Woelders H, Zuidberg CA, Hiemstra SJ. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poult Sci*. 2006; 85: 216–22.
 - Wu BX, Yang XH, Yan HF. Improving the quality of rooster semen frozen in straws by screening the glycerol concentration and freezing rate. *British Poultry Science*. 2020; 61(2): 173–179.