

Efecto de la L-carnitina y la melatonina sobre la criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides de gallos criollos (*Gallus gallus domesticus*)

Diego A. Galarza¹  , Luis M. Guachichullca  , Juan P. Hernández  

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

Effect of L-carnitine and melatonin on cryosurvival and fertility of spermatozoa of creole roosters (*Gallus gallus domesticus*)

Introducción

La producción de pollo criollo (*Gallus gallus domesticus*) en el Ecuador es de trascendental importancia en la economía y nutrición de las familias rurales y citadinas. El pollo criollo ha sido considerado como un valioso recurso genético en la producción de traspato, constituyendo un importante recurso económico y un producto básico en la dieta tradicional (Toalombo, 2020). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas biotecnológicas para maximizar el uso de este material genético autóctono. La criopreservación espermática e inseminación artificial (IA) de aves ha sido usado satisfactoriamente en gallinas de diferentes razas (Ehling et al., 2012); sin embargo, hasta donde conocemos, el uso de estas biotecnologías reproductivas en aves criollas en Ecuador, es deficiente o nula.

El choque de frío y el estrés oxidativo son los principales factores que causan degeneración celular durante la criopreservación de espermatozoides aviares. Estos daños ocurren a nivel de la membrana plasmática, membrana mitocondrial y acrosoma (Blesbois, 2007). Una respuesta a estos efectos se basa en el incremento del estrés oxidativo debido a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los espermatozoides aviares se hacen vulnerables a los radicales libres (ej. H_2O_2 , O_2^- y OH^-) debido a los ácidos grasos poliinsatu-

rados (PUFA) presentes en la membrana plasmática (Partyka et al., 2012). Consecuentemente, las ROS se combinan fácilmente con los PUFA y conducen a la producción de una peroxidación lipídica (LPO) (Ansari et al., 2019), causando una disminución de la motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides de gallo (Blesbois, 2007).

La *L-carnitina* (LC), un aminoácido resultante de la síntesis de la metionina y lisina, que desempeña un papel importante en la preservación de la integridad de la membrana, función mitocondrial y la inhibición de la apoptosis (Surai, 2015). Reportes previos han evidenciado que la LC estimula la motilidad de espermatozoides aviares (Fattah et al., 2017); además posee un efecto crioprotector en concentración de 1 a 5 mM suplementando al diluyente de congelación (Partyka et al., 2012). Por otro lado, la melatonina (ME), otro poderoso antioxidante que neutraliza los efectos tóxicos de ROS ha sido usado para preservar la integridad mitocondrial y a ayuda a mantener las funciones en espermatozoides aviar a una concentración óptima de 10 μ M (Mehaisen et al., 2020).

En este sentido, esta investigación evaluó los efectos de la ME y LC suplementado al medio de congelación sobre la criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides de gallos criollos (*Gallus gallus domesticus*).

Palabras clave: pollo criollo, criopreservación espermática, *L-carnitina*, motilidad, fertilidad

¹ Autor para la correspondencia: andres.galarza@ucuenca.edu.ec

Materiales y Métodos

Sesenta eyaculados de semen de 10 gallos criollos adultos (8 – 24 meses) recolectados mediante masaje dorsal (en 6 sesiones) fueron usados para conformar 12 agrupaciones (pools). Cada pool fue dividido en tres alícuotas y cada una de ellas diluidas con el diluyente Lake-Ravie (Lake y Ravie, 1984) suplementado con 10 μ M de ME, 5 mM de LC o no suplementado (control). Las muestras de cada grupo fueron congeladas utilizando dos rampas colocadas dentro de una caja criogénica de 31 $\times$ 31 $\times$ 30,3 cm de largo, ancho y alto respectivamente, que contenía 3,4 L de nitrógeno líquido (NL₂). Las muestras de cada grupo fueron cargadas en pajuelas de 0,25 ml y expuestas a vapores de NL₂; 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. Un total de 360 pajuelas fueron congeladas: ME (n=120 pajuelas), LC (n=120 pajuelas) y control (n=120 pajuelas). La mitad de las pajuelas fueron descongeladas y analizadas su cinemática espermática e integridad de la membrana plasmática (equivalente a la viabilidad) mediante el uso del sistema CASA (SCA-Evolution 2018®) y la prueba fluorescente con yoduro de propidio, respectivamente. La otra mitad de las pajuelas sirvieron para evaluar la fertilidad después de inseminar artificialmente 30 gallinas ponedoras (10 gallinas / tratamiento) en 6 sesiones consecuentes cada 3 días usando una concentración de 300 $\times$ 10⁶ espermatozoides/gallina.

Resultados y Discusión

La LC estimuló la motilidad y protegió a los espermatozoides después del proceso de congelación – descongelación. Después de la descongelación, la LC incrementó ($P < 0,05$) la motilidad progresiva comparado con el control. De hecho, la adición de LC no varió las velocidades (curvilínea [VCL] promedio [VAP] y rectilínea [VSL], $P > 0,05$) comparado con los valores en fresco (Tabla 1). Ambos, la LC y ME incrementaron la

integridad de la membrana plasmática (viabilidad) comparado con el control ($44,1 \pm 1,95\%$ y $42,0 \pm 1,90\%$ vs. $34,6 \pm 1,90\%$, respectivamente). Los diluyentes que se usan para refrigerar o congelar espermatozoides de aves deben complementarse con antioxidantes como la ME (Mehaisen et al., 2020) o LC (Fattah et al., 2017) para mitigar y superar los efectos nocivos de la criopreservación, como la LPO. Las propiedades antioxidantes de LC

Tabla 1. Parámetros cinemáticos de espermatozoides de gallo criollo frescos y criopreservados con Melatonina (ME) y L-carnitina (LC).

Parámetros	Fresco			Congelado / descongelado		
	Control (n=10)	ME (n=10)	L-C (n=10)	Control (n=60)	ME (n=60)	L-C (n=60)
MT (%)	74,0 $\pm$ 4,94 ^a	72,7 $\pm$ 6,06 ^a	77,9 $\pm$ 3,47 ^{ab}	48,0 $\pm$ 4,40 ^c	50,9 $\pm$ 3,71 ^c	58,5 $\pm$ 3,88 ^{bc}
MP (%)	18,5 $\pm$ 3,47 ^{ab}	18,4 $\pm$ 3,08 ^{ab}	22,0 $\pm$ 2,74 ^a	4,9 $\pm$ 0,70 ^d	10,9 $\pm$ 1,25 ^{cd}	13,1 $\pm$ 0,82 ^{bc}
VCL (μ m/s)	42,9 $\pm$ 2,81 ^{ab}	42,5 $\pm$ 3,70 ^{ab}	50,6 $\pm$ 2,83 ^a	27,8 $\pm$ 1,22 ^c	26,7 $\pm$ 1,55 ^c	31,2 $\pm$ 2,35 ^{bc}
VAP (μ m/s)	25,5 $\pm$ 1,89 ^a	25,1 $\pm$ 2,86 ^{ab}	30,6 $\pm$ 2,36 ^a	14,8 $\pm$ 0,83 ^c	14,3 $\pm$ 1,27 ^c	17,2 $\pm$ 1,27 ^{bc}
VSL (μ m/s)	16,6 $\pm$ 1,80 ^a	15,7 $\pm$ 2,68 ^{ab}	19,6 $\pm$ 2,39 ^a	7,9 $\pm$ 0,55 ^c	8,5 $\pm$ 1,21 ^c	9,6 $\pm$ 0,71 ^{bc}
STR (%)	56,2 $\pm$ 3,24	53,2 $\pm$ 3,67	56,5 $\pm$ 3,07	48,1 $\pm$ 2,10	51,1 $\pm$ 2,50	51,6 $\pm$ 1,57
LIN (%)	37,0 $\pm$ 3,43	34,3 $\pm$ 3,66	37,1 $\pm$ 3,18	29,7 $\pm$ 1,75	29,4 $\pm$ 2,08	31,3 $\pm$ 1,45
WOB (%)	58,4 $\pm$ 2,47	56,8 $\pm$ 2,88	59,7 $\pm$ 2,18	53,8 $\pm$ 1,89	51,3 $\pm$ 2,25	54,8 $\pm$ 1,50
ALH (μ m)	2,24 $\pm$ 0,16 ^{ab}	2,24 $\pm$ 0,15 ^{ab}	2,56 $\pm$ 0,13 ^a	1,74 $\pm$ 0,06 ^c	1,60 $\pm$ 0,06 ^c	1,89 $\pm$ 0,11 ^{bc}
BCF (Hz)	4,72 $\pm$ 0,41 ^a	4,33 $\pm$ 0,41 ^a	4,78 $\pm$ 0,42 ^a	2,72 $\pm$ 0,19 ^b	2,60 $\pm$ 0,10 ^b	2,95 $\pm$ 1,17 ^b

MT, motilidad total; MP, motilidad progresiva; VCL, velocidad curvilínea; VAP, velocidad promedio; VSL, velocidad rectilínea; STR, rectitud; LIN, linealidad; WOB, oscilación; ALH, desplazamiento lateral de la cabeza; y BCF, frecuencia de batida del flagelo. Diferentes superíndices en cada fila indica diferencias significativas entre tratamientos en cada parámetro cinemático (a – b – c, $P < 0,05$; a – c, $P < 0,01$).



incluyen la eliminación de radicales libres, la destrucción de peróxidos y la quelación de metales. La LC también preserva la integridad de la membrana plasmática, la función mitocondrial y la inhibición de la apoptosis (Surai, 2015). Los resultados de esta investigación son consistentes a los reportes anteriores.

Reportes anteriores han demostrado que la adición de ME al medio de congelación mejoró la motilidad (Mehaisen et al., 2020) y la integridad de la membrana plasmática (Appiah et al., 2019); sin embargo, los resultados de esta investigación demostraron que la ME sólo mejoró la viabilidad. Posiblemente, la raza puede ser un factor influyente en los parámetros cinemáticos y la ME.

Las gallinas inseminadas artificialmente con semen criopreservado de gallo suplementado con LC incrementó ($P < 0,05$) la fertilidad comparado con el semen criopreservado sin antioxidante (control) o con ME ($17,8 \pm 4,05\%$ vs. $3,6 \pm 2,06\%$ y $6,9 \pm 2,52\%$, respectivamente) (Fig. 1).

La fertilidad del semen de gallo refrigerado ha sido mejorado adicionando 1mM y 2 mM de LC al diluyente (Fattah et al., 2017), en nuestra investigación, sin embargo, obtuvimos una mayor

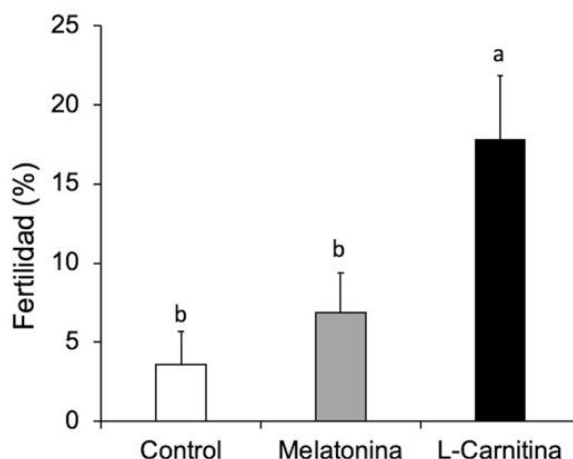


Fig.1. Fertilidad lograda con de muestras criopreservadas con LC, ME y control después de una IA. Letras diferentes en cada barra indica diferencias significativas entre tratamientos (a – b, $P < 0,05$).

fertilidad con 5 mM de LC después congelar y descongelar semen de gallo criollo. No obstante, varios factores pueden influir en la fertilidad tales como como la raza (gallina), la técnica utilizada, el número de espermatozoides, los factores ambientales, la profundidad de la deposición del semen entre otros (Chalah et al., 2009).

Conclusión

La adición de L-carnitina al medio de congelación incrementó la progresividad, integridad de la membrana plasmática y la fertilidad de los

espermatozoides de gallo criollo. Sin embargo, la adición de la ME al medio de congelación, solamente mejoró la viabilidad espermática

Literatura Citada

- Ansari, M., B. Rakha, S. Akhter, E. Blesbois, and J. Santiago-Moreno. 2019. Effect of cryopreservation on lipid peroxidation, antioxidant potential, chromatin integrity, and mitochondrial activity of indian red jungle fowl (*Gallus murghi*) Semen. Biopreservation and Biobanking, 17(4), 288–295.
<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0111>
- Appiah, M. O., B. He, W. Lu, and J. Wang. 2019. Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen. Cryobiology, 89 90–95.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.05.001>
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poultry Science Journal, 63(2), 213–222.
<https://doi.org/10.1017/S0043933907001419>
- Chalah, T., F. Seigneurin, E. Blesbois, and J. P. Brillard. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. Cryobiology, 39(2), 185–191.
<https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2201>
- Ehling, C., U. Taylor, S. Baulain, S. Weigend, M. Henning, and D. Rath. 2012. Cryopreservation

- of semen from genetic resource chicken lines. *Agric. For. Res.* 62, 151-158.
- Fattah, A., M. Sharafi, R. Masoudi, A. Shahverdi, V. Esmaili, and A. Najafi. 2017. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.009>
- Lake, P. E., and O. Ravie. 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci.* 25(1):145–150. <https://doi.org/10.1080/13632758408454852>
- Mehaisen, G. M. K., A. Partyka, Z. Ligocka, and W. Nizański. 2020. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106238>
- Partyka, A., E. Łukaszewicz, and W. Nizański. 2012. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134(3–4), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.007>
- Surai, P. F. 2015. Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications. *EC Veterinary Science* 2(1): 66-84.
- Toalombo, P. A. 2020. Caracterización morfológica, productiva y genética de la gallina criolla del Ecuador. Universidad de Córdoba, UCOPress. <https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>