

Criopreservación de semen de Pardo e Indio de León en su área de origen del Valle de Curueño.

B. BERNAL^{1*}, C. CASTAÑO¹, M.C. ESTESO¹, A. TOLEDANO-DÍAZ¹, M.A. DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ², M.G. GIL³, S. DÁVILA³, J.L. CAMPO³, y J. SANTIAGO-MORENO¹.

¹Departamento de Reproducción Animal, INIA, 28040 Madrid, ²Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, 47002, Valladolid, ³Departamento de Mejora Genética, INIA, 28040 Madrid, España.

*Autor corresponsal: berenice.bernal@inia.es

Birchen Leonesa and Blue Leonesa chicken breeds are highly esteemed for their unique feather, ideal for making flies for trout fishing; unfortunately, both breeds are among the endangered Spanish breeds. Ex-situ cryopreservation of sperm cells in gene-banks is an alternative for conservation of these breeds. However, besides the breed, multiple factors, such as the nutrition degree of individuals, housing conditions, health status and inbreeding may affect the quality of fresh semen and success of cryopreservation. Thus, it is hypothesized that roosters of the same breed belonging to different breeders may present important differences in their resistance to freezing. The present work focused on the characterization and cryopreservation of Birchen Leonesa and Blue Leonesa rooster sperm belonging to 4 different breeders from Curueño Valley (León, Spain). A minimum of 5 rooster varieties per breeder were analyzed. The sperm analysis in fresh samples included semen volume, sperm concentration, subjective motility and score, viability and acrosomal integrity. Post-thawed analysis incorporated CASA variables, and determination of DNA fragmentation. Significant breed differences were found in the sperm volume ($p < 0.01$), with Blue Leonesa breed showing the highest values. The remaining fresh semen variables did not show significant differences. For the post-thawed variables, significant differences were found in sperm viability regarding the breeder ($p < 0.01$), but without any influence of the breed. DNA fragmentation rate showed significant differences between breeders ($p < 0.05$). Overall results revealed higher cryoresistance in the population of one of the breeders. In conclusion, the management system carried out by breeders seems to be determinant in the fecundating capacity of the males and in the effectiveness of carrying out a germplasm bank.

Keywords: gametic characterization; cryopreservation.

Introducción

Las razas de gallo Indio y Pardo de León son altamente valoradas por su pluma única, ideal para la confección de moscas para la pesca de la trucha. Ambas razas se encuentran incluidas en el Catálogo de Razas de Ganado de España dentro del Grupo de Razas Autóctonas en Peligro de Extinción, centrándose su producción en la zona del Valle de Curueño de la provincia de León. La conservación ex-situ de ambas razas a través de un banco de recursos genéticos (Watson y Holt, 2001) podría ayudar a garantizar su conservación y es de especial importancia dados los riesgos de epizootias tales como la gripe aviar (Santiago-Moreno et. al., 2009). Si bien los espermatozoides son las células sexuales más accesibles y las principalmente conservadas en este tipo de bancos (Bakst y Sexton, 1979, Blesbois et. al., 2007), el estrés térmico, osmótico y mecánico generado durante la criogenización, comprometen su integridad y funcionalidad tras la descongelación. Por este motivo la criopreservación de espermatozoides, especialmente de aves, exige una calidad muy alta del semen recién recolectado.

Múltiples factores; tales como el tipo de nutrición de los individuos, las condiciones de alojamiento, el estado de salud y la consanguinidad., pueden afectar la calidad del semen fresco influyendo así en el

éxito de la criopreservación. De este modo, gallos pertenecientes a distintos criadores pueden presentar diferencias en las variables del semen fresco así como responder de manera distinta a la congelación. En el presente estudio se presentan los resultados obtenidos sobre la calidad espermática de las razas Indio y Pardo de León de 4 criadores diferentes (A-D).

Materiales y Métodos

Se recogió semen en tubos de centrifuga graduados de 15 mL (Sterilin, Ltd, Newport, UK) utilizando la técnica de masaje descrito por Burrows y Quinn (1937). Se obtuvo un pool por cada variedad, raza y criador, obteniendo un total de 30 pools (Tabla 1). Cada pool se diluyó a razón 1:1 (v/v) utilizando el diluyente Lake-Ravie-84 que comprende glutamato de sodio (1.92 g), glucosa (0.8 g), acetato de magnesio·4H₂O (0.08g), acetato de potasio (0.5 g), polivinilpirrolidona [masa molecular relativa (Mr) = 10 000] (0.3 g) y H₂O (100 mL) (pH final 7,08, osmolalidad 343 mOsm/Kg) (Lake y Ravie, 1984). Para evitar cualquier choque de temperatura, el diluyente se mantuvo en la mano del operador. Una vez diluido el semen, se mantuvo a 5 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de campo donde se determinaron la concentración y las variables espermáticas (motilidad, viabilidad de membrana e integridad acrosomal).

El porcentaje de motilidad y la calidad del movimiento espermático se evaluaron de manera subjetiva. La calidad del movimiento (score) se puntuó en una escala de 0 a 5 (Santiago-Moreno et. al. 2011). La motilidad espermática del semen descongelado se analizó tal como se había descrito anteriormente (Santiago-Moreno et. al., 2012) utilizando el sistema de análisis computarizado de imagen (CASA Computer Aided Semen Analysis) acoplado a un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, contraste negativo), equipado con una platina térmica a 37 °C y una cámara digital Basler A312fc. Las imágenes se capturaron y analizaron utilizando el software Sperm Class Analyzer SCA2002[®] v. 4.0 (Microptic S.L., Barcelona, España). Para el análisis mediante CASA, las muestras de semen se diluyeron en un rango de 1: 10 a 1: 40 (v / v), según se requiriera, en Lake-Ravie-84 y se cargaron en una leja de 8 cámaras precalentada (37 °C) de 20 µL (Leja Products B.V). Se registró el porcentaje de espermatozoides inmóviles, espermatozoides móviles no progresivos y espermatozoides móviles progresivos. Igualmente se registraron las características espermáticas de velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad promedio de trayectoria (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH) y frecuencia de batido (BCF). De las tres medidas de velocidad se calcularon, en porcentaje, tres índices de progresión: linealidad (LIN= VSL/VCL×100), rectitud (STR=VSL/VAP×100) y oscilación (WOB= VAP/VCL×100). Se analizaron 3 campos a una magnificación 100x incluyendo 200 espermatozoides en total.

La evaluación de la integridad de membrana plasmática se realizó mediante la tinción de eosina-nigrosina (Campbell et al., 1956). Las células intactas excluyen la eosina mientras que las células muertas (aquellas con la membrana plasmática dañada) permiten la entrada de eosina tiñéndose de color rosado. La nigrosina se utiliza como contratinción para facilitar la visibilidad de las células vivas no teñidas (blancas). Los frotis teñidos se analizaron en microscopio de campo claro (Motic BA210) a una magnificación de 1000x. Para determinar la viabilidad, se contaron un total de 200 espermatozoides. Los espermatozoides blancos se contaron como espermatozoides vivos, y aquellos que mostraron cualquier grado de coloración rosa se contaron como muertos.

Para evaluar la integridad de membrana del semen descongelado se utilizaron, adicionalmente las sondas SYBR-14 y yoduro de propidio (LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit de Molecular Probes). El yoduro de propidio es una sonda específica de ADN que no puede atravesar la membrana intacta, por lo que permite identificar los espermatozoides viables de los no viables (membrana dañada). El análisis de las muestras se realizó a una magnitud de 400x en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E200, longitud de onda 450-490 nm). Los espermatozoides verdes (negativos para yoduro de propidio) se consideraron vivos, mientras que los rojos (positivos para yoduro de propidio) se consideraron muertos por deterioro en su membrana plasmática.

El porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal se determinó mediante microscopio de contraste fases (Axiostar Plus, Zeiss) examinando 200 espermatozoides previamente fijados y teñidos con azul de anilina (magnificación 1000x) siguiendo el procedimiento de Santiago-Moreno et. al.

(2009). Los espermatozoides con el acrosoma en forma de gancho, hinchado, adelgazado o con ausencia de éste se consideraron sin integridad acrosomal.

Tabla 1. Pools de las distintas variedades de gallos analizados por criador y raza.

Pool	Criador	Raza	Variedad
1	A	Indio	Cristal
2	A	Indio	Acerado
3	A	Indio	Acerado Oscuro
4	A	Pardo	Flor De Escoba
5	A	Pardo	Sarrioso
6	A	Pardo	Corzuno
7	A	Pardo	Corzuno Claro
8	A	Pardo	Corzuno Oscuro
9	A	Pardo	Rubion
10	B	Indio	Acerado Claro (Plateado)
11	B	Indio	Acerado Medio
12	B	Indio	Avellanado
13	B	Indio	Acerado Oscuro
14	B	Pardo	Rubi3n
15	B	Pardo	Aconchado
16	B	Pardo	Flor De Escoba
17	B	Pardo	Corzuno Claro/Oscuro
18	B	Pardo	Sarrioso (Tipo De Corzuno)
19	B	Pardo	Langareto
20	C	Indio	Acerado Oscuro
21	C	Pardo	Aconchado
22	C	Pardo	Flor Escoba
23	C	Pardo	Claro
24	C	Pardo	Encendido
25	C	Pardo	Corzuno
26	D	Indio	Plomizo Claro
27	D	Indio	Plateado (Claro)
28	D	Indio	Plomizo Oscuro
29	D	Indio	Avellanado
30	D	Pardo	Flor De Escoba

La integridad del ADN se evalu3 en el semen descongelado mediante dUTP desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). Para ello se utiliz3 el kit "In Situ Cell Death Detection" (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante con cambios menores para adaptar la t3cnica al an3lisis de semen de gallo. El an3lisis de las muestras se realiz3 mediante microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E200) contando un m3nimo de 200 espermatozoides.

Con respecto al an3lisis estad3stico, las variables esperm3ticas que no se ajustaban a una distribuci3n normal (determinado mediante el test de Shapiro-Wilk) fueron transformadas mediante arcosen (en el caso de porcentajes), seno hiperb3lico inverso (en el caso de variables que incluyeran valores igual a cero) o log10 (en el resto de casos). Las variables se analizaron mediante ANOVA de una v3a. Las comparaciones entre medias de criadores se realizaron mediante Post-Hoc de Fisher. Todos los c3lculos estad3sticos se realizaron mediante el software TIBCO SatatisticaTM v. 13.3 (TIBCO® Software Inc. Palo Alto, CA, USA).

Resultados y Discusión

Los resultados presentados a continuación muestran los valores promedio obtenidos por criador y raza. En cuanto a las variables de semen fresco, se encontraron diferencias significativas en el volumen por raza ($p < 0,01$) (Fig. 1B) siendo Indio la raza con mayor producción de semen. En cuanto a los criadores, el criador C mostró diferencias significativas con todos los criadores (Fig. 1A) siendo claramente inferior y contraponiéndose al criador D, con el valor más alto ($p < 0,01$). Estos resultados son de esperar, considerando que, en el caso del criador C, 5 de las 6 variedades evaluadas son Pardo y, en cuanto al criador D, 4 de las 5 son Indio (Tabla 1). El resto de variables de semen fresco (concentración, motilidad, score, viabilidad e integridad acrosomal) (Tabla 2) no mostraron diferencias significativas por criador ni raza.

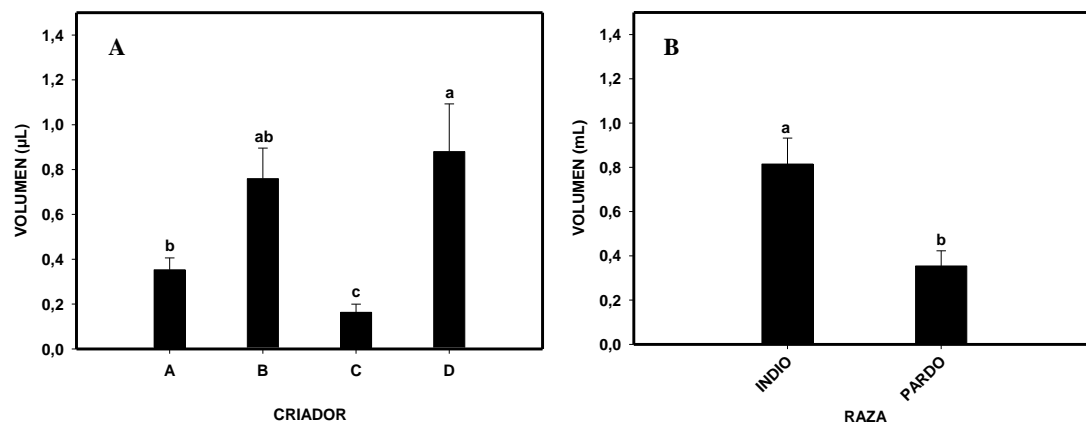


Fig. 1. Volumen promedio de semen recogido por criador (A) y raza (B) de los gallos Indio y Pardo de León. Letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Tabla 2. Variables obtenidas en semen fresco de Pardo e Indio de León

		Concentración ($\times 10^6$ spz)	Score*	Motilidad (%)	Viabilidad Eosina-Nigrosina (%)	Integridad Acrosomal (%)
Criador	A	835.6 \pm 192.5	3.0 \pm 0.5	42.3 \pm 10.8	93.6 \pm 1.6	95.6 \pm 1.7
	B	835.6 \pm 252.9	3.4 \pm 0.3	63.0 \pm 9.9	92.3 \pm 2.0	98.8 \pm 0.3
	C	261.3 \pm 88.8	3.8 \pm 0.4	73.3 \pm 11.9	95.5 \pm 1.2	98.4 \pm 1.0
	D	1396.0 \pm 385.9	4.5 \pm 0.4	81.0 \pm 6.0	92.8 \pm 1.0	98.5 \pm 0.4
Raza	Indio	1149.0 \pm 248.2	4.0 \pm 0.2	70.4 \pm 7.1	93.9 \pm 1.0	97.8 \pm 1.3
	Pardo	590.9 \pm 125.2	3.2 \pm 0.3	56.2 \pm 8.1	93.1 \pm 1.3	97.7 \pm 0.5

Media \pm ES. *Score (0-5)

Dentro de las variables post-descongelación se encontraron diferencias significativas en la viabilidad espermática con respecto al criador ($p < 0,01$) (Fig. 2A). La ausencia de diferencias significativas por raza (Fig. 2B) descartó la influencia de este factor en la medias obtenidas por criador. El criador D mostró diferencias con todos los criadores teniendo el valor más alto de viabilidad en contraposición al criador C ($p < 0,001$). Los valores obtenidos con eosina-nigrosina fueron corroborados mediante SYBR-14, aumentando así la precisión de los resultados. Ambas tinciones mostraron la misma tendencia de los resultados (Fig. 2).

El análisis de la fragmentación del ADN mostró diferencias significativas por criador ($p < 0,05$) (Fig. 3A) pero no por raza ($p > 0,05$). La comparación de las medias por raza (Fig. 3B) mostró una $p = 0,056$, lo cual indica cierta influencia del factor raza en la obtención de las medias por criador. Así, es de esperar que criadores con mayor número de variedades Pardo muestren un valor promedio superior de daño en el ADN. Sin embargo, en la Fig. 3 puede observarse que el valor más alto y más bajo de TUNEL por criador (Fig. 3A) sale fuera de los valores promedio por raza (Fig. 3B), lo que hace pensar en un daño

intensificado o aminorado por el criador. El criador D fue el criador con tasa más baja de daño en el ADN en contraposición al criador C ($p < 0,05$).

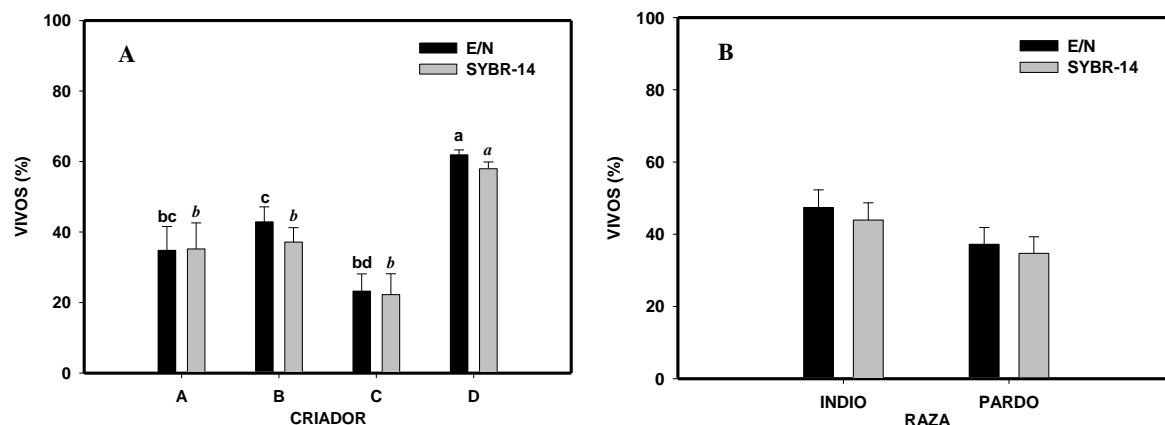


Fig. 2. Valores de viabilidad post-descongelación obtenidos mediante eosina-nigrosina y SYBR-14 por criador (A) y raza (B) de los gallos Indio y Pardo de León. Letras diferentes (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p < 0,01$). La ausencia de letras indica ausencia de diferencias significativas.

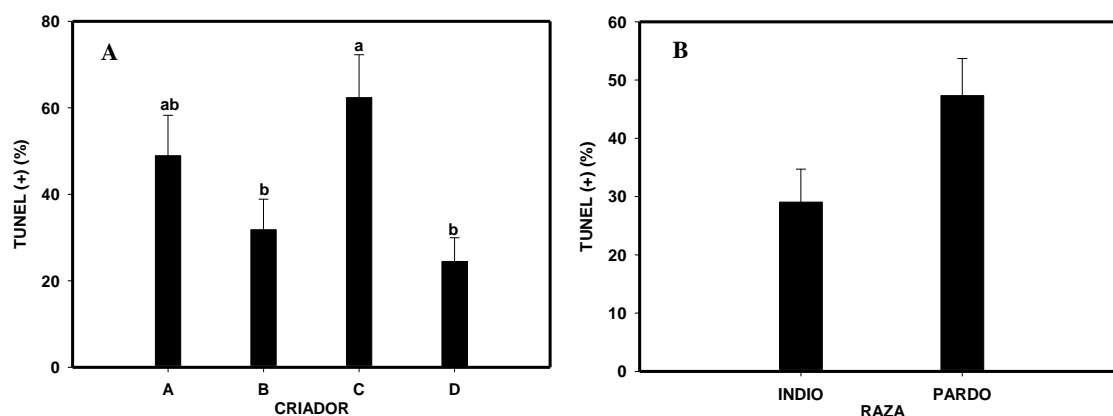


Fig. 3. Cuantificación mediante TUNEL del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado por criador (A) y raza (B) de los gallos Indio y Pardo de León, post-descongelación. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La ausencia de letras indica ausencia de diferencias significativas.

Tabla 3. Variables cinéticas de motilidad post-descongelación de semen de gallo Pardo e Indio león obtenidas mediante el sistema CASA

	Estáticos (%)	Móviles								
		totales (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ($\mu\text{m/s}$)	BCF (Hz)
Criador										
A	92.2 \pm 1.8	7.8 \pm 1.8	38.9 \pm 5.9	22.8 \pm 4.6	27.5 \pm 5.0	55.9 \pm 3.4	80.6 \pm 2.3	68.9 \pm 2.5	1.5 \pm 0.2	5.5 \pm 0.9
B	91.5 \pm 2.5	8.5 \pm 2.5	37.6 \pm 3.3	19.5 \pm 2.9	26.8 \pm 3.1	49.8 \pm 3.6	70.8 \pm 3.8	70.1 \pm 2.3	1.9 \pm 0.4	6.1 \pm 1.2
C	93.9 \pm 2.4	6.1 \pm 2.4	38.3 \pm 9.0	24.6 \pm 9.6	28.3 \pm 9.6	56.1 \pm 11.5	80.4 \pm 6.6	67.9 \pm 9.0	1.3 \pm 0.4	5.8 \pm 1.9
D	92.9 \pm 1.8	7.1 \pm 1.8	48.9 \pm 6.8	29.2 \pm 6.2	36.0 \pm 6.8	56.9 \pm 6.8	78.6 \pm 4.9	71.2 \pm 5.2	2.2 \pm 0.6	7.0 \pm 1.4
Raza										
Indio	94.7 \pm 0.9	5.3 \pm 0.9	42.3 \pm 4.8	23.3 \pm 4.1	30.8 \pm 4.4	51.6 \pm 4.3	72.4 \pm 4.1	70.4 \pm 2.9	1.7 \pm 0.4	4.7 \pm 1.0
Pardo	90.8 \pm 1.7	9.2 \pm 1.7	39.0 \pm 3.5	23.1 \pm 3.2	27.9 \pm 3.3	55.5 \pm 3.4	79.5 \pm 2.2	69.1 \pm 2.6	1.7 \pm 0.2	6.9 \pm 0.7

No se encontraron diferencias significativas con respecto a las variables de integridad acrosomal (Fig. 4), motilidad y score subjetivo (Fig. 5) ni por criador ni por raza. Las variables cinéticas analizadas por el sistema CASA pueden consultarse en la Tabla 3. Ninguna de estas variables mostró diferencias significativas.

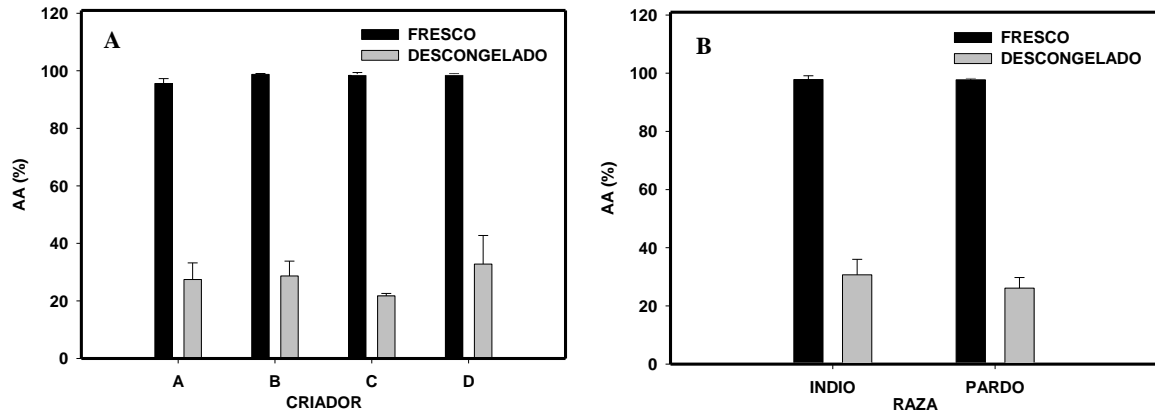


Fig. 4. Integridad acrosomal en semen fresco y descongelado, determinada mediante tinción con azul de anilina (AA), según criador (A) y raza (B). La ausencia de letras indica ausencia de diferencias significativas.

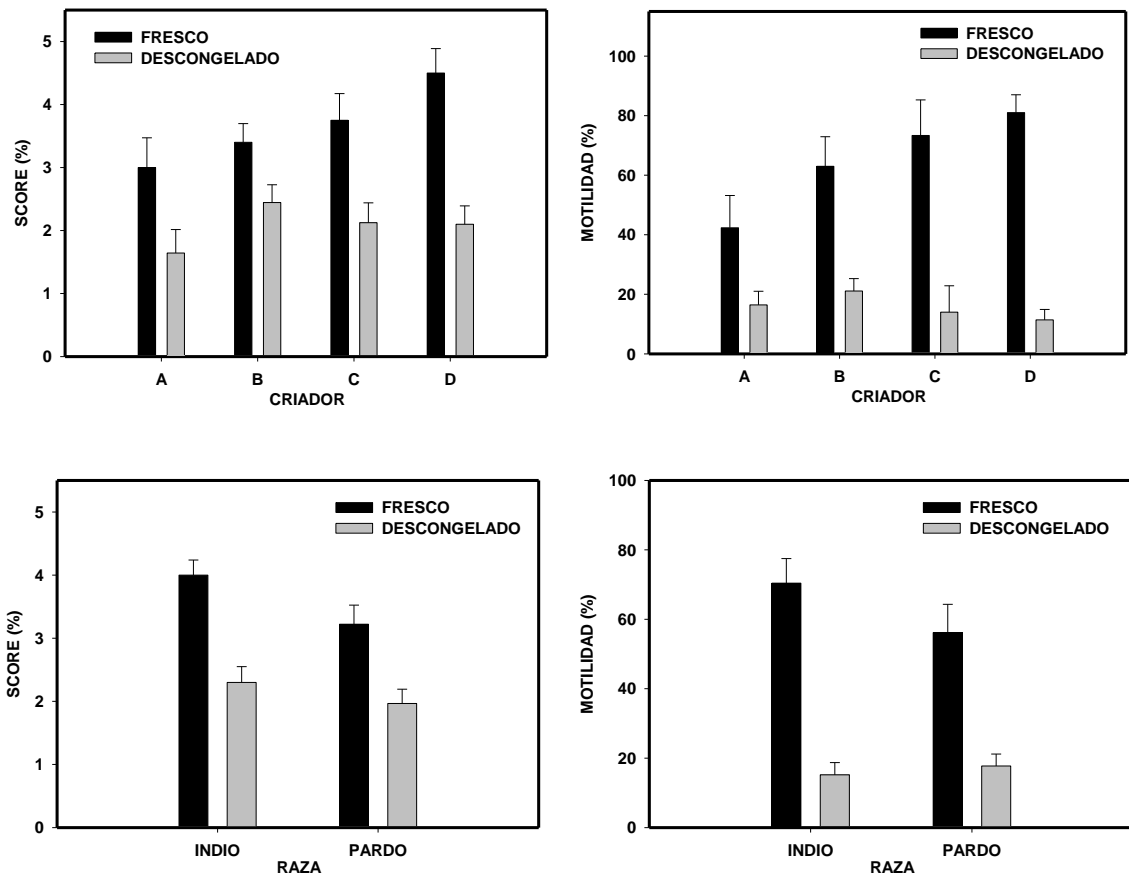


Fig. 5. Score (A, C) y motilidad (B, D) subjetivos, obtenidos en semen fresco y descongelado de los gallos Pardo e Indio de León analizados por criador (A, B) (C, D) y por raza. La ausencia de letras indica ausencia de diferencias significativas.

Con respecto al efecto de la descongelación, se observó una mayor sensibilidad a la congelación por parte de los gallos del criador C en la viabilidad espermática, con una pérdida de un 70% (Tabla 2 para datos de semen fresco y Fig. 2A para semen descongelado). Los gallos del criador D fueron los más resistentes con una pérdida de viabilidad de un 30%. En cuanto a la raza, Indio mostró una mayor resistencia (10% mayor viabilidad) con respecto a Pardo (Tabla 2 para semen fresco y Fig. 2B para semen descongelado).

Habiendo analizado los resultados anteriores se hace evidente la mejor calidad espermática de la raza Indio de León frente al Pardo.

En cuanto a los criadores, la población de gallos del criador D presentó mayor crioresistencia, en contraposición al criador C. Las diferencias significativas en cuanto a viabilidad espermática e integridad en el ADN sugieren una mayor capacidad fecundante de los gallos del criador D.

Ha sido reportado que la consanguinidad puede favorecer procesos apoptóticos en el espermatozoide (Hingst y Blottner, 1995). En este sentido, los resultados de fragmentación del ADN sugieren un mayor vigor genético en la población de gallos del criador D. En contraste, los gallos del criador C podrían estar sometidos a un mayor estrés genético por consanguinidad.

En conclusión, el sistema de manejo llevado a cabo por los criadores parece ser determinante en la capacidad de fecundación de los machos y en la efectividad de llevar a cabo un banco de germoplasma.

Referencias

- BAKST, M. R., y T. J. SEXTON.** (1979). Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* **55**:1-7.
- BLESBOIS, E., y J. P. BRILLARD.** (2007). Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal* **1**:1472-1481.
- BURROWS, W. H., y J. P. QUINN.** (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* **16**:19-24.
- CAMPBELL RC, DOTT HM, y GLOVER TD.** (1956). Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agriculture Science* **48**:1-8.
- HINTS O. y BLOTTNER, S.** (1995). Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by DNA-fragmentation ELISA. *Theriogenology* **44**: 313-319.
- LAKE PE y RAVIE O.** (1984). An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science* **25**:145-150.
- SANTIAGO-MORENO, J., CASTAÑO C., GÓMEZ-BRUNET, A., TOLEDANO-DIAZ, A., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. y CAMPO, J.L.** (2009). Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poultry Science* **88**:2661-2669.
- SANTIAGO-MORENO, J., CASTAÑO C., TOLEDANO-DIAZ, A., COLOMA M.A., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., PRIETO M.T. y CAMPO, J.L.** (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science* **90**:2047-2053.
- SANTIAGO-MORENO, J., CASTAÑO C., TOLEDANO-DIAZ, A., COLOMA M.A., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., PRIETO M.T. y CAMPO, J.L.** (2012). Influence of season on the freezability of free-range poultry semen. *Reproduction in domestic animals*. **47**:578-583.
- WATSON, P. F., y W. V. HOLT.** (2001). Cryobanking the Genetic Resource. *P. F. Watson and W. V. Holt, ed. Taylor and Francis, London.*