



Efecto de la viscosidad en el medio para la criopreservación espermática de gallo (*Gallus gallus*)



José Antonio Herrera Barragán ^a

José Manuel Huitrón ^b

Juan José Pérez-Rivero ^{*a}

Adrián Guzmán Sánchez ^a

Alejandro Ávalos Rodríguez ^a

Ana María Rosales Torres ^a

Ricardo Camarillo Flores ^c

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calz. del Hueso 1100. Villa Quietud, Coyoacán. 04960. CDMX, México.

^b Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Maestría en Ciencias Agropecuarias. CDMX, México.

^c Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Maestría en Biología de la Reproducción Animal. CDMX, México.

*Autor de correspondencia: jjperez1_1999@yahoo.com

Resumen:

En semen de mamíferos, se ha demostrado que la viscosidad influye de manera negativa para su conservación. En semen de aves los estudios sobre las características físicas de los eyaculados son limitados, particularmente la viscosidad no ha sido estudiada. Los medios para la criopreservación, no consideran la viscosidad para mantener la viabilidad espermática. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la viscosidad en el medio para mantener su viabilidad post descongelación. Se determinó los parámetros de evaluación básica, de maduración y reacción acrosomal evaluando la

presencia y distribución de Ca^{2+} mediante la co-incubación con clortetraciclina. Se realizaron 25 evaluaciones de pool seminal, criopreservados en medio Lake suplementado con 6 % de dimetilacetamida y con 0 % (Testigo), 10 %, 30 % y 45 % de ficoll, para ajustar la viscosidad del medio a condiciones similares a las del semen y del líquido oviductal y a un grado mayor de viscosidad. La movilidad espermática fue menor ($P \leq 0.05$) en alícuotas con mayor porcentaje de ficoll. El porcentaje de espermatozoides vivos fue similar ($P > 0.05$) en el testigo y todas las alícuotas con diferente porcentaje de ficoll. La maduración espermática presentó un mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de espermatozoides no capacitados cuando se utilizó 10% de ficoll. De manera inversa el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal fue menor ($P \leq 0.05$) también cuando se utilizó 10 % de ficoll. Los resultados de este estudio demuestran que variaciones en el grado de viscosidad del medio, pueden mantener o incrementar la viabilidad espermática post descongelación.

Palabras clave: Acrosoma, Capacitación espermática, Congelación, *Gallus g*, Semen.

Recibido: 30/12/2020

Aceptado: 22/04/2021

Introducción

En la actualidad la avicultura de especies domésticas no se puede concebir sin la aplicación de conocimientos y tecnologías innovadoras de reproducción asistida; esto incluye la criopreservación del semen y la inseminación artificial (IA)⁽¹⁾. Una de las mayores dificultades para lograrlo es mantener la viscosidad del líquido seminal, la cual puede verse disminuida al mezclar el semen con un diluyente para su conservación, lo que puede contribuir a la pérdida de espermatozoides en el oviducto durante la IA⁽²⁾.

La viscosidad del líquido seminal es atribuida a la presencia de mucopolisacáridos, glucosaminoglicanos y proteínas, ésta ha sido estudiada en diferentes especies animales como los camélidos, elefantes y ungulados salvajes, donde los cambios en la viscosidad del semen representan un problema para su conservación y para la IA⁽³⁻⁶⁾.

Desde el punto de vista anatómico y fisiológico, dentro del oviducto de las aves existen tubos de almacenamiento espermático, los cuales provén un microambiente específico para mantener la viabilidad de los espermatozoides y su capacidad fertilizante de manera prolongada^(7,8). En las aves, cuando los espermatozoides se encuentran dentro de los tubos de almacenamiento son inmóviles, por lo que su metabolismo es basal, dando como resultado un consumo bajo de ATP⁽⁹⁾. Sin embargo, estos poseen mitocondrias activas,

las cuales proporcionan energía para la activación de su movilidad y capacitación espermática⁽¹⁰⁾.

Cuando los espermatozoides eyaculados realizan la reacción acrosomal, son capaces de penetrar la membrana perivitelina que rodea al ovocito y realizar la fertilización⁽¹¹⁾. Se ha mencionado que los espermatozoides de aves “no necesitan” un proceso de capacitación espermática para poder llevar a cabo la fertilización⁽¹¹⁾. Durante la criopreservación, los procedimientos de enfriamiento, adición de agentes crioprotectores, congelado y descongelado contribuyen a un proceso de criocapitación^(12,13), el cual se evidencia por la continuidad en la maduración espermática, y reduce su capacidad de fertilización al momento de ser utilizados para la inseminación artificial.

Considerando que en otras especies es importante mantener la viscosidad del líquido seminal, para mantener la viabilidad espermática post descongelación durante los procesos de IA y que esta no ha sido estudiada en gallos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la viscosidad en el medio de criopreservación, para mantener la viabilidad espermática determinada por sus parámetros de maduración espermática post descongelación.

Material y métodos

Uso de animales

Se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. “NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”⁽¹⁴⁾. Se utilizaron cinco gallos Lohmann Brown lite (*Gallus gallus*) a los que se proporcionó alimento balanceado con 18% de proteína y agua *ad libitum*, y alojamiento individual en jaulas metálicas de 70 x70 x 90 cm, provistas de bebedero y comedero.

Obtención de semen

Se obtuvieron 25 muestras de semen de cada gallo, por masaje dorso-ventral⁽¹⁵⁾. El semen se recolectó de la cloaca por aspiración con una micropipeta SL10-1000, (RANIN™, USA). Las muestras se mezclaron para obtener 25 grupos, los cuales fueron diluidos en medio Lake compuesto por fructosa 0.6%, glutamato de sodio 1.92%, acetato de magnesio 0.08%, acetato de sodio 0.51%, citrato de potasio 0.128%, pH de 7.2 y osmolaridad de 330 mOsm (L)⁽¹⁶⁾ y fueron adicionados de dimetilacetamida (DMA) al 6 % como crioprotector.

En cada grupo seminal, se determinó su concentración espermática por microscopía y con el uso de una cámara de Neubauer⁽¹⁾, para realizar seis alícuotas de 100 µl, con 100×10^6 espermatozoides, a las cuales se les añadió ficoll (F) para lograr diferentes niveles de viscosidad del semen. Se consideró como grupo testigo a una alícuota del semen eyaculado (S). El grupo (S+L+ ficoll 10% +DMA) fue diluido de manera convencional y se le adicionó F al 10% para lograr menor viscosidad comparado con el grupo testigo. Al grupo (S+L+ ficoll 30% +DMA) se le agregó F al 30% para lograr viscosidad similar comparado con el grupo testigo y al grupo (S+L+ ficoll 45% +DMA) se le adiciono F al 45% para lograr mayor viscosidad comparado con el grupo testigo.

Obtención de líquido oviductal

Se introdujo una sonda de polipropileno (5 FR) 1 cm en la cloaca de cinco gallinas Lohmann Brown lite, se administraron 0.5 ml de SSF estéril, los cuales se aspiraron con una jeringa de 3 ml, las muestras se mezclaron para realizar un grupo.

Determinación de la viscosidad

Se depositaron 50 µl de semen de cada grupo o líquido oviductal, en un refractómetro, para observar el grado de densidad (°Brix), para realizar su conversión a g/ml, se utilizó la tabla de conversión de °Brix a gravedad específica del National Institute of Standards and Technology (NIST). Con un viscosímetro Cannon- Manning Semi-Micro (Tamaño 50, Instrumento Cannon, PA), se determinó la viscosidad cinemática de cada muestra en mm²/s (cSt) multiplicando el tiempo de flujo en segundos por la constante del viscosímetro (Co= 0.003812). Para obtener la viscosidad en mPa*s (cP), el resultado se multiplicó por la viscosidad cinemática en mm²/s (cSt) y por la densidad en g/ml.

Criopreservación seminal

Posteriormente se congelaron alícuotas diluidas y adicionadas con los diferentes porcentajes de ficoll, en pajillas de 0.25 ml con 100×10^6 espermatozoides. Se inició con alícuotas a 25 °C que fueron enfriadas a una curva de 1.6 °C por min, enseguida se mantuvieron en vapor de nitrógeno (-70 °C) por 10 min; finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido (-196 °C) para criopreservarse por 30 días. La descongelación de cada pajilla fue a 37.5 °C por 30 seg⁽¹⁷⁾.

Evaluación espermática básica

En semen fresco y post descongeladas, se determinó la movilidad progresiva mediante microscopía óptica (400X) para estimar el porcentaje de espermatozoides con un movimiento progresivo vigoroso en una alícuota de 15 μ l a 37.5 °C. La viabilidad y morfología espermática se determinaron en una preparación sobre un porta objetos, con 10 μ l de la alícuota con espermatozoides y 3 μ l de tinción vital azul de eosina (1% de eosina y 5% de nigrosina), se evaluaron doscientas células en cada preparación, con un microscopio de contraste de fase (400X). La morfología se evaluó con un aumento de 100X^(1,18).

Maduración y reacción acrosomal espermática

Alícuotas de 50 μ l de semen perteneciente a todos los grupos con una concentración de 5×10^6 espermatozoides, se incubaron con clortetraciclina (CTC) 0.9 M en obscuridad a 38 ° C^(19,20). Mediante microscopía de fluorescencia (495 nm excitación y 520 nm emisión) se evaluaron los espermatozoides para determinar su nivel de maduración, determinando la proporción de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal⁽¹⁷⁾.

Análisis estadístico

Se verificó la normalidad de los datos mediante una prueba de Jack-Vera; de manera posterior se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para los diferentes tratamientos y variables. Se realizó una prueba de Tukey para identificar la diferencia de medias, todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Se utilizó el programa estadístico PAST⁽²¹⁾.

Resultados

Densidad y viscosidad

Los parámetros de densidad y viscosidad que se determinaron en los medios de criopreservación mostraron valores diferentes, los cuales se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Densidad y viscosidad seminal y en los medios de criopreservación (n=25)

	Densidad °Brix	Gravedad específica	Viscosidad (mm ² /s)	Viscosidad *mPa*s
Semen (S)	7.0	1.028	3.1440	3.2320
S+L+ ficoll (10%) +DMA	17.0	1.070	2.0279	2.1698
S+L+ ficoll (30%) +DMA	28.0	1.120	3.1601	3.5393
S+L+ ficoll (45%) +DMA	30.2	1.130	5.4092	6.1123

S= Semen; L= Lake; DMA= dimetilacetamida.

Evaluación espermática básica post descongelación

Los espermatozoides descongelados con diferentes porcentajes de ficoll, mostraron cambios en la movilidad; entre menos viscosidad en el medio, se presenta mayor movilidad acercándose a la del semen eyaculado ($P \leq 0,05$). Los porcentajes de espermatozoides vivos, no mostraron cambios significativos entre el semen eyaculado y los espermatozoides descongelados ($P > 0,05$). Por otro lado, conforme aumenta la viscosidad del medio, la morfología normal de los espermatozoides descongelados mejora ($P \leq 0,05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Porcentajes de evaluación básica en espermatozoides criopreservados con diferentes condiciones de viscosidad (n=10)

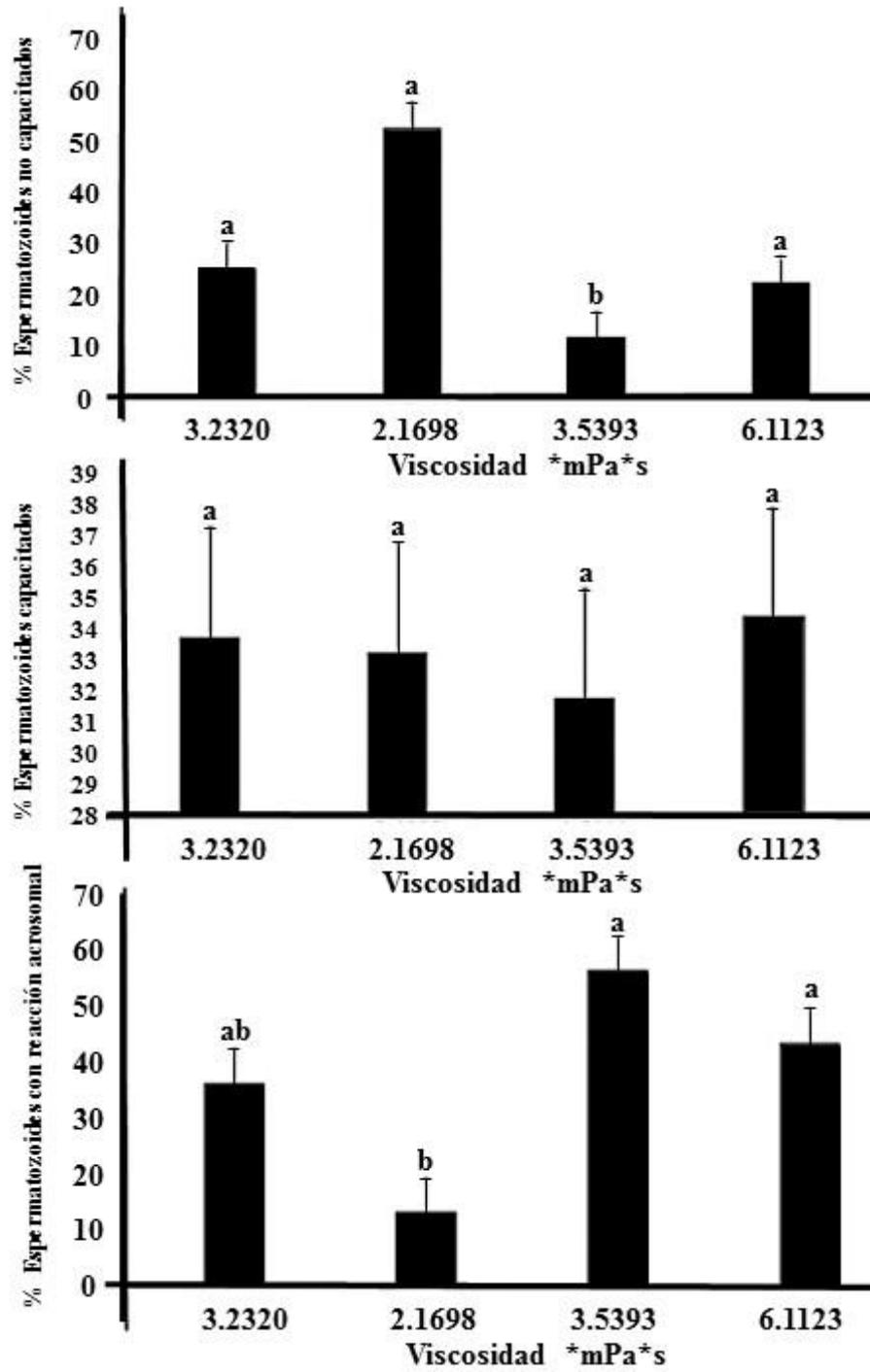
Porcentaje de espermatozoides (X±EE)			
Viscosidad *mPa*s	Movilidad	Viabilidad	Morfología
3.2320	46.1 ± 0.7 ^a	74.2 ± 2.9 ^a	86.1 ± 1.0 ^a
2.1698	32.8 ± 0.7 ^b	72.4 ± 2.9 ^a	86.7 ± 1.0 ^a
3.5393	10.9 ± 0.7 ^c	70.5 ± 2.9 ^a	93 ± 1.0 ^b
6.1123	5.1 ± 0.7 ^d	70 ± 2.9 ^a	91.2 ± 1.0 ^b

^{abcd} Valores con diferente literal en columnas difieren ($P < 0,05$).

Maduración espermática y reacción acrosomal

El porcentaje de espermatozoides no capacitados, fue mayor en el grupo adicionado con ficoll al 10% comparado con el resto de los tratamientos ($P \leq 0,05$) como se muestra en la Figura 1. Los porcentajes de espermatozoides con capacitación espermática no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos y el semen eyaculado ($P > 0,05$). El porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, encontrados fue mayor en los tratamientos adicionados con 30% y 45% de ficoll comparándolos con el tratamiento con 10% de ficoll ($P \leq 0,05$) y similar con el semen eyaculado ($P > 0,05$).

Figura 1: Parámetros de maduración espermática post descongelación en medios con diferente viscosidad



Discusión

El contenido y características del plasma seminal es diferente en cada especie; una de estas diferencias físicas es la viscosidad, la cual se produce a partir de proteínas que ayudan a mantener la viabilidad espermática durante varios días, hasta que el espermatozoide llegue al sitio de fertilización⁽²²⁾. En el semen de camélidos, la viscosidad elevada, es atribuida a la Mucina 5B^(23,24). Por otro lado en gallos y pavos, no hay estudios relacionados con la viscosidad del semen, pero se ha demostrado que en el plasma seminal de las aves se encuentran hasta 822 proteínas en el caso del gallo y 607 en el pavo^(9,22). En este trabajo se determinó que la viscosidad del semen de gallo fue de 3.23 mPa*s.

Los mecanismos que prolongan la vida del espermatozoide en los túbulos de almacenamiento espermáticos son desconocidos, pero se piensa que incluyen supresión reversible de la respiración y la movilidad espermática, así como estabilización de la membrana y mantenimiento del acrosoma⁽²⁵⁾.

Si bien no existe diferencia estadística demostrable en este trabajo, el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor en semen criopreservado con menor viscosidad. El incremento de viscosidad disminuyó la movilidad de los espermatozoides; sin embargo, conservaron su viabilidad. En otro estudio⁽²⁶⁾, utilizaron diferentes concentraciones de goma arábica para aumentar la viscosidad del medio para criopreservar semen de caballo, y reportaron mejor viabilidad espermática post descongelación.

La capacitación espermática es necesaria para iniciar la reacción acrosomal, la cual ocurre *in vivo* en el tracto genital de la hembra, donde participan diferentes señales que originan una desestabilización de la membrana, hiperactivación espermática que facilita la reacción acrosomal⁽²⁷⁾.

Se ha utilizado DMA al 5% y glicerol para congelar espermatozoides de gallo, encontrando en ambos tratamientos reducción de la movilidad de los espermatozoides criopreservados, así como su capacidad fertilizante; sin embargo este efecto fue menor en el grupo tratado con DMA⁽²⁸⁾. Si bien en este trabajo se utilizó una concentración ligeramente superior del 6% de DMA, y los espermatozoides criopreservados redujeron su movilidad, este efecto es atribuido al incremento de la viscosidad del medio, encontrando la viabilidad espermática superior al 70 %.

Se observó también que en los parámetros de descapitación de los espermatozoides descongelados, son mayores del 30 %, manteniéndose estadísticamente iguales ($P>0.05$) a diferencia de los espermatozoides con inclusión del 10% de ficoll, en donde hubo un incremento importante, llegando a porcentajes superiores al 50 %. Así el porcentaje de espermatozoides capacitados, se mantienen de manera homogénea por arriba del 30 %, independientemente de la inclusión de ficoll.

En espermatozoides descongelados, se observó que la inclusión de 10% de ficoll, disminuyó el porcentaje de reacción acrosomal por debajo del 20 %, comparándolos con las otras inclusiones (30% y 45%), en donde los porcentajes fueron superiores al 40 %. Hay que considerar que la criopreservación es un proceso de estrés térmico y osmótico que hace que la viabilidad y movilidad del espermatozoide decrezca. En diferentes especies el proceso de congelamiento espermático hace que el estímulo de inducir a la reacción acrosomal sea mayor⁽²⁹⁾, al comparar el proceso de reacción acrosomal mediante la criopreservación con diferentes crioprotectores, sugieren en sus resultados que el proceso para que se lleve a cabo la reacción acrosomal es muy sensible al estrés osmótico y a los cambios rápidos agua/solutos en el gallo, demostrando que utilizando crioprotectores como el DMA hay una menor inducción a la reacción acrosomal.

Conclusiones e implicaciones

En resultados del presente trabajo, se evidencia que la viscosidad es un factor físico que influye en la conservación espermática en semen de gallo; se determinó que los parámetros de viscosidad convenientes son 2.1698 mPa*s y 3.2320 mPa*s. La viscosidad conserva los parámetros de viabilidad y morfología espermática en post criopreservación, evitando que exista un gasto energético en el espermatozoide por medio de la disminución de la movilidad. Se demostró que se reduce la reacción acrosomal espontánea en los espermatozoides descongelados y aumenta la descapacitación espermática, lo cual evidenció que es un estado fisiológico reversible, con lo cual el espermatozoide puede conservarse intacto hasta llegar al sitio de fertilización.

Agradecimientos

A la Dra. Cindy Gabriela Hernández, por su ayuda durante el uso del laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-X.

Conflicto de interés

Se declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Herrera JA, Quintana JA, López M, Betancourt M, Fierro R. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. Arch Androl 2005;51(5):353-360. doi: 10.1080/014850190944401.

2. Bootwalla S, Froman D. Effect of extender viscosity on the insemination dose for chickens. *Poult Sci* 1988;67(8):1218-1221. doi: 10.3382/ps.0671218.
3. Adams G, Ratto M, Collins C, Bergfelt D. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 2009;71(1):166-175. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.005.
4. Bravo P, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordonez C, Salinas J, Tito, F. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim Rep Sci* 2013;136(3):157-163. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.005.
5. El-Bahrawy K, Rateb S, Khalifa M, Monaco D, Lacalandra G. Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Anim Rep Sci* 2017;187(sn):100-108. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.10.011.
6. Holt W. Germoplasm cryopreservation in elephants and wildt ungulates. In: *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?* Watson PF, Holt W, editors. CRC Press. 2001:319-348.
7. Baskt M, Wishart G, Brillard J. Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult Sci Rev* 1994;5(3):117-143.
8. Blesbois E, Brillard J. Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal* 2007;1(10):1472-1481. doi: 10.1017/S175173110700081X.
9. Baskt M, Bauchan G. Lectin staining of the uterovaginal junction and sperm-storage tubule epithelia in broiler hens. *Poult Sci* 2016;95(4):948-955. doi.org/10.3382/ps/pev440.
10. Santiago-Moreno J, Estes M, Villaverde-Morcillo S, Toledano-Diaz A, Castano C, Velázquez R, *et al.* Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian J Androl* 2016;18(6):882-888. doi: 10.4103/1008-682X.188660.
11. Lemoine M, Grasseau I, Brillard J, Blesbois E. A reappraisal of the factors involved *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 2008;136(4):391. doi:10.1530/REP-08-0094.
12. Longobardi V, Albero G, De Canditiis D, Salzano A, Natale A, Balestrieri A, Neglia G, Campanile G, Gasparrini B. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology* 2017;89(sn):359–364. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.048
13. Laffaldano N, Di Iorio M, Cerolini S, Manchisi A. Overview of turkey semen storage: focus on cryopreservation. *Annals Anim Sci* 2016;16(4):961-974. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0026>.

14. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
15. Burrows W, Quinn J. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *J Poult Sci* 1937;16(1):19-24. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>.
16. Lake P. The principles and practice of semen collection and preservation in birds. In: *Symposia of the Zoological Society of London*. 1978;43:31–49.
17. Camarillo R, Jiménez I, Guzmán A, Rosales A, Rodríguez F, Pérez-Rivero J, Herrera J. Oviductal proteins effect in rooster spermatic cryopreservation. *CryoLetters* 2019; 40(6): 352-356. http://www.cryoletters.org/Abstracts/vol_40_6_2019.htm.
18. Fischer DH, Failing SK, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M. Viability assessment of spermatozoa in large falcons (*Falco* spp.) using various staining protocols. *Reprod Dom Anim* 2020;55(10):1383-1392. <https://doi.org/10.1111/rda.13785>.
19. Lemoine M, Mignon S, Grasseau I, Magistrini M, Bleisbois E. Ability of chicken spermatozoa to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology* 2011;75(1):122-130. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.017.
20. Herrera JA, Calderón G, Guzmán A, Vargas AK, Ávalos A, Rosales A. Evaluation of two diluents for the storage of fresh and cryopreserved eyaculado of Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*). *Austral J Vet Sci* 2017;49(1):39-43. doi.org/10.4067/s0719-81322017000100039.
21. Hammer Ø, Harper D, Ryan P. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 2001;4(1):1-9.
22. Donoghue A, Wishart G. Storage of poultry semen. *Anim Rep Sci* 2000;62(1-3):213-232. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00160-3.
23. Skidmore J. The use of some assisted reproductive technologies in old world camelids. *Anim Rep Sci* 2019; 207(sn):138-145. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.06.001.
24. Al-Bulushi S, Manjunatha B, Bathgate R, Rickard J, De Graaf S. Liquid storage of dromedary camel semen in different extenders. *Anim Rep Sci* 2019; 207(sn):95-106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.008>.
25. Lemoine, M. Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biol Rep* 2009;81(4):657–665. doi: 10.1095/biolreprod.108.072660.
26. Ali M, Musa M, Alfadul S, Al-Sobayel K. Effect of gum arabic on stallion sperm survival during cold storage and post freezing. *Mac Vet Rev* 2018;41(1):21-31. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2017-0026>.

27. Lemoine M, Grasseau I, Brillard JP, Blesbois E. A reappraisal of the factors involved in *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 2008;136(4):391-399. doi: 10.1530/REP-08-0094.
28. Abouelezz F, Sayed M, Santiago-Moreno J. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. *Anim Rep Sci* 2017;184(sn):228-234. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.07.021.
29. Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim Rep Sci* 2010;122(3-4):359-366. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.10.010.