

## **EVALUACION DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD Y YEMA DE HUEVO COMO CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES EN SEMEN DE CABALLO PERUANO DE PASO**

### **Evaluation of Low-density lipoprotein and egg yolk as cryoprotectants non-penetrating of Peruvian Paso horse semen**

X. Barriga<sup>1</sup>, J. Rodríguez<sup>1</sup>, S. Herrera<sup>1,2</sup>, V. Pacheco<sup>1,2</sup>, F. Fernández<sup>1,2</sup>, J. Reátegui<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú.

<sup>2</sup> Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEP). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

\* Corresponding author  
Victor Pacheco  
E-mail: [vpachecos@ucsm.edu.pe](mailto:vpachecos@ucsm.edu.pe)

Recibido: 04/11/19

Aceptado: 22/12/2019

Publicado: 31/12/2019

#### **ABSTRACT**

The objective was to evaluate the low-density lipoproteins (LDL) and egg yolk as non-penetrating cryoprotectants in Peruvian horse semen. Four adult males were collected. Prior to transfer to the laboratory, it was prediluted with dilutor. In the laboratory the sample was divided into two parts. The first was added LDL and the second egg yolk. Subsequently, the freezing was carried out with liquid nitrogen vapors. Seminal quality parameters were evaluated: motility, concentration, membrane integrity, membrane functionality (HOST) and sperm morphology. These seminal parameters were compared with ANOVA. The results indicate that the seminal quality in the cryopreserved samples with LDLs are superior ( $p < 0.05$ ) to those cryopreserved with egg yolk. The post-defrosted progressive motility was 48.9% and 27.5%, at 20 minutes of incubation it was 38.2% and 19.3%; for LDL and egg yolk, respectively. The conclusion, the quality of semen cryopreserved with LDL cryoprotectant was superior to that of semen cryopreserved with egg yolk.

**Keywords:** Semen, cryoprotectant, equine, egg yolk, LDL

#### **RESUMEN**

El objetivo fue evaluar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y yema de huevo como crioprotectores no penetrantes en semen de caballo peruano de paso. Se colectaron cuatro machos adultos. Previo a su traslado al laboratorio se prediluyó con dilutor. En el laboratorio la muestra se dividió en dos partes. A la primera se le adiciono LDL y al segundo yema de huevo. Posteriormente, el congelamiento se realizó con vapores de nitrógeno líquido. Se evaluaron los parámetros de calidad seminal: motilidad, concentración, integridad de membrana, funcionabilidad de la membrana (HOST) y morfología espermática. Estos parámetros seminales fueron comparados con ANOVA. Los resultados indican que la calidad seminal en las muestras criopreservadas con LDLs son superiores ( $p < 0,05$ ) a las criopreservadas con yema de huevo. La motilidad progresiva post-descongelado fue 48,9% y 27,5%, a los 20 minutos de incubación fue 38,2% y 19,3%; para LDL y yema de huevo, respectivamente. La conclusión, la calidad del semen criopreservado con LDL fue superior al semen criopreservado con yema de huevo.

**Palabras clave:** Semen, crioprotector, equino, yema de huevo, LDL

## INTRODUCCION

El estudio de técnicas que permitan la preservación y almacenamiento del semen a largo plazo es de gran importancia para la aplicación de biotecnologías reproductivas, permitiendo la maximización y aprovechamiento de animales de alto potencial genético (Pineda y Pinilla, 2007). Además, siendo los caballos de paso peruano, producto de bandera en el Perú, es una raza de importancia estratégica.

Una de las limitaciones en la Criopreservación del semen equino es el diluyente o extender, en especial en razas como la Peruano de Paso o machos denominados como malos congeladores. Trabajos recientes afirman en que el principal factor de variación que afecta la criopreservación es el propio del individuo. Por otro lado, el mayor y más preocupante inconveniente es el choque térmico al cual están expuestos los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación, reduciendo así calidad seminal del semen criopreservado y en gran medida su capacidad fecundante. Por esta razón los investigadores coinciden en la necesidad de utilizar diluyentes con la adición de criopreservantes que aporte lipoproteínas y energía que protejan al espermatozoide del daño criogénico o shock térmico, osmótico y oxidativo.

Los daños generados por la refrigeración se pueden minimizar (pero no evitar) mediante la dilución del semen en un medio que contenga crioprotectores no penetrantes, y controlando la tasa de refrigeración. El daño celular puede ser causado directamente por afección de estructuras celulares (ruptura de membranas) o indirectamente por alteración de funciones celulares (desaceleración de procesos metabólicos). Si la curva de disminución de temperatura es muy rápida, se producen daños parcialmente irreversibles caracterizados por un patrón de motilidad anormal (movimientos circulares), rápida pérdida de motilidad, daño de la membrana acrosomal y/o plasmática, reducción del metabolismo y pérdida de componentes intracelulares (Squires et al., 2009).

Los crioprotectores se clasifican en penetrantes o permeables o intracelulares como el conocido glicerol y dimetilformamida, y los no penetrantes, no permeables o extracelulares como la yema de huevo. Una de los crioprotectores penetrantes comúnmente empleadas es el glicerol, que fue descubierto por Polge y colaboradores en 1949 y desde entonces se convirtió en el crioprotector de elección para la criopreservación de semen en muchas especies (Alvarenga et al., 2005).

Su uso como crioprotector penetrante clásico, implica algunos inconvenientes en la criopreservación del semen equino. Algunos autores señalan su efecto tóxico causando alteraciones citoplasmáticas, en la membrana, en las proteínas superficiales que intervienen en la señalización celular, en la polimerización tubular y en la asociación de microtúbulos. Estas proteínas se desnaturalizan (Hammerstedt et al., 1990). La sensibilidad de los espermatozoides al glicerol es de especie dependiente (Curry, 2000), estando completamente contraindicado su uso en algunas especies como en el burro. Asimismo, existe variabilidad individual con respecto a la tolerancia al glicerol entre potros (Alvarenga et al., 2005), que podría estar relacionada en parte con la variabilidad en la fluidez de membrana de los espermatozoides. Se sabe que el glicerol afecta directamente a esta fluidez (Hammerstedt et al., 1990).

Asimismo, la toxicidad del glicerol parece estar relacionada a los efectos osmóticos debido a un aumento en el volumen celular y citoesqueleto, lo que disminuye la capacidad de adaptación del espermatozoide al estrés osmótico (Macías García et al., 2012).

Los crioprotectores menos tóxicos son las amidas (ejemplo. Dimetilformamida) tienen un uso creciente en la criopreservación del semen equino (Alvarenga et al., 2005). Un crioprotector ideal debería ser aquel con bajo peso molecular, gran solubilidad en el agua y una mínima toxicidad. Debido a que la mayoría de las amidas tienen un bajo peso molecular, comparadas con el glicerol, estos crioprotectores podrían inducir un daño osmótico menor. Ensayos de fertilidad realizados, muestran un significativo incremento en la fertilidad del semen equino congelado con dimetilformamida comparado con el glicerol (Medeiros et al., 2002).

Los fosfolípidos y lipoproteínas procedentes de la yema de huevo son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al daño desencadenado en la congelación espermática (Holt, 2000). El origen de la yema de huevo son varias especies como pato y oca (Trimeche et al., 1997; Clulow et al., 2007). También es importante, que la fracción de lipoproteínas con efecto crioprotector de la yema de huevo es la fracción de baja densidad (LDL) aunque no se conoce aún su mecanismo de acción crioprotector (Hu et al., 2008; Bencharif et al., 2010). Siendo de importancia su uso en el caballo Peruano de Paso. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y yema de huevo como crioprotectores no penetrantes en semen de caballo peruano de paso.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa a una altitud de 2328 msnm, con una temperatura promedio de 15,8 °C. (8,2 °C a 25,6 °C), humedad relativa entre 27 a 70% y una precipitación promedio de 78 mm anual. Siendo las coordenadas geográficas, latitud Sur 16° 23' 55,19", longitud Oeste 71° 3' 12,81" (SENAMHI, 2017).

LDL fue obtenido con los procedimientos descritos por Gonzales (2015). El protocolo inicia con la separación de la yema de huevo, Posteriormente se realizó la dilución 1:1 con la dilución fisiológica 0,17 M, homogenizando se refrigeró a 4°C, luego a esto centrifugó a 13000 RPM por 45 minutos, recuperando el sobrenadante. Luego de homogenizar y enfriar se procedió a una segunda centrifugación a 13000 RPM por 45 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante, ajustando a un pH de 8,7. Luego se diluyó con sulfato de amonio 1:1 para obtener una solución Sulfurada de amonio al 50% y se procedió a centrifugar 2 veces a 13000 RPM por 45 minutos para luego recuperar el sobrenadante

La colecta de semen se realizó con vagina artificial tipo Missouri, correspondiente a 4 potros adultos (05 eyaculados por potro) de la raza Peruano de Paso pertenecientes al Haras Los Amigos, ubicado en el anexo de Yumina, distrito de Sabandía – Arequipa. Inmediata a la colecta, se separó la fracción de gel y se procedió a su evaluación macroscópica y

microscópica, estabilización y posterior adición del dilutor de densidad gradiente de centrifugación Equipure® (Nidacon, Suecia). La centrifugación se realizó a 700 g, y el pellet fue diluido, refrigerado, envasado, congelado y descongelación siguiendo el protocolo de Samper (1998).

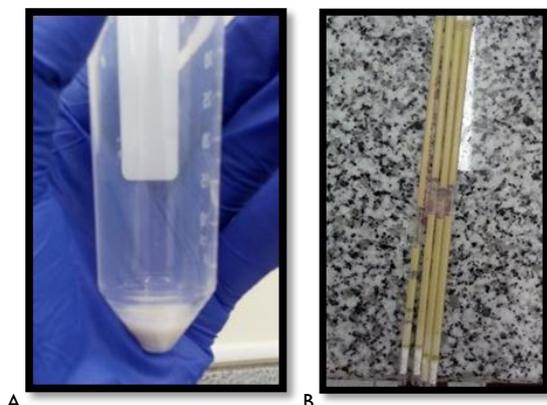


Figura 1. A) Pellet obtenido luego de la centrifugación y el retiro del plasma seminal, b) Envasado de pajillas 0,5cc.

El envasado fue en pajuelas de 0,5 cc a temperatura medio ambiente (ver Figura 1B). Inmediatamente, se llevó a refrigeración por 20 minutos hasta alcanzar 5 °C. Seguidamente, se expusieron a los vapores de nitrógeno líquido colocando las pajillas en una rampa metálica dentro de una caja de tecnopor a una altura de 6 cm del nitrógeno líquido, cuyo contenido tenía una altura de 4 cm. Luego, las pajillas se sumergieron a nitrógeno líquido, siendo almacenadas en tanque criogénico.

#### Descongelación de semen

Se retiraron las pajillas del nitrógeno líquido y se sumergieron en baño maría a 37 °C por 30 segundos.

#### Evaluación de parámetros de calidad espermática

Se evaluó la motilidad, concentración, funcionalidad de membranas, viabilidad y morfología espermática según los protocolos descritos por Moussa (2002).

La motilidad progresiva (espermatozoides que presentan movimientos de traslado caudocefálico) fue evaluado en un microscopio a 100X, con muestra colocada en lamina portaobjetos y precalentada a 37 °C siguiendo las recomendaciones de Palma (2001).

La viabilidad espermática se determinó por tinción vital Eosina-Nigrosina, para ello se colocaron 5µl de semen y 5 µl de solución de Eosina y Nigrosina, respectivamente sobre un portaobjetos precalentado en platina térmica a 37 °C y luego de 15 a 20 seg, se realizó el frotis. El análisis se realizó a un objetivo de inmersión (1000X). Se contabilizaron 200 espermatozoides y se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos).

El test de endosmosis (HOS) se realizó colocando en un criovial 125 µl de solución HOS a 37°C (fructosa anhidra: 0.675 g/l y citrato de sodio: 0.268g/l, calibrada a 55 mOsm/l en agua bidestilada) y 12.5 µl de semen. Se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se detuvo la reacción agregando 25 µl de solución

HOS-Formol. La evaluación se realizó en microscopio de contraste de fase a 400X, contando 100 células, considerando que los espermatozoides con hinchazón a nivel de la cola presentan sus membranas funcionales.

Para la determinación de la morfología e integridad acrosómica se utilizó Rosa de Bengala al 3% (m/v) atemperada. Posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El análisis se realizó a un objetivo de inmersión (1000X). Se contabilizaron 400 espermatozoides con anomalías en acrosoma, cabeza y cola.

#### Análisis estadístico

Los parámetros de calidad espermática fueron organizados para su análisis mediante estadística descriptiva. Las diferencias entre las medias fueron sometidas a un análisis de variancia ANOVA. Aun nivel de significancia estadística de  $\alpha=0,05$ .

## RESULTADOS

Los resultados de parámetros de calidad seminal obtenidos de la criopreservación de semen de caballos de paso peruano se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de calidad seminal de semen criopreservado adicionado con yema de huevo y LDL como agente crioprotector no penetrante.

Parámetros	Dilutor de congelacion + Yema de Huevo	Dilutor de congelacion + LDL
Motilidad total, % (0 min)	27,5 ± 2,83	48,9 ± 2,02
Motilidad total, % (20 min)	19,3 ± 1,89	38,2 ± 2,27
Mot. progresiva, % (0 min)	21,5 ± 2,88	38,35 ± 0,77
Espermatozoides vivos, %	30,35 ± 7,23	45,9 ± 6,16
Esp. membrana funcional, %	42,1 ± 5,52	59,3 ± 10,23
Anormalidades espermáticas		
En acrosoma, %	1,05 ± 0,25	0,55 ± 0,19
En cabeza, %	0,95 ± 0,70	0,5 ± 0,35
En cola, %	2,45 ± 1,50	1,35 ± 0,96

En la Tabla 1 se comparan muestras independientes tratadas con LDL y yema de huevo. La motilidad progresiva evaluado post descongelación es superior con la adición de LDL, al igual que el porcentaje de espermatozoides vivos, siendo estos resultados significativos estadísticamente ( $p<0,05$ ). Aunque, las anomalías en acrosoma, cabeza y cola espermática son numéricamente menores en el semen adicionado con LDL.

## DISCUSION

Los valores de motilidad espermática fueron diferentes estadísticamente ( $p<0,05$ ) en muestras de LDL y yema de huevo y son similares a los resultados obtenidos por Amirat et al. (2004) y Moreno et al. (2013) quienes usaron concentraciones del 2 y 3% de LDL en semen de caballos con una mejora de la integridad plasmática, integridad acrosómica y en los patrones de motilidad.

Las anomalías espermáticas no fueron diferentes ( $p > 0,05$ ) en las muestras de LDL y yema de huevo. Esta información es corroborada por Graham (2000). Sin embargo, reportes de Moreno et al. (2013) indican que el 78% de los espermatozoides no presentaron anomalías con el uso de dilutores a base de LDL, esta diferencia es probablemente mantiene mejor la morfología y viabilidad espermática en el semen de caballos de la raza de Paso Peruano. La película que forma los fosfolípidos presentes en esta fracción de LDL (Anton et al., 2002) ayudan a mejorar la calidad de semen criopreservado del caballo de la raza Peruano de Paso, lo que concuerda con Moussa et al. (2002); Amirat-Briand et al. (2010); Bencharif et al. (2008); Canisso et al. (2008) y Hu et al. (2010); quienes indican recomiendan utilizar un dilutor con LDL extraído de la yema.

## CONCLUSION

La calidad del semen criopreservado adicionando LDLs es superior al uso de yema de huevo en Caballos de Paso Peruano.

## CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: JR, VP; Desarrollo de la metodología: JB, JR, FF, VP; Concepción y diseño: JR, VP, SH, XB; Edición del artículo: VP, XB; Supervisión del estudio: JR, VP, FF.

## REFERENCIAS

- Anton M, Martinet V, Tainturier D, Moussa M. Procédé de production d'une fraction purifiée de lipoprotéines de faible densité du jaune d'œuf et milieu de conservation incorporant de telles lipoprotéines. 2001. French patent n° 0100292.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 2008; 70: 1478-1488.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 2008; 70(9):1478-88. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.095.
- Bencharif D. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. Article in *Animal Reproduction Science*. 2010; 122(3-4):282-7.
- Canisso IF, Souza FA, Silva EC, Martinez M, Lima AL. Egg yolk and ldl: possibilities for artificial insemination in equines. *Rev. MVZ Córdoba*. 2008; 13(3):1514-1521.
- Clulow JR, Maxwell WMC, Evans G, Morris LHA. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J.* 2007; 85: 232-235.
- García BM, Ferrusola Co, Aparicio IM, Miró-Morán A, Rodríguez AM, Bolaños GJM, González Fernández L, Balao da Silva CM, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*. 2012; 77(7):1280-9.
- Gonzales R. Extracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo. [Internet]. 2015. [Citado 24 Mayo, 2017]. Disponible en: [https://www.youtube.com/watch?v=iEIh6Lf3\\_QA](https://www.youtube.com/watch?v=iEIh6Lf3_QA)
- Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. 2000. Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Stockholm%Abstracts. 2: 307
- Hu JH, Li QW, Za LS, Jian ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing thawing. *Anim Reprod Sci*. 2010; 117:11-17
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low density lipoproteins in extender% son bull spermatozoa following freezing;thawing. *Anim. Reprod. Sci*. 2010; 117: 11-17.
- Medeiros A, Gomes G, Carmo, Papa F, Alvarenga M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 2002; 58: 273-276. doi: 10.1016/S0093-691X(02)-00898-1
- Moreno D, Bencharif D, Amirat-Briand, L, Neira A, Destrumelle S, Tainturier, D. Preliminary Results: The Advantages of Low-Density Lipoproteins for the Cryopreservation of Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013; 33(12):1068-1075
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002; 7(6):1695-1706.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002; 57:1695-1706.
- Palma AG. Biotecnología de la Reproducción. 2001. Balcarce, Argentina, p. 527.
- Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation. *Theriogenology*. 1998; 49: 895-903.
- Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 1997; 34:385; 393.