

## **Efecto del colesterol sobre la motilidad e integridad de membrana en espermatozoide criopreservado de alpaca**

### **Cholesterol effect on motility and membrane integrity of cryopreserved sperm of alpaca**

Rene Ciprian<sup>a,b,\*</sup>, Hernán C. Cucho<sup>a</sup> , Armando E. Alvarado<sup>b</sup> ,  
Amalia del Pilar Gallejos-Cárdenas<sup>b,c</sup> 

<sup>a</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.

<sup>b</sup> Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

<sup>c</sup> Servicio de Reproducción Animal, Programa de Mejoramiento Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

\* Autor de correspondencia: [rene\\_ciprian@hotmail.com](mailto:rene_ciprian@hotmail.com)

<https://doi.org/xxxxxxx>

Recepción: 16 de noviembre 2020 | Aprobación: 12 de diciembre 2020 | Publicación: 01 de enero 2021

### **Resumen**

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la adición de colesterol sobre la motilidad e integridad de acrosoma del espermatozoide criopreservado de alpaca. Se utilizaron 15 eyaculados obtenidos de alpaca y colectados por vagina artificial. La motilidad inicial fue mayor al 60 %. Las variables evaluadas fueron la motilidad e integridad de membrana de espermatozoide posdescongelado. La viscosidad de semen fresco fue tratada con una solución de colagenasa al 0,1 % y posteriormente la muestra tratada, fue dividido en tres alícuotas para la adición de 0,2 y 4 mg de ciclodextrina cargada de colesterol (CLC) por cada 120 millones de espermatozoides. La dilución se realizó en dos pasos, con un dilutor Tris + 20 % de yema de huevo, se usó 6 % de glicerol como crioprotector, envasado en pajuelas de 0,5 ml y la congelación horizontal en vapores de nitrógeno y almacenado en nitrógeno líquido. El análisis de los resultados preliminares de motilidad e integridad de membrana espermático posdescongelado fueron analizados como un DBCA. Se encontró diferencia altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre tratamientos para motilidad espermática y no se encontró diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) para la integridad de membrana espermática. Los resultados muestran un incremento favorable al uso de colesterol en la criopreservación de semen.

**Palabras clave:** alpaca, espermatozoide, criopreservación, colesterol, motilidad, integridad de membrana

## Abstract

The objective of the study was to evaluate the effect of the addition of cholesterol on the motility and integrity of the acrosome of the cryopreserved alpaca sperm. We used 15 ejaculates obtained from alpaca collected by artificial vagina, the initial motility was greater than 60%. The variables evaluated were motility and membrane integrity of post-thawed spermatozoa. The fresh semen viscosity was treated with a 0.1% collagenase solution and then, the treated sample was divided into three aliquots for the addition of 0, 2 and 4 mg of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) per 120 million spermatozoa. The dilution was in two steps with a Tris diluent + 20% egg yolk, 6% glycerol was used as cryoprotectant, loaded in 0.5 ml straws and horizontal freezing in nitrogen vapors and stored in liquid nitrogen. The analysis of the preliminary results of motile and membrane integrity of post-thawed spermatic were analyzed as a DBCA. We found a significant difference ( $P < 0.01$ ) between treatments for sperm motility and no significant difference ( $P > 0.05$ ) was found for sperm membrane integrity. The results show a favorable increase in the use of cholesterol in cryopreservation of semen.

**Keywords:** alpaca, sperm, criopreservación, colesterol, motilidad, integridad de membrana.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

En las alpacas la supervivencia espermática de semen después del descongelado es muy baja, por lo que el uso de la inseminación artificial en esta especie está limitado, en comparación a otras especies.

Es conocido el daño causado por congelación en los espermatozoides, que influye en la pérdida de motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y la capacidad fertilizante del esperma congelado-descongelado (Holt, 2000).

El colesterol cumple un papel importante en muchas funciones del esperma, que incluyen efectos sobre las propiedades de la membrana. De estos efectos, la estabilización las membranas a bajas temperaturas y el aumento del contenido de colesterol de las membranas del espermatozoide pueden mejorar la calidad del esperma después del proceso de descongelación (Mocé *et al.*, 2010a).

Las ciclodextrinas son capaces de transferir el colesterol o de extraer el colesterol de las membranas de muchos tipos de células,

incluidos los espermatozoides. Se cree que esta transferencia se produce por gradiente de concentración (Moore *et al.*, 2005).

Las ciclodextrinas son oligosacáridos obtenidos de la degradación enzimática del almidón. Tienen la particularidad de presentar un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica que puede acoger moléculas orgánicas no polares, como los lípidos.

Varios estudios obtuvieron un mayor porcentaje de supervivencia después del proceso de descongelación, cuando los espermatozoides fueron tratados con ciclodextrina cargada de colesterol (CLC) antes de la congelación en equinos (Moore *et al.*, 2005), en toros (Purdy y Graham, 2004), carneros (Mocé *et al.*, 2010b) y dromedarios (Crichton *et al.*, 2015).

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la adición de colesterol sobre la motilidad e integridad de espermatozoide criopreservado de alpaca.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación y duración de la investigación

El estudio fue realizado en los meses de enero a abril del 2017, en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a 4133 metros de altitud.

### 2.2. Muestras y procedimientos

Se utilizaron 5 alpacas machos de entre 5 a 6 años de edad, que aceptaban la colección de semen por vagina artificial en maniquí. El tiempo de colección de semen fue a intervalos de una semana. Los animales fueron mantenidos con una alimentación en pastura natural. Se obtuvieron tres muestras de semen por alpaca. La evaluación de motilidad en integridad de membrana fue realizada en semen descongelado. Para ello, se utilizó un microscopio de contraste de fases con platina caliente, y se capturaron imágenes en un equipo ISAS® v. 1.2. La motilidad espermática fue determinada por la observación del movimiento de la cola del espermatozoide a 200x de aumento, para ello se empleó 5  $\mu$ L de semen sobre un portaobjetos. La integridad de membrana fue determinada por la prueba de HOST (*Hipo Osmotic Swelling Test*) mediante una solución hiposmótica con osmolaridad de 50 mOsm/Kg, donde 25  $\mu$ L de semen fueron incubados en 100  $\mu$ L del medio, durante 15 minutos a 37 °C, y al final se agregó una solución formolada para detener la reacción. La evaluación microscópica fue a 400x, donde se observó el enrollamiento de la cola del espermatozoide.

Al inicio, el semen fresco fue tratado con una solución de colagenasa al 0,1 %, incubado a 37 °C por 4 minutos, se centrifugó a 3000 rpm/5 min, se eliminó el

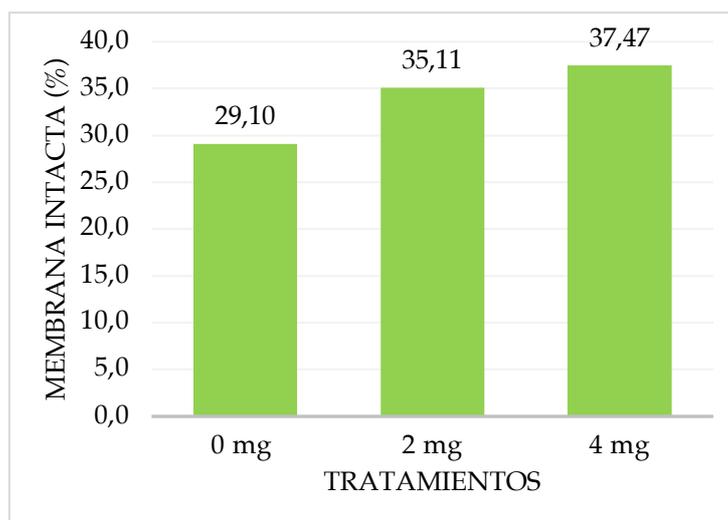
sobrenadante, se dividió en tres alícuotas (tratamiento) para adición de 0,2 y 4 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides y posteriormente incubado a 37°C por 15 minutos (Purdy y Graham, 2004). Después se hizo una primera dilución (1:1) con dilutor tris + 20 % de yema de huevo y luego fue llevado a refrigeración a 4 °C por 2 horas. Posteriormente a este tiempo se hizo una segunda dilución (2:2) con dilutor tris +20 % de yema de huevo y 12 % de glicerol. El envasado se realizó en pajuelas de 0,5 ml y un periodo de equilibrado de 1 hora a 4 °C. El tipo de congelación fue horizontal en vapores de nitrógeno y almacenado a -196 °C en nitrógeno líquido. El descongelado fue después de 7 días.

### 2.3. Análisis estadístico

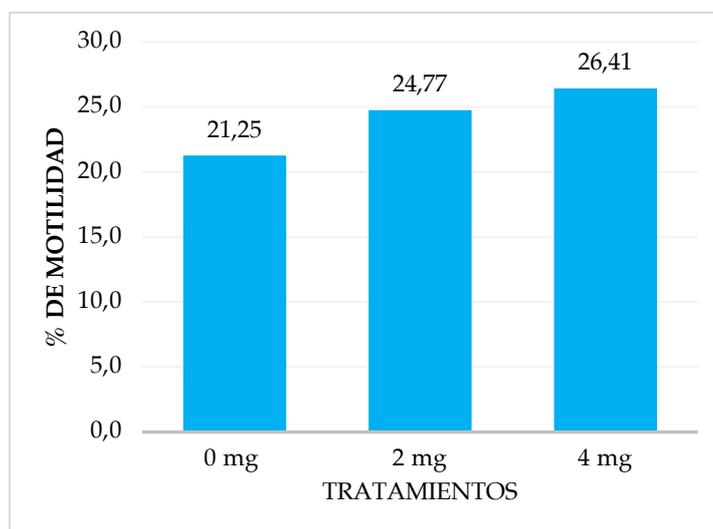
En el análisis estadístico, la normalidad de la motilidad e integridad de membrana fueron analizadas con el test de Shapiro-Wilk. Las variables evaluadas fueron analizadas en un diseño de bloques completamente al azar y se empleó el test de Duncan para comparar las medias.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trabajó con 15 muestras de semen, cuya motilidad inicial en semen fresco fue mayor al 60 %. Los resultados preliminares muestran que se encontró diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre machos, para las variables de motilidad e integridad de membrana en espermatozoides posdescongelado. Se encontró diferencia estadística altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre tratamientos para la motilidad espermática posdescongelamiento y no se encontró diferencia estadística significativa ( $P > 0,05$ ) entre tratamiento para la integridad de membrana espermática posdescongelamiento.



**Figura 1.** Motilidad espermática de semen criopreservado de alpaca, tratado con CLC.



**Figura 2.** Integridad de membrana espermática en semen criopreservado de alpaca, tratado con CLC.

Los resultados de motilidad en alpacas siempre han sido bajos, pero si conseguimos cambiar el contenido de colesterol de las membranas plasmáticas se podría mejorar la criosupervivencia espermática. La adición de 4 mg de CLC, antes de la criopreservación de semen, mostró mejores resultados (figura 1). Este valor es superior a lo reportado por Flores *et al.* (2015), Zirena (2014) y Olaguivel y Naveros (2014), quienes obtuvieron 10,4, 18,68 y 24,75 % respectivamente. Posiblemente esta diferencia se deba a la adición de colesterol, porque el tratamiento

de la viscosidad fue parecido. Los autores señalan que las muestras fueron sometidos a un tratamiento físico y/o enzimático. También indican que el tipo de dilutor, nivel de crioprotector, protocolos de congelación son aspectos que influyen sobre la supervivencia espermática posdescongelado.

Choez *et al.* (2013) indicaron que la motilidad inicial de trabajo es un aspecto importante que influye en el resultado final que se obtendrá. Las muestras con una motilidad inicial mayor al 60 % logran mejores porcentajes de motilidad después

del descongelamiento, posiblemente este aspecto ha influido en los resultados de la presente investigación porque, en el tratamiento control, se observó una buena motilidad espermática.

La adición de CLC, antes del proceso de la congelación, también ha mejorado el porcentaje de espermatozoide con membrana intacta (figura 2). Zirena (2014), Banda *et al.* (2010) y Choez *et al.* (2013) encontraron valores de 22,82, 24,3 y 36 % de espermatozoides posdescongelados con membrana íntegra respectivamente. Estos resultados son inferiores a los datos obtenidos en la presente investigación. Posiblemente estas diferencias se deban al efecto de la adición de CLC. También por el tipo de semen (epididimario y/o entero), la osmolaridad de la solución, ya que al usar un medio de menor valor hiposmótico se tiene mayor reacción de la membrana espermática. Además, indicar que generalmente la funcionalidad de membrana siempre es un valor mayor a la motilidad y varía de acuerdo al resultado de este.

Mocé *et al.* (2010a), al evaluar los parámetros de motilidad y la integridad de membrana plasmática, indica que el tratamiento de los espermatozoides con CLC antes de la criopreservación mejora las tasas de supervivencia en 2 a 24 %. Este beneficio del tratamiento de CLC depende del espermatozoide de diferentes especies, líneas dentro de una especie, entre machos y para espermatozoides tratados de diferentes maneras.

#### 4. CONCLUSIONES

La inclusión de colesterol en el proceso de congelación de semen de alpaca mejora significativamente las variables de motilidad e integridad de membrana espermática, que obtuvo una mayor supervivencia.

#### Referencias bibliográficas

- Banda, J., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodríguez Ll, C., Valdivia, M., & Santiani, A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21(2), 145-153.
- Choez, K., Evangelista, S., Castillo, R., & Santiani, A. (2013). Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova*, 3, 83-84.
- Crichton, E. G., Pukazhenth, B. S., Billah, M., & Skidmore, J. A. (2015). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 83(2), 168-174.
- Flores, N. H., Cucho, H., Carretero, M. I., Ciprian, R., Quispe, H., Calderón, N., Miragaya, M. & Giuliano, S. (2015). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *Spermova* 2015; 5(1): 47 - 50
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.
- Mocé, E., Blanch E., Tomás, C., & Graham, J. K. (2010a). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(s2), 57-66.
- Mocé, E., Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2010b). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal reproduction science*, 118(2), 236-247.
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51(3), 241-249.
- Olaguivel, C., & Naveros, M. (2014). Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova*, 4(1), 64.

Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48(1), 36-45.

Zirena, N. (2014). *Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación*. Tesis UNMSM, Lima.