

Capítulo LXVI

Desarrollo de nuevos diluyentes para la crioconservación del semen bovino en Ganadería Doble Propósito

Oscar Vera Muñoz

El desarrollo de la ganadería de doble propósito es una respuesta venezolana y de la América Tropical para hacer un uso sostenible, eficiente y rentable de los recursos naturales, humanos y económicos en la producción de leche y carne de bovinos. Los ganaderos venezolanos han manejado estratégicamente sus sistemas de producción para adaptarlos a las circunstancias del momento (genética, alimentación, manejo y productos para el mercado), por lo cual han logrado su sostenibilidad en el tiempo, basándose en la plasticidad adaptativa de los sistemas de doble propósito.

En la actualidad existe un rebaño nacional doble propósito que debido a su mestizaje, contiene elementos básicos necesarios para permitir un significativo mejoramiento cualitativo y cuantitativo de la ganadería, formando una importante base genética, que de otra manera tardaría varios años en lograrse. En ese sentido, esa genética ha dado base para la creación de bancos de germoplasma en la forma de cientos de miles de dosis de semen congelado que representan un patrimonio nacional para el mejoramiento de la ganadería venezolana y la de otros países tropicales.

En Venezuela se cuenta con dos razas propias, la Criollo Limonera (Bracho y col., 2002) y la Carora, adaptadas al trópico y capaces de mejorar la fertilidad, la producción lechera y la calidad de la carne, en cruces con animales cebuinos, para producir el doble propósito. Así mismo, la introducción y expansión de la raza de carne Romosinuano, proveniente de Colombia y de otras razas europeas, utilizadas en planes de cría basados en cruzamientos, en conjunto con la Criollo Limonero y la Carora, sobre la base mestiza acebuada actual, pueden dar resultados altamente favorables en el mediano plazo.

EVALUACIÓN DE LOS TOROS REPRODUCTORES

Es de conocimiento general que el papel reproductivo de los toros en el hato es de gran importancia, ya que son responsables en más del 70% del mejoramiento gené-

tico en los cruces, por lo cual su impacto sobre los índices de producción en carne y leche en la finca podría ser positivo o negativo. Muchos trabajos de investigación han demostrado que en sistemas de producción de carne, leche y/o doble propósito la fertilidad es el factor más importante desde el punto de vista económico. Es diez veces más importante que la calidad de la raza y cinco veces más que la ganancia de peso. A pesar de estas aseveraciones, algunas explotaciones dan prioridad a la selección del fenotipo que al desempeño reproductivo.

Por esta razón, la evaluación física de los toros y de la calidad de su semen deben constituirse en prácticas de rutina en las ganaderías que quieren producir de forma eficiente. Se ha comprobado que en poblaciones no controladas de toros en sistema de monta directa, uno de cada cinco toros es subfétil, con poca habilidad de monta y/o pobre calidad seminal, sin embargo, se mantienen en el rebaño enmascarados por los toros que si son fértiles. Esto se traduce en bajas tasas de preñez, repeticiones de celo y/o disminución de la eficiencia reproductiva. Cualquiera de estas consecuencias representa para el ganadero una disminución en la productividad y por ende en los ingresos económicos de las fincas.

La dinámica actual de los programas ganaderos en el país no justifica la inversión para adquirir un toro reproductor valioso, que luego irá a servir un lote de vacas mediante la monta natural, desaprovechando, sub utilizando y limitando un gran potencial genético a un solo grupo de vientres. En consecuencia, la utilización de semen congelado de toros reproductores seleccionados, de alto valor genético dentro de programas de inseminación artificial, se ha establecido como una práctica rutinaria para acelerar el avance genético y desarrollo de la ganadería de doble propósito.

RECOLECCIÓN, CLASIFICACIÓN Y CONGELACIÓN DEL SEMEN BOVINO

La técnica de la congelación del semen bovino permite que el potencial genético de los machos sea aprovechado al máximo. Esta técnica logra:

- Conservar el semen de los mejores toros seleccionados de su ganadería y la formación de bancos de semen de diferentes razas y sus cruces
- Llevar el material genético de toros reproductores superiores de diferentes razas y sus cruces portadores de genes de alto valor a productores ganaderos en diferentes partes del país y el mundo
- Generar ingresos adicionales a la finca por medio de la venta y mercadeo de las dosis obtenidas con la congelación del semen (pajuelas)
- Generar la mejora genética en diferentes zonas aplicando semen de alta calidad genética, por medio del uso de la inseminación artificial bovina.

Además, la ganadería de doble propósito al igual que otro tipo de ganadería se propone obtener el máximo rendimiento en la mejora genética por medio de otras biotecnologías reproductivas tales como la transferencia de embriones (TE), aspiración folicular (OPU) y la fecundación *in vitro* (FIV), las cuales están en desarrollo actualmente en Venezuela, aunque aún no se ofrecen como servicio sistemático de rutina.

Los buenos resultados en la inseminación artificial (IA) son consecuencia de una serie de eventos encadenados entre sí, basados en una estrecha relación entre el desempeño del inseminador (aplicación correcta de la técnica), las hembras a inseminar y un semen de óptima calidad. Existen pruebas de laboratorio que permiten estimar la calidad seminal y que son útiles cuando son realizadas correctamente e interpretadas con buen criterio. En la evaluación de semen congelado se tienen en cuenta al menos tres parámetros básicos: viabilidad post-descongelación, morfología y número de espermatozoides con movilidad progresiva por dosis para IA, garantizando que el semen que se está usando con las vacas sea óptimo para lograr el principal objetivo de la inseminación artificial, que es una nueva preñez.

PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

El proceso de congelación del semen involucra diferentes etapas: reducción de la temperatura, deshidratación celular, congelación y descongelación de los espermatozoides. Los espermatozoides no están adaptados a soportar bajas temperaturas, por eso la criopreservación reduce la viabilidad de los espermatozoides y la funcionalidad normal. El daño celular puede ser inducido por distintos mecanismos en cada una de las etapas del proceso de la congelación. El estado funcional de los espermatozoides descongelados es el resultado del daño acumulado a través de las diferentes etapas del proceso de congelación.

ENFRIAMIENTO Y “CHOQUE TÉRMICO” DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

Los espermatozoides de mamíferos en especial los de bovino son muy sensibles al enfriamiento a temperaturas inferiores a la temperatura corporal y cercanas al punto de congelación del agua. A esa temperatura los espermatozoides sufren daño, situación que es conocida como “choque térmico” o “choque por frío”, que se manifiesta como una pérdida irreversible de la movilidad de un importante porcentaje de espermatozoides de la muestra tratada (Parks, 1997). El choque térmico afecta diversas funciones celulares de los espermatozoides, como la pérdida de selectividad en la permeabilidad de la membrana y una disminución de la integridad de la membrana. Desde un punto de vista estructural, el choque térmico se manifiesta como un daño de la membrana acrosomal, la cual es importante en su interacción con el gameto femenino. Los efectos del choque térmico pueden ser prevenidos controlando la tasa de enfriamiento y adicionando al medio de dilución y de conservación del semen los componentes protectores (Parks, 1997). Se ha determinado experimentalmente que si el enfriamiento del semen bovino diluido desde la temperatura corporal hasta 5°C se realiza a una tasa de $\leq 10^{\circ}\text{C/hr}$, con el uso de agentes crioprotectores tales como la yema de huevo o leche descremada y glicerol, pueden ser reducidos la severidad y extensión de los efectos del choque térmico (Parks, 1997). Los componentes en la yema de huevo y de la leche descremada y el mecanismo por el cual ellos protegen la membrana del espermatozoide no están aún claros. El mecanismo protector de la yema de huevo parece relacionado a los fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en la leche descremada se ha vinculado con fracciones de proteínas.

En la etapa de enfriamiento previo al proceso de congelación, es decir, en el paso de 37°C a 5°C se reduce la actividad metabólica de los espermatozoides lo cual permite el aumento en el tiempo de la viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, debido al hecho que el espermatozoide tiene muy limitada la capacidad biosintética, dependerá casi exclusivamente de la actividad catabólica para funcionar (Hammerstedt *et al.*, 1997), lo cual lleva a la muerte celular, propia de su proceso de envejecimiento normal. Por lo tanto, para detener los procesos metabólicos y conservar a los espermatozoides, las células necesitan ser sometidas a vapores de nitrógeno líquido por debajo de -130°C, para así detener completamente las reacciones bioquímicas del espermatozoide.

DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN: ENSAYOS CON LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD COMO AGENTE CRIOPROTECTOR

La congelación de los espermatozoides para su almacenamiento y utilización posterior en IA es por esas razones, un proceso indispensable. Este proceso tiene consecuencias fisicoquímicas sobre los espermatozoides, ya que los cristales de hielo que se forman pueden dañar la membrana de los espermatozoides, bien sea por efecto mecánico o por efecto osmótico. Por esta motivo, inmediatamente después de la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con un medio protector (medio de dilución) antes de congelarse (Nau *et al.*, 2003). La yema de huevo se utiliza clásicamente desde hace más de 50 años en los medios de dilución como agente protector, con el fin de preservar los espermatozoides de mamíferos del choque térmico. Numerosos autores (Pace & Graham, 1974; Polge, 1980; Quinn & Chow, 1980) encontraron que la fracción de baja densidad de la yema de huevo, principalmente compuesta de lipoproteínas de baja densidad (LDL), sería responsable de la resistencia de los espermatozoides bovinos a los choques térmicos cuando se encuentran a 5°C y de la conservación de la movilidad espermática después del almacenamiento a -196°C y de su posterior descongelación a 37°C; además de la presencia inseparable del glicerol en el medio como segundo crioprotector. Foulkes (1977), Polge (1980) y Graham & Foote (1987) sugirieron que las LDL se adhieren a las membranas celulares durante el proceso de congelación-descongelación, preservando así la integridad física y estructural de los espermatozoides. No obstante, los roles respectivos de las proteínas y lípidos constitutivos de las LDL no se han establecido claramente (Nau *et al.*, 2003). La hipótesis más ampliamente aceptada es que ciertas proteínas del plasma seminal bovino (BSP-A1, BSP-A2, PSP-A3 et BSP-30kDa) se adhieren a la superficie de la membrana del espermatozoide al momento de la eyaculación e inducen la liberación de colesterol y fosfolípidos, desestabilizando a la membrana de los espermatozoides (Bergeron *et al.*, 2004). Las LDL en el medio de dilución interactúan específicamente con estas proteínas y limitan la adhesión a la membrana del espermatozoide; de esa manera, la fuga de colesterol se reduce, mientras que aumenta la sobrevivencia de los espermatozoides después de la descongelación (Bergeron *et al.*, 2004; Purdy & Graham, 2004).

Durante estos últimos años, han aparecido demandas crecientes para la sustitución de la yema de huevo en los medios de dilución del semen debido al riesgo de contaminación bacteriana (Bousseau *et al.*, 1998), como también debido a la presencia en

la yema de huevo de sustancias que inhiben el metabolismo de los espermatozoides y disminuyen su movilidad. Este último inconveniente ha sido eliminado por la purificación únicamente del agente crioprotector de la yema de huevo, las LDL (Nau *et al.*, 2003). En los últimos años, se ha desarrollado un método simple de extracción de las LDL de la yema de huevo en el INRA (Instituto Nacional de la Investigación Agronómica) de Nantes (Moussa *et al.*, 2002). Este método conduce a lograr tasas de pureza que llegan hasta un 97%, con rendimientos de cerca de un 67%, lo que es fácilmente transportable a escala industrial ((Nau *et al.*, 2003). Se han probado varias concentraciones de LDL purificadas (de 2,5 al 20% peso/volumen) en medios de dilución para la congelación de semen de toro. Estos extractos de LDL purificados resultaron superiores a las preparaciones comerciales en términos de conservación de la movilidad y supervivencia de los espermatozoides, cuando están presentes en el medio de dilución hasta un máximo de 8% peso/volumen. En la actualidad son necesarios trabajos complementarios para evaluar la eficacia de las LDL extraídas de la yema de huevo bajo condiciones de campo, en refrigeración y frente al semen de otras especies, así como investigar y aclarar el mecanismo crioprotector de las LDL.

Procedimiento de extracción de las LDL de la yema de huevo

El procedimiento de extracción de las LDL a partir de la yema de huevo comienza por la homogenización de la yema con cloruro de sodio para obtener la fracción que se denomina plasma de la yema de huevo; a continuación se adiciona una solución de amonio al plasma. Después de la eliminación por centrifugación del precipitado formado y recuperación de la fracción enriquecida con LDL del plasma de la yema de huevo, ésta se somete a una diálisis contra una solución acuosa, de preferencia salina, con el fin de provocar, en el curso de la eliminación de los iones amonio, una precipitación selectiva de las LDL para obtener la fracción purificada de LDL (Moussa *et al.*, 2002).

Crioprotectores de origen vegetal

Con el objetivo de encontrar un diluyente con un agente crioprotector no originado en tejidos animales, se han desarrollado diluyentes comerciales preparados a base de lecitina de soya. Un ejemplo es el diluyente comercial Biociphos Plus (van Wagtendonk-de Leeuw *et al.*, 2000). La determinación de las tasas de fertilidad para el diluyente Biociphos han sido similares a las encontradas para diluyentes controles como el Tris-yema-glicerol.

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que se forman en algunos procesos de degradación del almidón. En los últimos años, se ha publicado un número creciente de artículos científicos que se ocupan de ellas, habiéndose patentado diversas aplicaciones. Estas moléculas presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas apolares. En el caso del semen bovino, las ciclodextrinas han sido cargadas con colesterol y se han evaluado en sustitución de la yema de huevo y de otros crioprotectores para la congelación del semen,

obteniéndose resultados similares en cuanto a la conservación del porcentaje de movilidad postcongelación a los reportados para diluyentes con crioprotectores de origen animal.

En este Capítulo presentamos unas de las moléculas de la yema de huevo, más prometedoras en términos de aplicaciones biotecnológicas, las LDL. Estas moléculas implicadas son lipoproteínas de baja densidad (LDL). En particular, nos interesamos en conocer las actividades crioprotectoras de la yema de huevo y específicamente de los LDL.

VALIDACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE NUEVOS DILUYENTES DEL SEMEN DE BOVINO EN GDP

A continuación presentamos tres experiencias enmarcadas dentro de una línea de investigación que corresponde a “Riesgos sanitarios de las biotecnologías de la reproducción”. Estas experiencias están encabezadas por la Escuela Nacional Veterinaria de Nantes en Francia y realizadas en colaboración con el Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay. La primera de ellas evalúa las tasas de fertilidad del semen congelado en el diluyente LDL al 8% en un Centro de congelación e Inseminación Artificial en condiciones reales de prueba; se utilizaron 3 toros reproductores y se inseminaron 95 hembras para el diluyente preparado a base de yema de huevo tomado como control y 98 vacas inseminadas con el semen congelado en el diluyente LDL al 8%. El segundo trabajo aborda el problema del efecto de la dilución cuando se quiere producir un número mayor de dosis de inseminación por eyaculado y el comportamiento del diluyente en prueba (LDL 8%) frente a un diluyente preparado a base de yema de huevo y otro preparado a base de lecitina de soya. Por último, el tercer trabajo evalúa la capacidad de conservación del semen refrigerado a 4°C en este nuevo diluyente (LDL 8%), en comparación a un control preparado a base de yema de huevo entera.

Resultados de fertilidad luego de la inseminación artificial usando semen congelado en LDL al 8%

Una primera prueba de este ensayo permite poner a prueba el diluyente LDL 8% en condiciones reales de las exigencias de un Centro de Congelación e IA y probar su efectividad en una primera prueba para validar su eficacia. El semen fue recolectado de tres toros reproductores de fertilidad probada del Centro de Inseminación de La Crespelle (Francia). La calidad del semen fue determinada previamente a la dilución y congelación del semen. La movilidad fue determinada usando un sistema de análisis computarizado de la motilidad (Hamilton Thorne, CA) y también fue determinada la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante el test hipo-osmótico. El semen fue separado en dos fracciones, una de ellas diluida en Tryladil[®], un diluyente comercial preparado a base de yema de huevo y la segunda fracción fue diluida en el diluyente LDL al 8% en materia seca, preparado en el laboratorio de Patología de la Reproducción de la Escuela Nacional Veterinaria de Nantes en Francia, según el protocolo de Moussa *et al*, (2002). Un grupo de 95 vacas fueron in-

seminadas con dosis conteniendo semen que había sido congelado en Triladil y 98 vacas con el diluyente LDL 8% (Amirat-Briand *et al.*, 2010) (Cuadro 1).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los índices de fertilidad por IA entre el semen que había sido congelado con el diluyente LDL 8% (59,2%) y el diluyente control, Triladil (65,3%). Hay que destacar que en este experimento se obtienen por primera vez vacas gestantes inseminadas con el semen congelado procesado con el diluyente LDL 8% (Amirat-Briand *et al.*, 2010). En conclusión, la fertilidad in vivo del semen congelado en LDL 8% se mantuvo similar a la del diluyente control preparado con yema de huevo entera. La evidencia son las gestaciones obtenidas después de la IA y los nacimientos de los animales vivos.

Cuadro 1
Efecto del diluyente utilizado para la congelación del semen
sobre la fertilidad a la inseminación (%)

Diluyente	Nº Vacas		Fertilidad al primer servicio (%)
	Inseminadas	Gestantes	
Triladyl	95	62	65,3
LDL 8%	98	58	59,2

Efecto de la dilución espermática y las ventajas económicas en la producción de pajuelas e IA con bajas concentraciones de espermatozoides

La IA con dosis que contienen concentraciones bajas de espermatozoides se han utilizado para optimizar el uso de los toros elite. Como ya se mencionó, la yema de huevo de gallina es ampliamente utilizada como agente crioprotector en los diluyentes para congelación del semen porque protege a los espermatozoides, lo cual se atribuye a la presencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El objetivo de esta fase del estudio fue evaluar los efectos de la dilución del semen y de una baja concentración de espermatozoides por dosis de inseminación sobre la movilidad y la integridad de la membrana plasmática después del proceso del criopreservación. Se usaron tres diluyentes comerciales: 1) Triladyl, como tratamiento control a base de yema de huevo; 2) Bioxcell, diluyente comercial preparado con lecitina de soya en sustitución de la yema de huevo; 3) diluyente LDL 8% preparado en el laboratorio (pureza de 97%). Quince eyaculados de cinco toros mestizos (*Bos indicus* × *Bos taurus*) del IRA de la FCV-UCV, núcleo Maracay, fueron colectados y evaluados; la movilidad de los espermatozoides fue examinada por el sistema de análisis computarizado de la motilidad (Hamilton Thorne), las características morfológicas de los espermatozoides por microscopia de interferencia diferencial y la integridad de la membrana plasmática usando el test hiposmótico. El semen fue dividido en tres alícuotas y luego diluido con los tres diluyentes para lograr tres concentraciones de 120×10^6 , 60×10^6 , 20×10^6 espermatozoides/mL, que corresponderían a 30, 15 y 5 millones de espermatozoides por dosis de inseminación respectivamente, en pajuelas de 0,25 ml. Este estudio reveló que el diluyente LDL 8% fue más eficaz en la preservación de la movilidad y la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide que Bioxcelll y Triladyl

($p < 0,05$; ANOVA) (Cuadro 2); el análisis de varianza no reveló ninguna diferencia significativa entre Triladyl y Bioxcell. Se pudo concluir que el diluyente LDL 8% se podría utilizar en vez de Triladyl1 o de Bioxcell1 en la elaboración de dosis para IA con una baja concentración de espermatozoides en toros elite. Es también posible sugerir su uso para la producción industrial del semen sexado, para el cual se utilizan dosis a muy baja concentración (Vera-Munoz *et al.*, 2009).

Cuadro 2

Efecto de la disminución de la concentración espermática sobre la movilidad después de la congelación-descongelación del semen bovino en función del diluyente

Diluyentes	Concentración espermática (ml)		
	120×10 ⁶	60×10 ⁶	20×10 ⁶
LDL 8%	53,0 ± 4,6 ^a	41,8 ± 8,8 ^a	29,3 ± 7,4 ^a
Triladyl [®]	46,4 ± 4,5 ^b	32,6 ± 6,3 ^b	17,1 ± 5,7 ^b
Bioxcell [®]	45,8 ± 7,8 ^b	33,3 ± 12,3 ^b	18,2 ± 6,3 ^b

Letras diferentes en las columnas indican diferencia estadística entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Refrigeración del semen fresco diluido con LDL 8% como alternativa para la IA, cuando no es posible congelar el semen de toros reproductores de alto valor genético

Por último, un tercer trabajo evaluó la capacidad de conservación del semen refrigerado a 4°C en un diluyente preparado con LDL al 8%, según el protocolo de Moussa *et al.* (2002); el uso de LDL en sustitución de la yema de huevo elimina el riesgo de contaminación bacteriana y permite además la mejor visualización de los espermatozoides al microscopio. Una parte del semen se refrigera con glicerol y otra parte sin glicerol para evaluar la toxicidad de este durante la refrigeración, para lo cual utiliza un diluyente control preparado a base de yema de huevo. En este experimento se utilizaron 12 eyaculados provenientes de 3 toros Holstein recolectado con vagina artificial; cada eyaculado se separó en 8 fracciones, 4 fracciones para diluir el semen en un diluyente a base de yema de huevo sin glicerol (tris-yema) y con glicerol (tris-yema-glicerol) a dos concentraciones diferentes 80×10⁶ y 240×10⁶ espermios/ml y 4 fracciones para el diluyente LDL 8%, con y sin glicerol y a dos concentraciones diferentes, 80×10⁶ y 240×10⁶ espermios/ml. Los cambios fueron estimados mediante la evaluación diaria de la movilidad espermática durante 8 días y la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma del espermatozoide; además, se evaluó la toxicidad del glicerol en ambos diluyentes, el control fue el diluyente con yema de huevo. La movilidad espermática fue determinada mediante análisis computarizado (Hamilton Thorne). El porcentaje de integridad de la membrana espermática se obtuvo usando el test hipo-osmótico y la integridad del acrosoma fue puesta en evidencia mediante la técnica de fluorescencia con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC).

Los resultados obtenidos demuestran que las LDL fueron más eficientes que el diluyente Tris-yema de huevo con y sin glicerol para conservar la movilidad espermática durante 8 días a 4°C, así como también la integridad de la membrana y del acroso-

ma. Este hallazgo es de gran relevancia para la conservación del semen bovino refrigerado al menos durante una semana.

CONCLUSIONES

El diluyente LDL al 8% puede utilizarse como crioprotector del semen bovino, sin alterar su fertilidad después de la descongelación. Es un diluyente transparente sin grumos, lo que facilita el examen del semen al microscopio después de la descongelación. Las LDL pueden también utilizarse para la conservación del semen refrigerado a 4°C, en los medios donde no se dispone de nitrógeno líquido o en los toros de alto valor genético cuyo semen no soporta la congelación a -196°C. El diluyente presenta la ventaja de conservar mejor la movilidad de los espermatozoides en las dosis de IA con baja concentración espermática, lo que permite aumentar el número de dosis de inseminación preparadas a partir de un solo eyaculado. De ahí su interés económico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Muñoz O, Pineau S, Thorin C, Destrumelle S, Desherces S, Antón M, Jouan M, Schmitt E, Tainturier D. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Anim Reprod Sci* 122: 282-287.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Muñoz O, Tainturier D. 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci* 119: 305-313.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70: 708-717.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-le G, Guérin B, Camus A, Lechat M. 1998. Comparison of bacterial qualities of various egg yolk sources and the in vitro fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.
- Foulkes JA. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 49: 277-284.
- Graham JK, Foote RH. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiol* 24:42-52.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on freeze-thaw bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.
- Nau F, Anton M, Nys Y. 2003. L'oeuf de poule: une mine de molécules a activités biologiques. *Cinquièmes Journ Rech Avic* 8: 20-22.
- Pace MM, Graham EF. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39:1144-1149.

Parks JE. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK (eds) *Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press, 229-261.

Polge C. 1980. Freezing of spermatozoa. In, Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds) *Low Temperature preservation in Medicine and Biology*. Tunbridge Wells, Kent. Pitman Medical, 45-64.

Purdy PH, Graham JK. 2004. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction and fertility. *Biol Reprod* 71:522-527.

Quinn PJ, Chow PYW. 1980. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 60:403-407.

van Wagtendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LM, den Daas JH. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54:57-67.

Vera-Muñoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Shmitt E, Thorin C, Tainturier D. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4°C. *Asian J Androl* 13:281-286.

Vera-Muñoz O, Amirat-Briand L, Diaz T, Vasquez L, Schmidt E. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Tri-ladyl and Bioxcel. *Theriogenology* 71:895-900.