



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

**Determinación mediante pruebas *in vitro* de la calidad de
semen bovino criopreservado y su relación con el
índice de dispersión del ADN**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

FÁTIMA BETSABÉ GONZÁLEZ SILVESTRY.

TUTOR: DR. SALVADOR ROMO GARCÍA.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

COMITÉ TUTORAL:

DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA. UNIDAD IZTAPALAPA

DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS.

A **Dios** quien me ha acompañado e iluminado durante toda mi vida.

A mis hijos, Santiago y Emilio a quienes amo inmensamente, para que algún día estén orgullosos de mí y tengan las bases necesarias para salir adelante.

A mis padres, a quienes quiero mucho, y me han motivado a que cada día continúe adelante y que me enseñaron el valor de la perseverancia. Que este logro los colme de alegrías y satisfacciones.

A mis hermanas Neri, Aleyda y Amapola, quienes me han servido de estímulo.

A mi esposo Antonio, por hacerme mas fuerte cada día.

A mi abuelita, de quien estoy tan orgullosa y ha sido siempre el mayor ejemplo de vida, fuerza, amor y dedicación.

A mis familiares, por sus buenos consejos y todo el apoyo prestado.

Al Dr. Salvador Romo, por brindarme todo su apoyo incondicional, su tiempo y dedicación en todo momento, para el desarrollo de este trabajo de investigación y por ser uno de los mejores asesores y amigos.

A mis amigos, Isela, Alma, Horacio, Yolo, Lupita y July, por compartir esta experiencia juntos y gracias por estar conmigo a lo largo de éste camino, por su amistad y apoyo, y aunque no estemos cerca, siempre los llevo en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS.

A la UNAM por permitirme realizar mis sueños en la Máxima Casa de Estudios.

A Conacyt por el apoyo económico brindado para la realización de este estudio.

A mis tutores, Dr. Salvador Romo, Dra. Irma Jiménez y Dr. Héctor Sumano porque con sus conocimientos, sugerencias y recomendaciones contribuyeron al enriquecimiento y fortalecimiento de este trabajo de investigación.

A Minitube de México, a la Dra. Mónica Rodríguez y al Dr. Roberto Gutiérrez, por el préstamo del equipo, asesoría y apoyo técnico en la utilización del Sistema CASA.

A los Drs. Wilhem Remberg y Eduardo Camors del Centro de Procesamiento de Semen RECA, Querétaro, México, por proveernos algunas de las dosis de semen utilizadas en éste estudio.

Al Sr. Antonio Toledo Corro y al Dr. Fernando Aguilar, por permitirme realizar una estancia en el Centro de Biotecnología Ganadera "BIOGA Las Cabras", en la Cruz de Elota, Sinaloa, por el uso de su laboratorio, del equipo CASA y por su apoyo incondicional para realizar la parte práctica de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Juárez del Laboratorio de Histología y Morfología de la FMVZ de la UNAM y a la M. en C. Mayeli Nieves, por ayudar a la realización de algunas técnicas de evaluación de semen.

Al Dr. Jaime Gosálvez, de la Universidad Autónoma de Madrid, por su asesoría en la evaluación de la Fragmentación del ADN espermático.

A la Dra. Adelfa de Carmen García Contreras, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por su apoyo en la realización de esta tesis.

A la MVZ. Juliana Parra y MVZ Alondra Martínez, por su apoyo.

Al M. en C. Horacio Álvarez por sus aportaciones.

Al Dr. Remigio Espinosa, de Reproducción Animal, por su asesoría, comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A los miembros del jurado Miguel A. Pérez Razo, A. Enrique Esperón Sumano, José Cortés Zorrilla y la Dra. Adelfa de Carmen García Contreras, por su apoyo, comentarios y aportaciones para la culminación de este trabajo de tesis.

RESUMEN.

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad postdescongelación de semen bovino por medio de técnicas convencionales y avanzadas, correlacionándolas con el Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN Espermático (DFI). Las variables evaluadas mediante técnicas convencionales fueron: Viabilidad y Morfología espermáticas utilizando Eosina-Nigrosina (E-N); Concentración espermática [Spz] e Integridad acrosomal con Rosa de Bengala y Glutaraldehído Salino Bufferado (GLSB). Con las técnicas avanzadas se evaluaron: Motilidad, Morfología y [Spz] con el Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA); Integridad de la membrana plasmática mediante el Test Hiposmótico (HOST) y la Reacción Acrosomal con la tinción Azul Brillante de Coomassie (BBC). También se realizaron pruebas de motilidad inicial progresiva (MIP), motilidad inicial total (MIT) y motilidad inicial subjetiva (MIS). Además se evaluó la integridad de la membrana plasmática con pruebas de termoresistencia: motilidad progresiva 2 h postdescongelación (M2P) y motilidad total 2 h postdescongelación, ambas con CASA (M2T), y motilidad subjetiva 2 h postdescongelación por microscopía óptica (M2S). Se encontró correlación entre MIS y MIT ($r=0.679$; $p<0.001$), así como entre MIS y MIP ($r=0.465$; $p<0.001$). No se encontró correlación entre la morfología evaluada mediante E-N y CASA ($p>0.05$), ni entre GLSB y BBC ($p>0.05$). La correlación existente entre las variables M2P, M2T y M2S con respecto a HOST fue significativa (M2P, $r=0.668$; $p<0.01$; M2T, $r=0.645$; $p<0.05$; M2S, $r=0.587$; $p<0.05$). No se encontró correlación entre E-N y HOST ($p>0.05$). Entre termoresistencia y E-N la correlación fue $r=0.578$ ($p<0.05$). La concentración espermática obtenida por medio de la cámara de Neubauer [Spz-N] y CASA no mostró correlación ($p>0.05$). El DFI promedio fue de 5.8% y no mostró correlación ($p>0.05$) con las variables estudiadas. Los resultados obtenidos en esta investigación ayudan a conocer las diferencias entre técnicas y a seleccionar las más idóneas para evaluar el semen bovino congelado con una mayor eficiencia, eliminando subjetividad. La evaluación del DFI es un método simple, rápido y altamente reproducible para el análisis de la fragmentación de ADN espermático. En resumen, ninguno de los métodos de análisis rutinarios de la calidad de semen bovino evaluados en este estudio se correlacionó con el DFI de las muestras analizadas. Por lo tanto se concluye que es importante incluir la prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) para su uso rutinario en laboratorios de reproducción asistida y de procesamiento y evaluación de semen para determinar la integridad del ADN espermático antes de iniciar programas de reproducción con semen bovino criopreservado. Esta propuesta contribuirá a elevar los porcentajes de fertilidad al utilizar semen congelado bovino en programas de IA en México y a favorecer el uso de semen congelado con mayor calidad, contribuyendo a mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de la ganadería nacional.

Palabras clave: semen, espermatozoide, criopreservado, evaluación, calidad.

ABSTRACT.

The objective of this study was to evaluate the post-thaw quality of bovine semen with the use of conventional and advanced techniques, and their correlation with the Dispersion Fragmentation of Sperm DNA Index (DFI). The variables evaluated by conventional and advanced techniques were: Sperm Viability and Morphology using Eosin-Nigrosin (E-N); Sperm Concentration [Spz] and acrosome integrity with Bengal Rose and Buffered Saline Glutaraldehyde (GLSB). Advanced techniques were used to evaluate: Motility, Morphology and [Spz] using a Computer Assisted Semen Analysis (CASA); Plasma membrane integrity with the Hypotonic Test (HOST) and Acrosomal reaction with Brilliant Blue Coomassie (BBC). Also, tests for initial progressive motility (MIP), total progressive motility (MIT) and subjective progressive motility (MIS) were performed. The integrity of the plasma membrane was evaluated with termoresistance tests: progressive motility 2 h post-thaw (M2P) total motility 2 h post-thaw, both with CASA (M2T), and subjective motility 2 h post-thaw by optical microscopy (M2S). A correlation was found between MIS and MIT ($r=0.679$; $p<0.001$), as well as between MIS and MIP ($r=0.465$; $p<0.001$). No correlation was found between morphology findings evaluated by E-N and CASA ($p>0.05$), nor between GLSB and BBC ($p>0.05$). The existing correlation between variables M2P, M2T and M2S in relation to HOST was significant (M2P, $r=0.668$; $p<0.01$; M2T, $r=0.645$; $p<0.05$; M2S, $r=0.587$; $p<0.05$). No correlation was found between E-N and HOST ($p>0.05$). Between termoresistance and E-N the correlation was $r=0.578$ ($p<0.05$). The sperm concentration obtained with the Neubauer chamber [Spz-N] and CASA did not show a correlation ($p>0.05$). The average DFI was 5.8% and did not show correlation ($p>0.05$) with any of the studied variables. The results obtained in this research help understand the differences among techniques and to select the ideal ones to evaluate frozen bovine semen with higher efficiency and eliminating subjectivity. The evaluation of DFI is a simple, quick and highly reproducible method for the analysis of the fragmentation of sperm DNA. In summary, neither one of the routine analysis methods for bovine semen quality evaluated in this study was correlated with the DFI of the analyzed samples. Therefore it is concluded that it is important to include the Sperm Dispersion Chromatin test (SCD) for routine use in assisted reproduction and semen evaluation laboratories to determine sperm DNA integrity before starting reproduction programs using bovine cryopreserved semen. This proposal will contribute to increase fertility rates when using bovine frozen semen in AI programs in Mexico and to favor the use of frozen higher quality semen, contributing to improve the productive and reproductive efficiency in the national cattle industry.

Key words: semen, spermatozoa, cryopreserved, evaluation, quality.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. HIPÓTESIS.....	5
IV. OBJETIVOS.....	5
IV.1 Objetivo General	5
IV.2 Objetivos Específicos.	5
V. ANTECEDENTES.....	7
VI. ASPECTOS GENERALES.....	7
VI.1 Factores que determinan la respuesta a la IA.	10
VI.2 Problemática actual de los centros de procesamiento de semen.	12
VII. EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE.	15
VII.1 Alteraciones en las membranas celulares.	17
VII.2 Modificaciones del medio interno.	18
VII.3 Efectos sobre el citoesqueleto.	18
VII.4 Efectos sobre la motilidad	19
VII.5 Efectos sobre el núcleo.	20
VII.6 Criocapacitación.	20
VIII. ANÁLISIS DEL SEMEN BOVINO POSTDESCONGELACIÓN	21
VIII.1 Motilidad.	23
VIII.2 Concentración.	27
VIII.3 Viabilidad.	30

VIII.4	Estado del acrosoma.	32
VIII.5	Pruebas de funcionalidad espermática.	33
VIII.6	Morfología.	35
VIII.6.1	<i>Anormalidades primarias.</i>	36
VIII.6.2	Anormalidades en el segmento intermedio.	37
VIII.6.3	Anormalidades secundarias.	38
VIII.6.4	Otras inclusiones poco frecuentes	38
VIII.7	Integridad del ADN	39
VIII.7.1	<i>Porcentajes de gestación y de partos en relación con el índice de fragmentación del ADN.</i>	42
IX.	MATERIAL Y MÉTODOS.	44
IX.1	Muestras utilizadas.	44
IX.2	Análisis básico de semen (espermograma básico).	44
IX.2.1	<i>Motilidad espermática subjetiva.</i>	44
IX.2.2	<i>Motilidad y morfología espermática mediante el sistema CASA.</i>	44
IX.2.3	Porcentaje de vivos y muertos y morfología mediante la Tinción de Eosina-Nigrosina.	45
IX.2.4	Tinción de espermatozoides con Rosa de Bengala y fijación con Glutaldehido Salino Bufferado para determinar integridad acrosomal.	46
IX.2.5	Concentración Espermática.	46
IX.3	Técnicas no convencionales.	47
IX.3.1	<i>Integridad de la membrana espermática.</i>	47
IX.3.2	<i>Termorresistencia.</i>	47
IX.3.3	<i>Prueba o Test Hiposmótico.</i>	47

IX.3.4	<i>Integridad de la membrana acrosomal.</i>	48
IX.3.5	<i>Indice de fragmentación del (ADN).</i>	48
IX.4	Análisis estadístico.	49
X.	RESULTADOS.....	50
XI.	DISCUSIÓN.....	57
XII.	CONCLUSIONES.....	64
XIII.	REFERENCIAS.....	66

I. INTRODUCCIÓN.

La criopreservación espermática (CP) es una biotecnología de gran trascendencia, y tiene un papel relevante en la conservación y difusión de los recursos genéticos.

La evaluación de semen es considerada como una práctica altamente recomendable previa a la Inseminación Artificial (IA), dado que posibilita detectar la calidad del semen contenido en la pajilla (o ampollita), independientemente de su procedencia (Cabodevila *et al.*, 2005).

Si bien no existe ningún examen *in vitro* altamente correlacionado con la fertilidad, hay diversas pruebas de laboratorio que permiten estimar la calidad seminal, muy útiles cuando son realizadas correctamente e interpretadas con criterio (Catena y Cabodevila, 1999).

En las técnicas de reproducción asistida, el uso de semen congelado para su aplicación en la IA, es actualmente una práctica habitual que ha sido adoptada de manera rutinaria en la mayoría de explotaciones ganaderas a nivel mundial (Cruz *et al.*, 2006; Muiño *et al.*, 2008).

Aunque es posible criopreservar semen y obtener crías a partir de la IA, la supervivencia de los espermatozoides después de la CP es muy limitada y requiere perfeccionamientos adicionales en la mayoría de las especies (Pérez, 2008), para mejorar los porcentajes de preñez.

La estimación de la calidad seminal, con el objetivo de evaluar la fertilidad de un macho en particular, o la evaluación de métodos de conservación de semen, requieren la contrastación de la viabilidad, parámetros de motilidad espermática, morfología celular y el grado de integridad celular (especialmente del acrosoma), así como de distintos componentes del plasma seminal (Pérez, 2008).

El desarrollo de pruebas de laboratorio que puedan anticipar de forma precisa el poder fecundante del semen en las diversas especies domésticas,

representa un gran reto para los investigadores dedicados a la IA (Uwland, 1984; Parks y Graham, 1992; Hafez, 2000). Dentro de las pruebas que se efectúan de forma rutinaria en las especies domésticas, las más habituales han sido: la determinación del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de movimiento, grado de anormalidades existentes, determinación de la integridad del acrosoma ya sea por microscopía de contraste de fases o mediante técnicas de tinción, y la valoración del estado de la membrana celular por medio del test de endósmosis celular. La evaluación de los parámetros seminales clásicos es fundamental, ya que proporciona criterios sobre el destino de las dosis, su forma óptima de conservación así como su posible vía de aplicación.

La mayor parte de los trabajos realizados sobre evaluación de fertilidad se han dirigido a estudiar características seminales clásicas, tales como concentración y la motilidad espermática, para establecer su relación con la fertilidad. Sin embargo, en la práctica se ha comprobado que eyaculados con valores semejantes de los parámetros citados, presentan importantes variaciones en la fertilidad individual. Estas variaciones pueden ser debidas, entre otras causas, a un mal funcionamiento de alguno o algunos de los distintos órganos que integran el aparato reproductor masculino y que aportan fluidos en el proceso eyaculatorio, dando lugar a alteraciones cualitativas y/o cuantitativas de las secreciones que constituyen el plasma seminal (Marigorta y Pérez, 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las muestras de semen criopreservado que se utilizan en programas de IA son evaluadas por parámetros obtenidos a través de un espermiograma convencional: se mide la concentración espermática con un hemocitómetro, la morfología espermática con una tinción de Eosina-Nigrosina y la motilidad progresiva en forma subjetiva por medio de microscopía de campo claro. Aun así, se estima que aproximadamente un 10 o 15% de los machos que presentan parámetros dentro de rangos normales no aportan una información completa sobre el potencial fertilizante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y una gestación que llegue a término. En estos casos el origen de la esterilidad masculina podría deberse, entre otras causas, a defectos en la membrana del espermatozoide, factores ambientales o genéticos y por tanto no detectables en el espermiograma (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Se ha considerado que el daño del ADN espermático es causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida, donde no es posible realizar una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño en el ADN (Góngora y Fontanilla, 2010). La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de CP. Un estudio exhaustivo del semen congelado requiere determinar algunos otros parámetros para determinar la capacidad del espermatozoide para fertilizar y desarrollar un embrión de buena calidad que pueda llegar al término de la gestación. Entre los inconvenientes de las técnicas clásicas utilizadas para evaluar la calidad seminal se puede citar, la subjetividad de las mismas, puesto que los resultados dependen en gran parte de la experiencia y habilidad del técnico, y además el número de células analizadas en cada muestra suele ser pequeño y por tanto no representativo de la población espermática. Por otra

parte, la mayoría de las tinciones para microscopía óptica empleadas tradicionalmente para la evaluación espermática, requieren el uso de fijadores, como Formaldehído y Glutaraldehído, que suelen interferir con los diluyentes utilizados para la congelación, dificultando el análisis. Por lo tanto éstas técnicas no son recomendables para la evaluación de semen criopreservado (Muiño *et al.*, 2005). Por lo anterior, se justifica evaluar la calidad de semen bovino criopreservado con técnicas aplicables a nivel de campo y con técnicas modernas de laboratorio, y correlacionarlas con la dispersión que muestra el ADN fragmentado a través de la obtención del Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN Espermático (DFI) (López-Fernández *et al.*, 2007), para lograr una evaluación óptima de muestras de semen congelado y en su caso proponer el uso de pruebas de mayor confiabilidad para ser utilizadas en nuestro país a fin de proponer el uso de las técnicas disponibles para la óptima evaluación seminal. Esto en consecuencia favorecería el uso de semen congelado con mayor calidad, lo que a su vez contribuiría a mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de la ganadería nacional.

III. HIPÓTESIS.

Las pruebas para la evaluación del semen de bovino criopreservado mediante técnicas convencionales y avanzadas están relacionadas con el índice de fragmentación de ADN espermático.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo General

Determinar mediante pruebas in vitro la calidad de semen bovino criopreservado y su relación con el índice de fragmentación del ADN espermático.

VI.2 Objetivos Específicos.

Evaluar pajillas de semen bovino congelado-descongelado, provenientes de diferentes fuentes y animales al azar, utilizando técnicas de tipo tradicionales y subjetivas, y otras de mayor precisión y objetividad.

Determinar la motilidad de espermatozoides descongelados, mediante microscopía óptica como técnica convencional y de campo, y por medio del Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA).

Evaluar la morfología espermática mediante la tinción Eosina-Nigrosina (E-N), que comúnmente se utiliza como técnica de campo, y por medio de CASA como técnica de laboratorio.

Evaluar la integridad del acrosoma espermático mediante la fijación con Glutaraldehído Salino Bufferado (GLSB) y microscopía de contraste de fases, y por la tinción Azul Brillante de Coomassie (BBC).

Evaluar la integridad de la membrana plasmática mediante el Test Hiposmótico (HOST) y comparar resultados con las técnicas de termoresistencia y viabilidad por medio de E-N.

Medir el Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN Espermático (DFI) del espermatozoide mediante la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD).

Determinar si el DFI presenta una correlación con los resultados de motilidad, viabilidad, morfología, estado del acrosoma e integridad de la membrana plasmática.

V. ANTECEDENTES.

La disminución de la fertilidad en los machos tiene un impacto económico negativo en la producción de leche y carne en el ganado bovino (Sánchez, 2000).

La IA ha tenido un papel central en el mejoramiento genético del ganado. El uso generalizado de esta técnica y el logro de su completo potencial requiere de la preservación del semen por largos periodos (Espinosa, 1991).

La IA ya había sido utilizada por los árabes en el siglo XVI, pero no fue hasta 1779 cuando Lázaro Spallanzani, un fisiólogo italiano experimentó con semen de perro y consiguió preñar una perra, infundiéndole semen fresco directamente en el útero (citado por Sorensen, 1982; Hafez, 2000). Sin embargo, en Rusia se inició la difusión masiva de la IA; en 1949 existían en ese país 4,638 centros de IA, y se inseminaron 825,000 vacas y 15 millones de ovejas (Sánchez, 2000).

Los primeros becerros de semen bovino congelado nacieron en Inglaterra en 1951 y en Estados Unidos dos años después (Sánchez, 2000).

En México la IA se lleva a cabo en mayor escala a mediados de los años 60 por el Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Ganadería (Espinosa, 1991). En el 2000 se estimó que solo se inseminó el 4.3% de las vacas en México (Sánchez, 2000).

VI. ASPECTOS GENERALES.

El semen congelado es aquel que una vez diluido puede almacenarse por tiempo indeterminado a temperaturas de congelación y constituye un medio muy eficiente de conservación de semen. Este semen se conserva a temperaturas muy bajas, en la actualidad el medio más común de

almacenamiento es Nitrógeno Líquido el cual tiene una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sorensen, 1982).

En algunas especies domésticas como en los bovinos el uso de la técnica de IA se ha extendido desde que se comenzó a utilizar en el año 1951, dependiendo casi exclusivamente de semen congelado, lo que ha hecho posible utilizar intensamente y difundir el potencial genético de sementales superiores a un costo razonable (Salisbury *et al.*, 1978).

En cualquier caso, la CP, cuyo propósito es garantizar la supervivencia del semen, causa daños irreversibles en la membrana plasmática. Esto conlleva a la muerte de un gran número de espermatozoides o, en los supervivientes, cambios similares a los observados durante la capacitación espermática, que provocan un acortamiento de su período de vida útil. Incluso con las mejores técnicas disponibles para la CP, la supervivencia postdescongelado de la población de espermatozoides es aproximadamente del 50%. Por otra parte la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es importante para una exitosa CP, y es bien sabido que ocurren cambios bioquímicos y estructurales en la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelado y descongelado (Barth, 1989).

La morfología y la motilidad espermáticas, el número de espermatozoides por inseminación, el porcentaje de reacción acrosomal y la fertilización *in vitro* (FIV) han sido ampliamente evaluados como indicadores de la habilidad del espermatozoide para fertilizar un óvulo (Moura, 2005).

Existen grandes diferencias entre sementales tanto en la fertilidad máxima alcanzada, como en el número de espermatozoides necesarios para obtenerla, respondiendo cada macho a una curva de fertilidad diferente, que puede variar a lo largo de la vida del animal. Por tanto, los parámetros que determinan la calidad o fertilidad potencial de una dosis seminal, pueden ser de dos tipos según Marigorta y Pérez (2008):

1. Caracteres compensables: son aquellos en los que la elevación del número de espermatozoides presentes en la dosis seminal, proporciona una mejora en los resultados de fertilidad obtenidos tras la aplicación de la misma. Estos caracteres se relacionan con la capacidad del espermatozoide de alcanzar y penetrar al ovocito después de la IA, como por ejemplo la movilidad, integridad de membrana, viabilidad, e integridad acrosomal.

2. Caracteres no compensables: son aquellos en los que las diferencias de fertilidad entre machos no pueden reducirse aumentando el número de espermatozoides en la dosis seminal. Estos caracteres están relacionados con la contribución paterna al desarrollo del embrión, como las características ligadas al ADN o ciertas morfoanomalías espermáticas hereditarias (grado de condensación de la cromatina, defectos de cromatina, anomalías de cabeza).

Al efectuar la evaluación, ambos tipos de caracteres deberán ser examinados de forma independiente.

La fertilidad del semen es un mecanismo complejo que depende de las propiedades espermáticas de movimiento, reconocimiento celular, fusión de membranas, entre otras. Por ello, para poder evaluar todas estas propiedades, es necesaria la integración de varias pruebas de laboratorio. Actualmente se emplean múltiples métodos de laboratorio para evaluar la calidad seminal, lo cual indica que no existe ningún método universal que pueda predecir la fertilidad de las dosis, y el éxito de la IA es el único método definitivamente válido para evaluar la calidad de las pajillas de semen que se utilizan (Barth, 1989).

En el momento de aplicar una dosis seminal, el número de espermatozoides que alcanzan el oviducto es muy inferior al número inicialmente depositado. Además, la población espermática que alcanza el oviducto está enriquecida tanto desde el punto de vista de normalidad espermática, como de movilidad. La zona pelúcida constituye una barrera o filtro adicional, ya que impide el paso de espermatozoides con anomalías. Una consecuencia directa de este

proceso de selección, es que en aquellos eyaculados de peor calidad, la selección será más intensa por lo que es necesario emplear un mayor número de espermatozoides en la dosis seminal para así alcanzar un número mínimo de espermatozoides competentes en el lugar de fertilización. En aquellos sementales con espermatozoides capaces de alcanzar el ovocito e iniciar el proceso de fertilización y desarrollo embrionario, pero incapaces de mantener estos procesos, sería inútil incrementar la fertilidad aumentando el número de espermatozoides por dosis seminal (Marigorta y Pérez, 2008).

VI.1 Factores que determinan la respuesta a la IA.

El método de IA permite utilizar los mejores toros a un precio que de otra forma resultaría muy costoso (es más económico el costo de dosis de semen y la mano de obra necesarias para la IA, que tener un macho de monta libre y mantenerlo) además de que el uso de sementales sobresalientes ofrece la oportunidad de mejorar genéticamente los animales del hato y también constituye una forma de prevenir algunas enfermedades reproductivas en las que los toros se consideran vectores tales como Brucelosis, Leptospirosis y Tricomoniasis, entre otras (Hafez, 2000; Galina y Valencia, 2006).

El resultado de la IA es la consecuencia de una serie de eventos concatenados. Cuando se inseminan hembras fértiles, con una condición corporal adecuada, el programa de IA resultará exitoso si se cuenta con un sistema de detección de celos eficiente, si se utiliza semen de buena calidad y si la técnica la ejecutan inseminadores experimentados (Catena y Cabodevilla, 1999).

La compañía American Breeders Service elaboró una “ecuación de reproducción”, en ésta ecuación se muestra el efecto de las variables sobre el porcentaje de becerros producidos (Cuadro 1). Este cuadro nos muestra diferentes factores que tenemos que tomar en cuenta al iniciar un programa de IA y hacerlo mas eficiente.

Factor A. *Porcentaje detectado e inseminado del hato*. Este es influido por el porcentaje de vacas en celo, las condiciones de nutrición del hato y la capacidad de detección de los vaqueros.

Factor B. *Fertilidad porcentual del hato*. Debe determinarse a partir del historial reproductivo del hato de vacas.

Factor C. *Fertilidad porcentual del lote de semen*. Depende en gran parte del origen del semen y de la capacidad del productor de mantener una alta calidad.

Factor D. *Eficiencia del técnico inseminador en porcentaje*. Se determina con base en las experiencias y resultados previos.

Tabla 1. Porcentaje de becerros producidos por IA, durante un ciclo estral.

Factor	A	B	C	D	% de becerros producidos por IA.				
Afectado por	✓% de ocurrencia de celo. % de vacas en celo detectadas. Descanso sexual después del parto. Nutrición adecuada.	Eficiencia del manejo del hato Intervalo de descanso sexual después del parto	Calidad en el procesamiento de semen.	Eficiencia del técnico inseminador					
Casos	A	X	B	X	C	X	D	=	%
1	Situación Ideal								
	95	x	90	x	95	x	100	=	81.2
2	Buen porcentaje del hato inseminado (85 %), otros factores ideales.								
	85	x	90	x	95	x	100	=	72.7

.... Continuacion Tabla 1.

3	Bajo porcentaje del hato inseminado (60%), baja fertilidad en el hato 10%, otros factores ideales. 60 x 80 x 95 x 100 = 45.6
4	Todos los factores disminuidos 10% 85 x 80 x 85 x 90 = 52.0
5	Porcentaje del hato inseminado y eficiencia del técnico, disminuidos 10%, otros factores ideales. 85 x 90 x 95 x 90 = 65.4
6	Porcentaje regular del hato inseminado (70%); fertilidad del semen disminuido (15%), otros factores ideales. 70 x 90 x 85 x 100 = 53.5
7	Baja fertilidad del semen (50%), Otros factores ideales. 95 x 90 x 50 x 100 = 42.8
8	Poca eficiencia del técnico (60%), otros factores ideales. 95 x 90 x 95 x 60 = 48.7
9	Baja fertilidad del semen (50%); poca eficiencia del técnico (60%); otros factores ideales. 95 x 90 x 50 x 60 = 25.6

Fuente: Sorensen, 1982.

VI.2 Problemática actual de los centros de procesamiento de semen.

En México, a partir de la década de los años 50, la ganadería bovina ha experimentado un fuerte crecimiento. Actualmente ocupa grandes extensiones de tierra, sobre todo, en las áreas tropicales, donde este crecimiento ha sido doble y hasta triple que el resultante de la media nacional.

El inventario ganadero de México en la última década, de acuerdo con estadísticas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), se ha reducido de 32,054,300 cabezas en 1990 a 30,520,432 en el 2000; sin embargo, el decremento en el número de cabezas de ganado bovino durante esta década se ha mantenido constante,

con ligeras variantes en algunos años (SAGAR, 1990, SAGARPA 2000). De acuerdo con la información proporcionada por SAGARPA en el 2012, la producción nacional actual de ganado bovino, confirma que tenemos un inventario nacional de 31 millones de cabezas de ganado bovino total; 2 millones de bovinos leche y 29 millones de bovinos carne (Ley-López, 2012).

Lo más viable para mejorar estos indicadores en el mediano plazo, es a través de la técnica de mejoramiento genético como la IA.

Con el fin de satisfacer la carencia de semen de bovino de alta calidad a nivel nacional, tienen injerencia las compañías dedicadas a la producción y/o importación de semen de toros de excelente potencial genético, ideales para utilizarse en la IA dentro del país (Sánchez, 2000).

La IA en México tuvo su inicio en el año de 1939, cuando se funda el primer Departamento de IA, dependiente de la Dirección de Investigaciones Pecuarias de la Secretaría de Agricultura y Fomento estableciéndose oficialmente en el año de 1942 (Espinoza, 1991). En los años 60 continúa en aumento, de 1976 a 1983 se producen en el centro de colección y congelación de semen de Ajuchitlán 4,501,110 dosis, mientras que la iniciativa privada reporta el uso de 228,252 dosis de semen y en el año 2000 se reporta que se inseminó al 4.3% de las vacas en el país (Sánchez, 2000).

Siendo México un país importador, también en el renglón de la IA se manifiesta con un importante número de dosis de semen bovino que se importan al país, siendo en el año de 1998, 1,171,241 dosis las que se importaron (Sánchez, 2000).

Básicamente la oferta que tiene el ganadero de disponibilidad de dosis de semen para sus programas de IA incluye la de sus propios sementales, así como semen originario de países europeos (Francia, Holanda, Alemania, España, Suiza e Italia) desde 1994 y sobre todo semen de los miembros del Tratado de Libre Comercio de Norteamérica (Estados Unidos y Canadá).

También se importan pequeñas cantidades de Nueva Zelanda y Australia (Sánchez, 2000).

La técnica de IA tiene una baja difusión en el país, si consideramos que la población bovina actual es de cerca de 30 millones. Se concentra el uso de ésta técnica en el ganado especializado principalmente en la producción de leche. No existen todavía cifras actualizadas, pero se estima que entre el 55 y 60% de las vacas lecheras se inseminan actualmente y solo un 3 al 5 % de las vacas de carne (Sánchez, 2000).

El procesamiento de semen bovino en el país es de características muy especiales pues había que aclarar que no todo el semen procesado se aplica, sino más bien se utiliza como un seguro para el propietario de los toros.

La manera de procesamiento de semen bovino en México se lleva a cabo tanto en laboratorios donde únicamente se procesa semen colectado de ranchos lejanos y el Centro de Inseminación en donde se encuentran los toros que se trabajan regularmente según la Norma Oficial Mexicana (NOM-027-ZOO-1995).

Los laboratorios en general se mantienen dentro de un radio de acción determinado, haciendo colección a distancias considerables. Se procesa semen de sementales cuyos dueños los mantienen sin pruebas de progenie sino únicamente por méritos individuales (NOM-027-ZOO-1995).

En México el procesamiento de semen se lleva a cabo con una gran diversidad de recursos técnicos, ya que existen laboratorios bien equipados con el material necesario para un buen proceso, pero existen también laboratorios con equipo básico que no resulta apropiado para un buen proceso y sobre todo que no podrían cumplir con los requisitos para la exportación de semen (Espinosa, 1991).

En cuanto a la disposición de semen nacional, se sabe que en el medio mucho del semen que se maneja es procesado localmente por colegas mexicanos que en un alto porcentaje de los casos no tiene la capacidad técnica para producir un semen de calidad satisfactoria. Por ejemplo, hay dosis de semen en las que

la única información en la pajilla es el número de toro y no se encuentra información referente al número de lote, su raza, la fecha de congelación, no hay indicaciones sobre quien lo procesó. Sin embargo, también es posible encontrar semen congelado de excelente calidad, pero generalmente este proviene de compañías establecidas o registradas.

En una encuesta realizada a varios Centros de Procesamiento de Semen (Espinosa, 1991) se encontró que el 100 % de los laboratorios evaluaban la motilidad, pero únicamente el 50 % de los encuestados evaluaban Morfología y Anormalidades. Es importante señalar que el 85 % de los encuestados conoce la NOM para el procesamiento de semen, pero tan solo el 65 % de los laboratorios encuestados cumple con lo descrito en dicha Norma. Para 1991 (incluir datos actuales), el porcentaje de semen disponible en el país provenía un 74 % de Centros de Procesamiento de Semen e IA y un 25 % de laboratorios o productores independientes (Espinosa, 1991).

En las técnicas de reproducción asistida, el uso de semen congelado-descongelado para su aplicación en la IA, es actualmente una práctica habitual que ha sido adoptada de manera rutinaria en la mayoría de explotaciones ganaderas a nivel mundial (Cruz *et al.*, 2006; Muiño *et al.*, 2008).

VII. EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE.

La IA y la CP del semen han significado una mejora en la cría potencial del ganado bovino. Sin embargo existen diferentes protocolos de congelación de semen y en algunos el resultado es desfavorable ya que se reduce la calidad del semen.

Los métodos de congelación de semen surgen debido a la necesidad que se tiene para poder conservar la viabilidad de los espermatozoides por un tiempo prolongado o indefinido, comodidad en la manipulación del paquete espermático y facilidad de transporte cuyo objetivo contempla el mejoramiento

genético de los hatos en base a la utilización de toros con características genéticas y productivas superiores para ser usados en la IA (Sorensen, 1982).

Sin embargo, aunque se parta de un semen de alta calidad, la viabilidad de los espermatozoides puede verse afectada durante la distribución y el almacenamiento, si en estas etapas no se realiza un cuidadoso manejo del producto y de su procesamiento (Baracaldo *et al.*, 2007).

La CP produce una serie de efectos sobre la funcionalidad y la estructura espermática, algunos de los cuales se describen a continuación: El llamado choque frío que se presenta durante el periodo de enfriamiento hasta llegar a la temperatura de congelación del semen, se da cuando se presenta el descenso térmico de los 30 a los 0 °C. Se ha observado que durante éste proceso se producen alteraciones en las superficies de los espermatozoides, hay pérdida irreversible de la motilidad, de la actividad metabólica y de la capacidad de fecundación (Hamamah *et al.*, 1990, Contri *et al.*, 2010). Se ha postulado que el choque frío está relacionado con los cambios en la transición de fase de los lípidos de la membrana y con una alteración del estado funcional de la misma. Es por ello que se recomienda que el descenso de la temperatura se lleve a cabo siguiendo los protocolos cuidadosamente. Sin embargo un enfriado lento también puede inducir un estrés sobre la membrana plasmática del espermatozoide. Tal estrés ocurre por debajo de los 0 °C. Otra zona crítica que se presenta durante el proceso de congelación se encuentra entre -15 y -25 °C, ya que a esta temperatura es cuando se lleva a cabo la cristalización del agua y con ello la separación de electrolitos y material coloidal. Es decir, al alcanzar estas temperaturas se comienzan a formar cristales intracelulares, logrando que por el fenómeno de la cristalización todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aun no se congela y exponiendo a la célula a éstas altas concentraciones de sales (efecto solución). Durante esta fase, si el tiempo de exposición de las células a las soluciones hipertónicas es demasiado largo, se puede causar un daño a las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide. Aunado a ello, el agua también se difunde hacia el exterior de la célula con la finalidad

de que la concentración de sales se equilibre tanto interna como externamente, sucediendo así la deshidratación celular. Por otra parte si el agua no sale rápidamente se da la formación de cristales intracelulares que pueden dañar mecánicamente a la célula (Palacios, 1994).

Debido a lo antes mencionado, cuando el semen se ha conservado congelado durante un largo periodo de tiempo, al descongelarse se deberá hacer una valoración del mismo para saber si ha sido afectada su viabilidad (Palacios, 1994; Martínez, 2007).

VII.1 Alteraciones en las membranas celulares.

El plasmalema (membrana plasmática) es la estructura espermática que resulta más severamente dañada (Parks y Graham, 1992), aunque la membrana acrosómica externa y las membranas de la mitocondria también se ven afectadas (Watson, 1995).

Se postula que los cambios estructurales afectan principalmente a las membranas, debido a una reordenación de los lípidos de la membrana durante la congelación-descongelación, alterándose así las asociaciones lípido-lípido y lípido-proteínas, necesarias para una función normal de las membranas (Salomon y Maxwell, 1995; Martínez, 2007). Estas alteraciones estructurales provocan pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico, con pérdida de la permeabilidad selectiva del plasmalema y trastornos en el metabolismo aeróbico y glucólisis anaeróbica, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes, como la motilidad. De igual forma se produce pérdida de enzimas responsables de la metabolización de las Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) y la disminución de compuestos antioxidantes (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, taurina e hipotaurina) en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación (Brouwers *et al.*, 2005).

VII.2 Modificaciones del medio interno.

Se producen alteraciones en el balance iónico del sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y del potasio y magnesio, que salen masivamente de la célula (Watson y Plummer, 1985).

Aunque existen grandes diferencias individuales, el incremento de calcio intracelular es muy característico de la especie porcina en comparación con otras especies y se debe a una alteración de la bomba que lo regula (White, 1993), ya que las proteínas de membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de la temperatura (Watson y Plummer, 1985).

Existe, asimismo, una relación directa entre la actividad de diversas enzimas, propias del espermatozoide, y la calidad del semen. Cuando la célula espermática se daña, sus membranas se inactivan o se destruyen y enzimas intracelulares, como aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa, aumentan su concentración en el medio extracelular. La liberación de estas enzimas al medio extracelular está relacionada, por tanto, con las lesiones sufridas por los espermatozoides durante los distintos tratamientos a los que es sometido el semen para su conservación. La medida de sus actividades es un indicador de la integridad celular y se puede considerar como un parámetro bioquímico útil para definir la calidad seminal (Pérez, 2008).

VII.3 Efectos sobre el citoesqueleto.

Los daños ocasionados a las células espermáticas se han enfocado principalmente a realizar estudios a nivel de las membranas (Watson, 1995; Noiles *et al.*, 1997; Neild *et al.*, 2003), pero poco se ha estudiado el daño espermático ocasionado por el proceso de CP a nivel de otras estructuras celulares como el citoesqueleto.

Muchas de las proteínas del citoesqueleto ejercen una función estabilizadora del plasmalema (Holt y Van Look, 2004), con un comportamiento de

despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura (Watson, 1995). El glicerol, además, altera a los microtúbulos, lo que repercute indirectamente sobre la membrana. Por otro lado, los rápidos cambios del volumen celular influyen sobre el sostén esquelético de las membranas plasmática y acrosomal, aunque poco se conoce al respecto (Watson, 1995).

En la alteración estructural de la membrana plasmática de la región acrosomal influyen las dimensiones de la cabeza espermática: en el espermatozoide de las especies más vulnerables ésta es alargada y plana, distinta de la más pequeña y convexa de las especies resistentes. El componente citoesquelético estabilizador parece no estar presente en la región anterior de la cabeza, con lo que las consecuencias del enfriamiento serían más graves en las especies con espermatozoides de cabeza plana y alargada (Watson y Plummer, 1985).

VII.4 Efectos sobre la motilidad

La motilidad espermática es un factor crítico para que pueda realizarse la fertilización, puesto que le permite al gameto masculino aproximarse al femenino y le facilita atravesar la zona pelúcida del ovocito para lograr su objetivo (Felipe-Pérez, 2009).

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Tal como han señalado Brouwers *et al.* (2005), la peroxidación lipídica es particularmente intensa en la pieza intermedia, lo que explicaría la disminución

de la movilidad espermática tras la descongelación. Los cambios cualitativos de la movilidad después de la descongelación, presentan similares características a los espermatozoides hiperactivados a consecuencia de la capacitación espermática previa a la fecundación (Schmidt y Kamp, 2004).

VII.5 Efectos sobre el núcleo.

El fenómeno de supercondensación de la cromatina nuclear se ha constatado en espermatozoides criopreservados de verraco (Hamamah *et al.*, 1990), relacionándolo con una alteración de la capacidad fecundante y del desarrollo embrionario. También Martín-Rillo *et al.*, (1999) asocian los trastornos del desarrollo embrionario a alteraciones en la organización de la cromatina nuclear, pues encuentran una mayor proporción de embriones en estadios menos avanzados del desarrollo, y también de embriones degenerados en cerdas inseminadas con semen descongelado, en comparación con otras que fueron inseminadas con semen refrigerado.

En un estudio, Fraser y Strzezek (2007) han descrito un incremento de la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides porcinos después del proceso de congelación-descongelación.

VII.6 Criocapacitación.

La capacitación es el proceso por el cual la membrana plasmática del espermatozoide es alterada por la adición de ciertas proteínas del plasma seminal durante la eyaculación y después son removidas por otras proteínas de los fluidos del tracto reproductor de la hembra durante el transporte del espermatozoide. Es un evento gradual y prerequisite esencial para la fertilización, la cual *in vivo* toma lugar durante la exposición secuencial del espermatozoide a los diferentes compartimentos del tracto genital de la hembra que ocurre durante el transporte espermático. Para alcanzar este estado en el espermatozoide eyaculado deben ser removidas proteínas del plasma seminal que se unieron a la superficie del espermatozoide, particularmente las proteínas de la región acrosomal (Rodríguez-Martínez, 2000, Olivera *et al.*,

2006; Lusignan *et al.*, 2007, *et al.*, 2008; Gadella *et al.*, 2008). La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y por el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol (Yanagimachi, 1994; Visconti, 1998; Breitbart y Naor, 1999; Theiren *et al.*, 2001; Olivera *et al.*, 2006).

Watson (1995) menciona que el enfriado y la congelación del semen, inducen cambios en los espermatozoides que simulan aquellos producidos durante la capacitación y la reacción acrosomal, fenómeno que ha sido llamado criocapacitación o falsa capacitación.

VIII. ANÁLISIS DEL SEMEN BOVINO POSTDESCONGELACIÓN.

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. Un requisito indispensable para el desarrollo de las nuevas técnicas de reproducción asistida es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido CP.

El objetivo de las pruebas de laboratorio desarrolladas *in vitro* es permitir determinar cuantos espermatozoides y qué células espermáticas son funcionalmente competentes para alcanzar el proceso de fertilización con éxito. La relación cuantitativa-cualitativa en los espermatozoides de una dosis seminal es un concepto fundamental en la valoración de la fertilidad de un macho, así, la fertilidad de un macho se incrementa conforme aumenta el número de espermatozoides presentes en la dosis seminal hasta alcanzar un máximo, a partir del cual no hay incrementos de fertilidad y comienzan a actuar los factores limitantes de la hembra (Marigorta y Pérez, 2008).

La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de CP (Muiño *et al.*, 2007).

Muchos investigadores en el área de la reproducción animal están tratando de diseñar el “*análisis seminal ideal*”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. El análisis de semen ideal sería aquél que de forma sencilla y eficaz permitiera predecir la capacidad fecundante de un eyaculado concreto (Hidalgo *et al.*, 2005).

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Hidalgo *et al.*, 2005; Muiño *et al.*, 2005).

Actualmente, el análisis seminal clásico ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, el estudio de la motilidad espermática, la concentración espermática y las anomalías morfológicas que anteriormente se hacían de manera subjetiva, pueden realizarse en la actualidad mediante el uso de métodos computarizados de análisis. La incorporación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide (Hidalgo *et al.*, 2005). Cabe destacar que hasta el momento no se ha conseguido un método de evaluación seminal *in vitro*, que al utilizarlo solo o en combinación con otros sea capaz de predecir de forma segura la capacidad fecundante de una muestra de semen. Sin embargo, debido a que la valoración *in vitro* de la calidad seminal es muy importante en la valoración andrológica de los machos y es, además, el mejor indicador del grado de conservación del semen congelado-descongelado, se llevan a cabo múltiples investigaciones para diseñar técnicas que midan la capacidad fecundante del semen fresco y congelado.

VIII.1 Motilidad.

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Hasta hace pocos años el estudio de la motilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos semicuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática. Estas medidas ofrecen una descripción general de la motilidad espermática, pero la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador. A pesar de ello, la valoración subjetiva de la motilidad hecha por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata, al tiempo que es un método económico y fácil de llevar a cabo. La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación visual de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37 °C (Muiño *et al.*, 2007)

La evaluación microscópica de la motilidad ha sido considerada como el método de observación más utilizado, se realiza con un microscopio de bajo aumento (aproximadamente 200x). Un menor incremento, por ejemplo 100x, permite observar un campo mayor, pero no basta para observar de modo individual a los espermatozoides y solo puede estudiarse su movimiento. Un aumento demasiado grande (450x) restringe mucho el campo visual y exige que el observador mueva con frecuencia su preparación; su ventaja es que permite hacer un estudio más detallado de las células individuales (Sorensen, 1982). Se deberá de conservar el semen en todo momento a una temperatura de 37 °C para efectuar la observación ya que el enfriamiento disminuye la motilidad y el calor la incrementa, de preferencia se utilizará un microscopio con una platina con temperatura controlada (Sorensen, 1982).

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips *et al.*, 2004), y además,

si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford *et al.*, 1976). La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja.

Los nuevos sistemas computarizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. Aunque no existe ningún método que por si mismo sea capaz predecir la capacidad fecundante del semen (Rodríguez-Martínez, 2000), las modernas técnicas automatizadas son fiables, de fácil ejecución y elevada repetibilidad, por lo que permiten estandarizar y objetivar la contrastación espermática (Muiño *et al.*, 2007).

Los primeros intentos de evaluar el movimiento espermático se basaron en exposiciones fotográficas múltiples o video-micrografías. Estos métodos son tediosos, prolongados y costosos, por lo que en la actualidad no son utilizados. Sin embargo, la aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Estos sistemas, denominados genéricamente CASA, han automatizado y simplificado el proceso. El análisis computarizado de la motilidad fue propuesto por primera vez hace 25 años y es usado actualmente en centros de investigación en andrología y centros de reproducción asistida (Muiño *et al.*, 2005). El CASA establece, de una manera efectiva, medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Contri *et al.*, 2010). Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado

funcional del axonema y de las membranas espermáticas. Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así resultados numéricos precisos. Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad de movimiento sobre la base de varios descriptores, la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que efectúa. Actualmente, también existen en el mercado varios tipos de CASA que capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto en tiempo real, como de manera diferida, aportando un gran volumen de información (Muiño *et al.*, 2005).

El uso de los sistemas CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual y ello permite identificar la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis *et al.*, 1995; Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999), lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que, un eyaculado está constituido por una población heterogénea de espermatozoides.

Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers *et al.*, 1989; Farrell *et al.*, 1995). Algunos de los parámetros más utilizados por los diversos autores son los siguientes:

-Porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos (Muiño *et al.*, 2005).

-Parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides (Mortimer, 1997):

-VCL (Velocidad Curvilínea): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.

-VSL (Velocidad rectilínea): distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.

-VAP (Velocidad Media): distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

-LIN (Índice de Linealidad): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea.

$$\text{LIN: } (VSL / VCL) \times 100$$

-STR (Índice de Rectitud): es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal.

$$\text{STR: } (VSL / VAP) \times 100$$

-WOB (Índice de Oscilación): es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea.

$$\text{WOB: } (VAP / VCL) \times 100$$

Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

-ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza): es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

-BCF (Frecuencia de batido): es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células

móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989).

VIII.2 Concentración.

Existe una alta correlación significativa entre el número de espermatozoides inseminados y la fertilidad del toro, siempre y cuando sus características sean normales, esto incrementa la posibilidad de fertilización; aunque en este tema difieren varios autores; Sorensen (1982) menciona que la relación entre la concentración y la fertilización es baja, es un hecho que cuando se presenta azoospermia en el eyaculado el toro es estéril; con oligospermia (conteo celular bajo) el animal es de dudosa fertilidad y en otras donde se observe buena concentración, la fertilidad deberá ser elevada. Entonces, este aspecto es crucial evaluarlo cuando un toro presente un eyaculado de baja (oligospermia) o nula (azoospermia) concentración espermática, o en los casos en que se utiliza semen descongelado, que ha sido diluido y sometido a estrés durante el proceso de congelación-descongelación, provocando un daño irreversible en un porcentaje elevado de espermatozoides; en este caso es crucial eliminar las pajillas con estas características (Hafez, 2000).

La fertilidad de un toro usado como semental reproductor, entre otras razones, dependerá básicamente del número de espermatozoides normales que se utilicen al inseminar. Existe una variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, y de un toro a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar o bien el número de pajillas a congelar (Hidalgo *et al.*, 2005).

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de la muestra de semen y dependerá de la cantidad de muestras a evaluar para decidir que método es el que se deberá elegir. Entre los métodos utilizados cuando la cantidad de muestras no es muy grande se encuentran el uso de cámara de recuento celular, como las de Bürker, Makler, Neubauer (Hemocitómeto) o Leja. La espectrofotometría, la citometría de flujo y los CASA son métodos

modernos que se utilizan cuando se evalúa una cantidad elevada de muestras (Contri *et al.*, 2010).

El conteo en el hemocitómetro o cámara de Neubauer es un método tedioso de realizar y presenta una mayor variabilidad que con métodos más modernos, ya que con estos el resultado obtenido es la media de varios conteos. Para realizar la determinación de la concentración con este método, se procede a realizar una dilución conocida de la muestra (1/20, 1/100, 1/200) y a continuación, se carga la cámara de conteo (Thoma, Neubaüer; Bürker o Makler) y se procede al conteo correspondiente a cada cámara. Lo habitual es realizar los conteos por duplicado. Si el resultado obtenido en ambos conteos no difiere del 5%, se efectúa el promedio de ambos, sin embargo, si la diferencia es mayor, conviene efectuar un conteo adicional cargando de nuevo la cámara. Al realizar los conteos, no se contabilizarán aquellos espermatozoides cuya cabeza esté situada sobre dos bordes de la cuadrícula, ni tampoco las cabezas sueltas (Baracaldo *et al.*, 2007).

La cámara de Makler es la más sencilla de manejar ya que proporciona un resultado directo tras realizar el recuento de diez cuadros nos proporciona directamente la concentración por mililitro (Marigorta y Pérez, 2008), aunque en nuestro país no es muy común encontrarla.

La medición de la concentración espermática es realizada comúnmente en México por el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer o hemocitómetro, la cual se consideran la prueba de oro para este tipo de mediciones, en donde se ha visto que la variabilidad de los resultados puede ser del 7.1 al 12%; sin embargo, es una técnica que requiere de experiencia para realizarla adecuadamente y toma alrededor de 15 min por muestra. Por lo anterior resulta importante que los profesionales dedicados a la evaluación de semen utilicen otros métodos más eficientes (rápidos y de menor variabilidad entre técnicos) para la evaluación de la concentración espermática, como la espectrofotometría (Rodríguez *et al.*, 2008).

El método de espectrofotometría permite la medición de la muestra bajo parámetros de longitud de onda, determinada según el tamaño celular y volumen de la muestra, la cantidad de luz absorbida da como resultado del nivel de densidad de la misma. Este método es de rápida aplicación sin importar el grado de concentración del eyaculado o la especie del macho que es evaluado. Además de ofrecer una menor variabilidad con respecto al método directo de conteo en cámara de Neubauer (Rodríguez *et al.*, 2008).

La espectrofotometría, es un método indirecto, que mide la luz monocromática absorbida que pasa por una muestra, por las partículas en suspensión o los espermatozoides. Esta densidad óptica de la muestra es comparada frente a una curva estándar patrón previamente validada, y permite, así, conocer el número de espermatozoides. Una encuesta realizada por Sánchez (2000), a varios centros de procesamiento de semen bovino, observó que el espectrofotómetro es el instrumento más utilizado para medir la concentración para el procesamiento de semen en México. De ahí y de otros aspectos como es el factor tiempo radica la importancia en la utilización para la evaluación de la concentración en los centros de procesamiento de semen en donde tienen que evaluar un gran número de muestras en un tiempo limitado.

La utilización del espectrofotómetro para medir la concentración de semen ha permitido que el procesamiento de muestras sea cada vez más rápido en comparación con el uso del aparato de rutina, la cámara de Neubauer o hemocitómetro (Rodríguez *et al.*, 2008).

Los sistemas CASA permiten determinar la concentración espermática de la muestra a analizar. Sin embargo tienden a sobrestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. Muiño *et al.*, (2005) atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobrestimación de la concentración tiende a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

VIII.4 Viabilidad.

El estudio de la membrana parece ser un buen procedimiento para evaluar la funcionalidad del gameto masculino, ya que ésta interviene activamente en la mayoría de las fases del proceso reproductivo. La membrana puede ser estudiada desde el punto de vista estructural mediante la utilización de tinciones, o bien valorar su funcionalidad, para lo que se ha aplicado el Test Hiposmótico (Jeyendran *et al.*, 1984) y distintas técnicas con fluorocromos permiten evaluar la funcionalidad espermática (Harrison y Vickers, 1990; Garner y Johnson, 1995).

La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de la viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. El procesado del semen, incluida su CP, es “estresante” para el espermatozoide y afecta, principalmente a sus membranas. Los daños que se producen en éstas pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica. Las membranas espermáticas que pueden verse afectadas por la CP incluyen la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales Liu y Foote., 1998).

Se sabe que durante el proceso de CP los espermatozoides son expuestos a diferentes concentraciones osmóticas, es decir que las concentraciones de las diferentes sales y demás componentes incluidos en el diluyente cambian durante el proceso de congelación y descongelación. Dichos cambios implican que los espermatozoides deben estar luchando constantemente por mantener su volumen celular aún expuestos a los mencionados cambios osmóticos (Felipe-Pérez., 2006).

La evaluación morfológica de la integridad de la membrana plasmática se realiza usando la óptica de contraste de fases, la óptica de contraste diferencial de interferencia o de Nomarski o las tinciones supravitales, como el Verde Rápido-Eosina, la Eosina-Azul de Anilina, el Tripán Azul-Giemsa, el Amarillo de

Naftol-Eritrosina, la Eosina-Nigrosina, el Rosa de Bengala, y el Café de Bismark, entre otros (Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006).

Actualmente se han utilizado diversas tinciones fluorescentes, las cuales presentan una mayor precisión en el estudio de las características de la membrana plasmática. Así, se ha estado usando ampliamente el Diacetato de Carboxifluoresceína y el Ioduro de Propidio (IP), visualizándose con ésta técnica los espermatozoides viables de color verde, frente a los muertos que se observan en color rojo anaranjado (Garner y Johnson, 1995).

Los espermatozoides vivos resisten a los colorantes supravitales, mientras que los muertos los absorben. Esta diferencia ofrece un método sencillo de conteo y por lo tanto, de determinación del porcentaje de espermatozoides con su membrana plasmática intacta (vivos) en una muestra (Sorensen, 1982). Son varios los colorantes que pueden utilizarse. Éstos en su mayoría, son mezclas de eosina y algún colorante de contraste. Uno de gran aceptación es Eosina-Nigrosina (E-N) (Catena y Cabodevila, 1999).

La muestra se prepara colocando una gota de semen diluido en un portaobjetos tibio, a la que luego se agregan una gota o dos del colorante y se realiza un frotis. El examen de la gota revela un fondo negro y las cabezas de los espermatozoides se observan como corpúsculos de color rosado, o se ven transparentes o ligeramente coloreadas en el tono del fondo. Una cabeza transparente indica que la célula estaba viva en el momento de la coloración, mientras que las coloreadas pertenecen a células muertas en el momento. El porcentaje de células vivas se obtiene mediante matemáticas simples (Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006)

Los porcentajes de células viables, calculados por éste método, son ligeramente inferiores a los determinados por el método visual, lo que indica que algunas células mueren y se colorean durante el proceso. Asimismo, se observan diferencias entre los extremos de la misma preparación coloreada, que llegan hasta un 12%, lo que también señala muerte celular durante la elaboración de la muestra. La velocidad de preparación y la exactitud en el

conteo, son de gran importancia (Sorensen, 1982). Éstos colorantes también son muy útiles para el estudio morfológico de la célula.

VIII.5 Estado del acrosoma.

El acrosoma es un organelo espermático que cumple una función esencial en el proceso de fecundación. Está delimitado por una membrana interna y externa, la cual se dispone sobre el núcleo en forma de capuchón y cubre un 80% de la longitud del núcleo (Bonet *et al.*, 2000).

Las enzimas que contiene el acrosoma son de gran importancia para la penetración espermática de la zona pelúcida durante la fertilización (Richardson *et al.*, 1992, Barth y Okko., 1989). El acrosoma juega un papel fundamental en la fertilidad y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja (Bonet *et al.*, 2000). Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones. Entre éstas están la tinción de Eosina-Verde Rápido, Giemsa y la E-N, las dobles y triples tinciones, basadas en la combinación de Azul Tripán con otros colorantes y tinciones comerciales como el Spermac (Catena y Cabodevila, 1999).

Recientemente, se han utilizado anticuerpos acrosomales específicos marcados con fluorescencia. En el caso de los espermatozoides bovinos, su tamaño permite poder valorarlos mediante un microscopio óptico de contraste de fases con un objetivo de gran aumento (Cox *et al.*, 1998).

El Glutaraldehído Salino Bufferado (GLSB) y el Formaldehído Salino Bufferado (FSB) han sido reportados como satisfactorios para la evaluación morfológica de espermatozoides bovinos (Richardson *et al.*, 1992; Barth y Okko, 1989; Harasymowycz *et al.*, 1976). El GLSB también es satisfactorio para la

evaluación del porcentaje de acrosomas intactos de espermatozoides bovinos. Muestras de semen mezcladas con GLSB han sido almacenadas por más de 29 días sin un decremento aparente en el porcentaje de acrosomas intactos. Sin embargo el GLSB no es fácilmente disponible y es algo tedioso de elaborar (Richardson *et al.*, 1992; Harasymowycz *et al.*, 1976).

VIII.6 Pruebas de funcionalidad espermática.

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. El análisis de la integridad de la membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho. Además, esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, y por tanto para la fertilidad del macho (Muiño *et al.*, 2005; Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006).

Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática de gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica. Estas pruebas se basan en la capacidad del espermatozoide para captar agua en un medio hiposmótico y en que la hinchazón osmótica está asociada con el enrollamiento de la cola del espermatozoide, que se desenrolla cuando la célula es devuelta a un medio isosmótico (Lin *et al.*, 1998, Liu y Foote, 1998).

Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destaca el Test Hiposmótico (Hipo Osmotic Swelling Test, HOST) desarrollado por Jeyendran *et al.*, (1984) para evaluar la función de la membrana espermática. Su principio se basa en la observación de alteraciones morfológicas (incremento en el tamaño) en los espermatozoides sometidos a condiciones hiposmóticas. Esta técnica consiste en colocar a los espermatozoides en presencia de un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Jeyendran *et al.*, 1984). Para que esta respuesta se

produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Durante el HOST, los espermatozoides con membrana plasmática intacta y funcionalmente activa se irán deformando (debido al influjo de agua) y subsecuentemente se incrementa el volumen para establecer un equilibrio entre los compartimentos extra e intracelulares. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo. Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como la motilidad, la viabilidad o la morfología. El uso de este barato y simple ensayo ha sido recomendado como parámetro adicional indicador de la fertilidad (Correa *et al.*, 1997, Liu y Foote, 1998, Lin *et al.*, 1998, Garzón-Pérez, 2008).

Se sabe que durante el proceso de CP los espermatozoides son expuestos a diferentes concentraciones osmóticas, es decir que las concentraciones de las diferentes sales y demás componentes incluidos en el diluyente cambian durante el proceso de congelación y descongelación. Tales cambios implican que los espermatozoides deben estar luchando constantemente por mantener su volumen celular aún expuestos a los mencionados cambios osmóticos (Felipe-Pérez, 2006).

Otra forma de evaluar la movilidad y por tanto la funcionalidad de la muestra consiste en valorar la resistencia a la incubación a 37 °C y a diferentes tiempos, con el fin de evaluar así si los espermatozoides son capaces de resistir y mantener su viabilidad en el tracto genital de la hembra durante algún tiempo. Existen opiniones contradictorias sobre la correlación de los resultados de esta prueba con la fertilidad. Así, hay autores que indican que existe mayor correlación con la fertilidad la evaluación de la movilidad de la muestra tras someterla a incubación, mientras que hay autores que indican que la correlación con la fertilidad es mayor cuando la movilidad se valora tras la descongelación de la muestra (Marigorta y Pérez, 2008).

VIII.7 Morfología.

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal (Harasymowycz *et al.*, 1976).

La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros. Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en la pieza media y en la cola. Según el órgano donde pueden haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias. Esta evaluación de la morfología espermática puede ser utilizada para eliminar toros con pobre calidad seminal y refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias, por lo que siempre deben estar incluidas en las pruebas de evaluación espermática (Barh, 1989).

El microscopio de contraste de fases es mucho más satisfactorio al realizar esta evaluación, es posible reflejar la luz sobre los lados de los espermatozoides, lo que da un efecto tridimensional y permite ver con mayor claridad los componentes celulares (Sorensen, 1982).

Los microscopios de contraste por interferencia diferencial, dan una excelente resolución a grandes aumentos y se utilizan sobre todo para el estudio de la formación acrosómica. Debido a su alto costo, los microscopios de contraste de fases no son una opción viable para realizar pruebas de campo (Hidalgo *et al*, 2005).

Algunos defectos morfológicos se han asociado a problemas de fertilidad reducida de las muestras, como pueden ser: la presencia de espermatozoides decapitados, núcleos anormales, anormalidades de la pieza intermedia, presencia de colas dobladas o ciertos defectos heredables. También se ha indicado que la resolución incompleta del proceso de maduración puede

originar patrones de movimiento aberrantes que imposibilitan la progresión y la fertilización (Catena y Cabodevila 1999).

Las anomalías espermáticas se consideran un defecto compensable y siempre que éstas no sean masivas no tienen por qué implicar una disminución de la fertilidad tras la aplicación de las dosis. De hecho, existen sementales que presentan anomalías en un porcentaje significativo y sin embargo, pueden tener una fertilidad superior a sementales con espermiogramas normales (Decuadro-Hansen, 2003).

El grado de anomalías aceptable en una muestra seminal varía con la especie con la que se esté trabajando. Algunos autores (Muiño *et al*, 2005; Decuadro-Hansen, 2003; Catena y Cabodevila, 1999) indican que tanto el tipo de anomalías presentes como la incidencia de las mismas presentan correlación con la fertilidad. Se debe tomar en cuenta que en el caso de los bovinos las muestras con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% deberán de descartarse para la congelación (Barth y Okko, 1989, Muiño *et al*, 2005).

Por lo general, las anomalías se dividen en dos clases: primarias y secundarias (Sorensen, 1982):

VIII.8 Anomalías primarias.

Éstas son de origen testicular. Ocurren por alguna falla durante el proceso espermatogénico que no se logró corregir mientras el espermatozoide pasaba por el sistema de conductos.

VIII.7.1 Anomalías de la cabeza.

Los espermatozoides pueden presentar las siguientes irregularidades en la forma de la cabeza: piriformes (en forma de pera), redondos, alargados o estrechos, microcéfalos, macrocéfalos, cabeza doble o mellizos, con acrosoma anormal.

Los primeros 7 tipos de anormalidades de la cabeza tienen nombres descriptivos y no necesitan aclaración.

Sin embargo, el acrosoma es un factor muy importante a estudiar en la actualidad, y también presenta algunas anormalidades.

El acrosoma se estropea en forma gradual y comienza con un ensanchamiento de la porción anterior, que luego se deteriora y desprende. La presencia del borde apical es el criterio más utilizado para evaluar la integridad del acrosoma. Se han descrito acrosomas incompletos, arrugados y con gránulos. Según parece la condición acrosómica es hereditaria (Sorensen, 1982, Hafez, 2000).

El estado del acrosoma no es una evaluación muy común en los centros donde se recolectan y procesan grandes cantidades de eyaculados, sería una tarea bastante pesada, de modo que únicamente se basan en la motilidad y únicamente en casos de duda realizan otras pruebas como la evaluación del acrosoma. En un estudio realizado por Sánchez (2000), encontró que el 98% de los laboratorios evalúa motilidad espermática y solo el 50% evalúa la morfología y para evaluar alguna otra prueba, como la integridad del acrosoma, la muestra tendría que presentar más del 20% de anormalidades y de éstas el 5% anormalidades de cabeza.

VIII.7.2 Anormalidades del segmento intermedio.

Estas son: doblado o retorcido en ángulo recto, doble o mellizo, agrandado o hinchado, y punto de inserción descentrado o abaxial (Sorensen, 1982).

VIII.7.3 Anormalidades de la cola.

Éstos son los defectos más comunes de la cola y, de hecho, del espermatozoide entero. La cola puede comenzar en la base de la cabeza y envolverla, o bien presentar una espiral y envolverlo, o bien presenta una espiral en su extremo libre. En la mayoría de los casos, la espiral es muy cerrada y no se debe confundir con el espermatozoide enfriado bruscamente, ya que éste último presenta la cola enrollada de modo uniforme y gradual,

formando una media luna y casi nunca se curva más de 180°. Una vez más, se insiste en que la temperatura permanezca constante o que se cambie en forma gradual (Bonet *et al.*, 2000).

VIII.7.4 Anormalidades Secundarias.

Esta son: cabezas desprendidas, gota citoplasmática en el cuello o en la cola, cola en forma de gancho, y acrosoma desprendido de la cabeza (Sorensen, 1982).

Las anomalías secundarias aparecen durante el paso de los espermatozoides por los conductos, después de salir de los túbulos seminíferos y el testículo en sí. Conviene hacer hincapié en que estas anomalías son de índole degradativa. Por lo general, el desprendimiento de las cabezas ocurre durante la manipulación de la muestra, por ello, no se le debe agitar con violencia. Asimismo, las cabezas suelen desprenderse al hacer un frotis para teñir la preparación (Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006)

La presencia de gotas citoplasmáticas indica que el espermatozoide fue eyaculado antes de completar su maduración. Es probable que el animal esté sobreutilizado y necesite un descanso (Sorensen, 1982).

VIII.7.5 Otras inclusiones poco frecuentes

Se pueden observar formaciones semejante a medusas, células epiteliales, leucocitos, eritrocitos, y células espermiogénicas primordiales o en vías de desarrollo (Hafez, 2000).

Se han utilizado otros métodos de clasificación y algunos todavía son vigentes. Ciertos investigadores utilizan las anomalías primarias y secundarias para designar las anomalías de la cabeza o del resto de la célula; otros no diferencian las anomalías primarias y secundarias, sino que las tratan en forma individual. Los resultados finales son casi los mismos, ya que la mayoría de las personas solo se interesan en las anomalías globales. Algunas personas consideran aparte las células inmaduras que presentan gota

citoplasmática, ya que éstas sólo denotan sobreuso del seminal en la mayoría de los casos y representan una etapa de la maduración normal (Hafez, 2000).

Existe una mayor correlación entre el porcentaje de las células normales y la fertilidad, que entre esta última y cualquier otro criterio. El número de células normales por inseminación está relacionado con el número de concepciones. Según parece, las células anormales no guardan alguna relación con la edad, peso del animal, la estación del año o la nutrición (Cox *et al.*, 1998).

Sin embargo, Sorensen (1982) no considera que las anomalías representen un gran problema, ya que recolectó semen de miles de toros de diferentes razas, edades y lugares y solo localizó 12 animales con más de 20% de las mismas.

IX. Integridad del ADN

La evaluación de la calidad seminal se ha llevado a cabo tradicionalmente midiendo la concentración, morfología y motilidad de muestras de semen. Sin embargo, estos parámetros no aportan información sobre la integridad del material genético de los espermatozoides (Fernández *et al.*, 2003).

Los espermatozoides de dosis seminales que son normales en su motilidad y morfología no son rechazados por el tracto reproductivo de la hembra, pueden iniciar la fertilización, pero tener deficiencias que afecten al cumplimiento de la misma o al desarrollo normal del embrión (Posado *et al.*, 2011).

Recientemente, evaluar el estado de la cromatina es uno de los principales objetivos porque se ha demostrado una alta correlación con la fertilidad (Evenson y Wixon, 2006). La inestabilidad de la estructura de la cromatina en el espermatozoide es un tema de análisis recurrente debido a que nos ofrece información directa de la “calidad” de la molécula de ADN que transmitirá la información a la siguiente generación. Cualquier defecto en esta molécula, bien sea en forma de rotura que afecta a una o a ambas cadenas de la molécula de ADN, puede tener como consecuencia una reparación que no respete la secuencia original para esa región del genoma y desencadenar efectos no

deseables en el embrión. Sin embargo, el análisis de los niveles de fragmentación del ADN espermático no se realiza de forma rutinaria en la evaluación de una muestra seminal por dificultades técnicas (Posado *et al.*, 2011).

Varios autores han centrado sus trabajos en investigar la inestabilidad de la estructura de la cromatina (Bungum, 2005). La estructura de la cromatina del esperma es muy compacta y estable, protege la integridad genética durante el transporte del espermatozoide a través del macho y del tracto reproductivo femenino (Evenson y Winxon, 2006). Una condensación defectuosa de la cromatina del espermatozoide, debido a múltiples factores, hace que el ADN sea inestable y sensible a la desnaturalización (Ahmadi, 1999).

Tabla 2. Técnicas para la medición de la fragmentación del ADN espermático: Base y Funcionamiento.

TÉCNICA	BASE	PARÁMETRO MEDIDO	MÉTODO DE DETECCIÓN
TUNEL	Adición de nucleótidos dUDP marcados con transferasa desoxinucleótido terminal. Los nucleótidos marcados se adicionan a roturas de ADN de cadena doble o sencilla	% de células con ADN marcado	Microscopía de fluorescencia o campo claro / citometría de flujo
Ensayo COMETA	Electroforesis en condiciones alcalinas: se desnaturaliza el ADN para detectar roturas de cadena doble y sencilla. Electroforesis en condiciones neutras: se detectan roturas de doble cadena	% de células con colas de migración se corresponden a espermatozoides con ADN fragmentado	Microscopía de fluorescencia
SCSA	Tratamiento con ácido débil: desnaturaliza ADN con roturas de hebra doble o sencilla. Naranja de acridina: se	Índice de Fragmentación de ADN (DFI): células con fluorescencia roja dividido por número total de células (rojas + verdes).	Citometría de flujo

	intercala en el ADN y emite fluorescencia (verde si el ADN está intacto y rojo si el ADN presenta roturas)	Expresado como %	
SCD	Tratamiento con ácido débil desnaturaliza el ADN. Tratamiento con solución de lisis desproteinizante. Se observan células con un halo de descondensación de cromatina alrededor de la cabeza cuando el ADN está intacto. La ausencia de halo indica daño del ADN.	% de células con halo pequeño o ausente respecto al total de células	Microscopía de campo claro o fluorescencia

TUNEL, TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) –mediated dUDP nick-end labeling; SCSA, Sperm Chromatin Structure Assay; SCD, Sperm Chromatin Decondensation test. (Zini *et al.*, 2001, Tarozzi *et al.*, 2007)

Estudios en humanos indican que la frecuencia de células espermáticas que contiene ADN fragmentado podría ser un nuevo parámetro independiente de calidad seminal y un predictor del potencial fertilizante. Existen varias técnicas para analizar la fragmentación del ADN espermático. Algunos de los más comunes son los siguientes: *In situ* nick translation (ISNT); Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labelling (TUNEL); Ensayo Cometa; y Análisis de la estructura de cromatina espermática (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA). Sin embargo, estas técnicas además de ser intensamente laboriosas, requieren el uso de enzimas de las cuales su actividad y accesibilidad al rompimiento del ADN puede ser irregular o bien como en el caso de SCSA requiere instrumental muy costoso para un análisis óptimo. Como consecuencia de estos procedimientos estas técnicas son utilizadas solo con propósitos de investigación pero no en laboratorios clínicos andrológicos. Así que el estudio de la fragmentación del ADN continúa sin incluirse en la mayoría de los estudios clínicos de semen (Cortéz-Gutierrez *et al.*, 2007). Hasta ahora todos estos ensayos han demostrado una clara asociación entre la fragmentación del ADN de espermatozoides y las tasas de

fertilidad, desarrollo embrionario y preñez y apoyan su utilidad clínica (Filatov *et al.*, 1999, Evenson *et al.*, 2002). Recientemente, Fernández *et al.*, (2003) desarrollaron una nueva técnica que permite evaluar la integridad del ADN. Se trata del Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD). Mediante un tratamiento ácido se induce la descondensación del ADN y los espermatozoides con ADN fragmentado son visualizados (mediante microscopía de campo claro o fluorescencia) por la formación de un halo de dispersión alrededor de la cabeza (Enciso *et al.*, 2006).

Los espermatozoides intactos son sumergidos en una matriz de agarosa en una laminilla y tratada con una solución ácida desnaturizante. Las membranas y proteínas son removidas usando una solución de lisis y posteriormente teñidas.

Entonces la presencia o ausencia de fragmentación puede ser determinada por la evaluación de tamaños de halos, por esto el SCD resulta una técnica simple, altamente reproducible y barata, con resultados altamente correlacionado con aquellos obtenidos con otros procedimientos como el SCSA (Enciso *et al.*; 2006).

IX.1 Porcentajes de gestación y de partos en relación con el Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN Espermático (DFI).

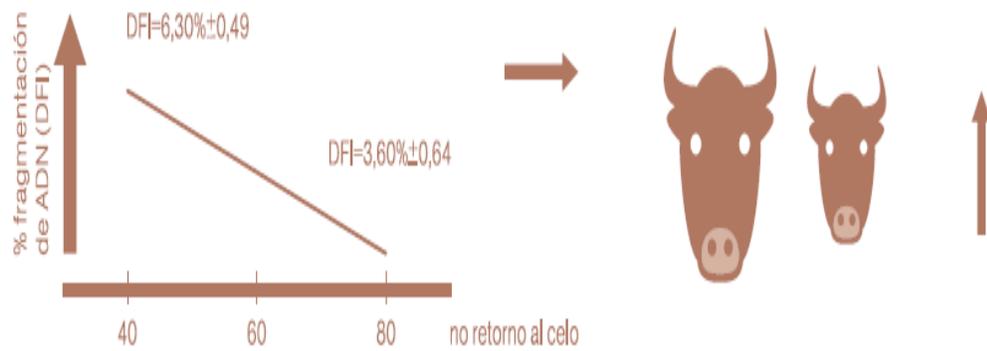
La integridad del ADN espermático es un factor muy importante que debe ser tomado en cuenta en la evaluación de semen porque está relacionado con los resultados de fertilidad y el desarrollo normal del embrión, pero hasta ahora, esta prueba no ha sido incluida en la evaluación rutinaria del semen (Fernández *et al.*, 2003, Enciso *et al.*, 2006).

Si la fragmentación del ADN es alta, el éxito reproductivo del semental se reduce. El DFI permite seleccionar sementales muy eficientes, evitando el costo asociado al mantenimiento de un semental con calidad seminal deficiente. Además, los índices reproductivos de las explotaciones mejorarán,

dado que bajos niveles de DFI se asocian con mejores tasas de fecundación y mayor tamaño de camada (García-Macías *et al.*, 2007).

La inseminación con semen de bajo DFI implica menor número de hembras que retornan al celo y, por tanto, mayor número de hembras preñadas. En inseminación heterospérmica con semen de alto y bajo DFI, la fracción con bajo DFI produce mayor número de becerros ($r=0.87$; $p<0,001$) (Figura 1).

Figura 1. Relación entre DFI con la gestación.



Fuente: García-Macías *et al.*, 2007.

X. MATERIAL Y MÉTODOS.

X.1 Muestras utilizadas.

Se utilizaron 32 pajillas de semen bovino previamente criopreservado en Glicerol-yema de huevo o en Triladyl-yema de huevo y envasadas en volúmenes de 0.25 o de 0.5 ml, con una concentración espermática de entre 25×10^6 y 30×10^6 por ml. Las muestras provenían de diferentes laboratorios y centros de procesamiento de semen y se almacenaron en nitrógeno líquido (-196 °C). Cada pajilla se descongeló a baño maría a 37 °C por 30 seg o 1 min dependiendo del volumen de la pajilla. Posteriormente la pajilla se dividió en dos alícuotas, colocando cada una en un tubo Eppendorf de 0.5 ml en una gradilla sumergida en baño maría a 36°C, para mantener la temperatura constante. Todas las muestras se evaluaron por duplicado.

X.2 Análisis básico de semen (espermiograma básico).

X.2.1 Motilidad espermática Subjetiva.

Se colocó un volumen de 10 ul de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado, se cubrió con un cubreobjetos y se observó la muestra al microscopio de contraste de fases con platina térmica (precalentada a 37 °C) con ocular de 10x y objetivo de 20x para dar un aumento total de 200x (Baracaldo *et al.* 2007). Se determinó el porcentaje (0-100%) de células móviles en la muestra de semen en el mismo diluyente de congelación (Fiser y Fairfull, 1989). Al porcentaje obtenido se le determinó con la variable MIS (Motilidad Inicial Subjetiva).

X.2.2 Motilidad y morfología espermática mediante el sistema CASA.

Se utilizó el equipo SpermVision CASA System versión 3.7.5 (Minitube, México), al cual se le denominó CASA (por sus siglas en inglés: Computer

Assisted Sperm Analyzer, Análisis de Semen Asistido por Computadora). La muestra de semen descongelada (10 μ l) se colocó en una cámara Leja precalentada a 37.5 °C. Se realizó la observación de siete campos distintos o 5000 células por muestra, los parámetros que se obtuvieron fueron: Motilidad Inicial Total (%) (MIT), Motilidad Inicial Progresiva (%) (MIP), concentración espermática (millares), y dentro de la clasificación morfológica se evaluó % de espermatozoides normales, Cabeza (%), cola (%), gotas distales (%) y proximales (%) (Contri *et al.*, 2010).

X.1.3 Porcentaje de vivos y muertos y morfología mediante la Tinción de Eosina-Nigrosina (E-N).

Se colocó un portaobjetos sobre una platina térmica a 37 °C por 30 a 60 seg, para posteriormente adicionar 10 μ l de E-N en uno de los extremos del portaobjetos, se colocó una gota de semen del mismo volumen junto a la gota de tinción, se mezcló el colorante con el semen sobre el portaobjetos. Una vez mezclado y eliminado el exceso se extendió lentamente sobre el portaobjetos de un extremo al otro. Se secó rápidamente soplando aire sobre el frotis (Sorensen, 1982).

Se utilizó un microscopio de contraste de fases, con el ocular de 10x y objetivo de 100x aplicando aceite de inmersión para dar un aumento total de 1,000x y se contaron 100 espermatozoides por muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de vivos y muertos en la muestra. Las células que no se tiñeron con el colorante fue debido a que la membrana espermática se encuentra activa y por la tanto no permite la penetración de la tinción y se determina como vivas. Por el contrario las células en donde la tinción penetró indican de que la membrana está inactiva y permite la penetración del colorante, por lo que adquieren un color rojizo y se consideran como muertas (Swanson y Bearden, 1951).

La clasificación de las anormalidades encontradas se realizó en función de la región espermática alterada. Se evaluó la morfología espermática y se registró el porcentaje de células normales y porcentaje de células anormales,

clasificando las anormales en primarias y secundarias. A su vez las anomalías primarias se clasificaron como anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola (Catena y Cabodevila, 1999). Se tomó en cuenta también la presencia de flagelos enrollados y/ o gotas citoplasmáticas distales (Pérez, 2008).

X.1.4 Tinción de espermatozoides con Rosa de Bengala y fijación con Glutaldehido Salino Bufferado para determinar integridad acrosomal.

Para la determinación de la integridad acrosomal por medio de microscopía de contraste de fases (1000x) y aceite de inmersión, la muestra seminal se diluyó en una solución de Glutaldehido Salino Bufferado (GLSB) al 2 % (1:1, v:v) en PBS (Pursel y Johnson, 1974) y 10 μ l de la tinción Rosa de Bengala. En un portaobjetos precalentado se colocaron 10 μ l de la muestra. La valoración se efectuó clasificando a los espermatozoides en dos grupos diferentes según la categorización efectuada por Pursel *et al.* (1978): Se reconocieron dos categorías: espermatozoides con borde apical normal y espermatozoides con borde apical dañado, modificado o sin borde apical o acrosoma.

Se evaluó la morfología de 100 células registrando porcentaje de células normales y porcentaje de células anormales, clasificándolas como se explicó anteriormente (Sorensen, 1982)

Después de realizar el conteo, el resultado se expresó como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto respecto al total (Pérez, 2008).

X.1.5 Concentración Espermática por medio de la cámara de Neubauer [Spz-N].

El conteo de células espermáticas por medio del hemocitómetro o cámara de Neubauer se utilizó para obtener la concentración. Las muestras de semen se homogenizaron pipeteando ligeramente en el tubo Eppendorf, y posteriormente se diluyó en una relación de 1:20 (5 μ l de muestra seminal con 95 μ l de agua destilada). Posteriormente con una micropipeta se tomaron 10 μ l del

homogenizado y se depositó por la orilla de cada lado de la cámara evitando sobresaturarla para que la muestra no se deslice al momento de hacer el conteo (Baracardo *et al.*, 2007) Después de cargar ambas cámaras del hemocitómetro se debe esperar 1 min para permitir que los espermatozoides se sedimenten en el fondo de las mismas. El conteo se realizó utilizando la técnica reportada por Baracaldo *et al.* (2007) y se expresó $\times 10^6/\text{ml}$.

X.2 Técnicas no convencionales.

X.2.1 Integridad de la membrana espermática.

X.2.1.1 Termoresistencia.

Se incubó la muestra a 37 °C durante 2 h y se realizó la evaluación de la motilidad luego de la incubación (Catena y Cabodevila, 1999; Galina y Valencia, 2006). La evaluación se realizó mediante el microscopio óptico y con el CASA como se explicó anteriormente y a los porcentajes obtenidos se les determinó con las variables M2S (Motilidad Subjetiva 2 h postdescongelación), M2T (Motilidad Total 2 h postdescongelación mediante CASA) y M2P (Motilidad Progresiva 2 h postdescongelación mediante CASA).

X.2.1.2 Prueba o Test Hiposmótico (Hipo Osmotic Swelling Test, HOST).

Se preparó una solución hiposmótica (190 mOsm/kg) con 500 ul de Citrato de Sodio al 1.46% y 500 ul de fructosa al 2.47% en 100 ml de agua destilada, en un vaso de precipitado. En esta evaluación se ajustó la concentración de la muestra a 35×10^6 espermatozoides por ml, para esto se colocó la muestra en un tubo cónico estéril de 10 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se restituyó en 1 ml de una Solución de Fosfatos (PBS). Se tomaron 100 ul de la solución hiposmótica previamente preparada y 100 ul de la muestra diluida, se incubaron a 37 °C durante 1 h, transcurrido ese tiempo se le agregó 100 ul de GLSB al 2% durante 10 min. Se observaron 100 células al microscopio de contraste de fases y se contaron como espermatozoides viables aquellos que presentaron cambios morfológicos como

hinchamiento y la cola enrollada (Chun-Xian y Zeng Ming, 2000; Garzón-Pérez, 2008).

X.2.2 Integridad de la membrana acrosomal.

Para determinar si los espermatozoides sufrieron reacción acrosomal se realizó la tinción Azul Brillante de Coomassie (BBC, por sus siglas en inglés: Brilliant Blue Coomassie), para la cual se utiliza la muestra procesada para la prueba de HOST a la cual se le agregó PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 3 min, se quitó el sobrenadante y se reconstituyó con 100 ul de Cloruro de Amonio. En una laminilla nueva se colocaron 16 ul de la muestra en la mitad de la misma y en la otra mitad se colocaron 16 ul del testigo que se preparó previamente con 100 ul de la muestra de semen descongelado diluido únicamente en 100 ul de fijador paraformaldehído mezclado y puesto a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se sumergieron las laminillas en vasos Coplin con la tinción CBB, cubriendo únicamente la mitad de la laminilla con los 16 ul de la muestra procesada con HOST, el vaso Coplin se tapó, ya que la BBC se evapora. Posteriormente el frotis se lavó dos veces con agua destilada para eliminar el exceso y se dejó secar. Por último se evaluó bajo el microscopio óptico. Se contaron 100 células y se clasificaron de acuerdo en su integridad acrosomal de la siguiente manera: intacto (bien definido, acrosoma altamente teñido); dañado (acrosoma con tinción difusa, con pérdida de la continuidad y/o pérdida de material; ausente o no detectable) (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009).

X.3 Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN Espermático (DFI).

Para determinar el DFI en células espermáticas de semen bovino congelado se utilizó la solución de lisis del kit Sperm-Bus-Halomax® para microscopía de fluorescencia (Halotech DNA S.L., Madrid, España). Se realizó la prueba según las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 25 ul de semen diluido en PBS para llegar a una concentración máxima de 20×10^6 /ml, se agregaron a viales con 50 ul de agarosa. Se utilizaron portaobjetos contenidos en el kit y se

agregaron 10 ul de la muestra, se cubrió con un cubreobjetos y se mantuvo a 4 °C por 5 min. Transcurrido ese tiempo se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se sumergió la muestra en la solución de lisis necesaria para cubrir el portaobjetos durante 5 min, se lavó con agua destilada por 5 min. Y finalmente se deshidrató y fijo en forma secuencial mediante baños de etanol al 70, 90 y 100% durante 2 min cada uno. Las células se tiñeron con 5ul de fluorocromo IP y se observaron inmediatamente al microscopio de fluorescencia, dicho fluorocromo permitió la visualización del DFI espermático mediante halos de dispersión de la cromatina espermática (López-Fernández *et al.*, 2008). Se contaron 300 espermatozoides y se calculó el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN. Por último se correlacionaron los resultados de las pruebas antes mencionadas con la presencia de ADN fragmentado (Enciso *et al.*, 2006).

X.4 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados utilizando el programa SPSS versión 16.0 (2007). Se realizó la prueba de coeficientes parciales de correlación de Pearson, tanto para la comparación de las diferentes técnicas de la misma característica y para conocer la relación que existe entre el DFI y las anormalidades, viabilidad e integridad de la membrana acrosomal.

Para este estudio se tomaron coeficientes de correlación bajos ($r=0.1$ a 0.44), medios ($r=0.45$ a 0.79) y altos ($r=0.80$ a 0.95).

XI. RESULTADOS.

En este estudio se encontró que la Motilidad del semen bovino descongelado evaluada a las 0 h (Cuadro 1) va desde el 5 % hasta el 90% y a las 2 h postdescongelación mantenida a una temperatura constante, baja hasta el 1% y se pueden encontrar datos hasta de 74.8% como se muestra en el Cuadro 1, los porcentajes de motilidad de las muestras evaluadas mediante microscopía óptica y el sistema CASA dividido en valores mínimos (Min), primer cuartil o percentil 25 (25%), segundo cuartil o percentil 50 (50%) que representa la media de las muestras, tercer cuartil o percentil 75 (75%) y los valores máximos observados en las muestras.

Cuadro 1. Calidad de la motilidad de las muestras de semen bovino criopreservado evaluadas mediante CASA y microscopía óptica.

Motilidad	Min.	Primer cuartil 25%	Segundo cuartil 50%	Tercer cuartil 75%	Max.
MIT n=32	26	40.7	55.3	69.3	88.16
MIP n=32	4.7	12.2	20.11	50.33	74.54
MIS n=32	5	20	45	70	90
M2T n=16	27.7	33.2	47.91	63.07	74.87
M2P n=16	1.54	9.6	25.37	35.58	56.23
M2S n=16	1	5	25	40	80

MIT: Motilidad Inicial Total mediante CASA; MIP: Motilidad Inicial Progresiva mediante CASA; MIS: Motilidad Inicial Subjetiva mediante microscopía óptica; M2T: Motilidad Total 2 h postdescongelación mediante CASA; M2P: Motilidad Progresiva 2 h postdescongelación

mediante CASA; M2S: Motilidad Subjetiva 2 h postdescongelación mediante microscopía óptica.

Los valores del Cuadro 2 muestran correlación significativa ($p < 0.001$), siendo entre MIT y MIP de $r = 0.907$, evaluadas por medio del sistema CASA pero media entre MIT y MIP con relación a MIS ($r = 0.679$ y $r = 0.465$ respectivamente). Los coeficientes de correlación fueron medios entre la M2T y M2P con respecto a la M2S y fueron significativamente similares ($p < 0.001$; $r = 0.687$ y $r = 0.689$ respectivamente).

Cuadro 2. Coeficientes de correlación para el análisis de los diferentes métodos para evaluar la Motilidad

	MIT	MIP	MIS	M2T	M2P	M2S
MIT	1	0.907**	0.679**	0.926**	0.910**	0.702**
N	32	32	32	16	16	17
MIP	0.907**	1	0.465**	0.903**	0.921**	0.742**
N	32	32	32	16	16	17
MIS	0.679**	0.465**	1	0.785**	0.752**	0.918**
N	32	32	33	16	16	17
M2T	0.926**	0.903**	0.785**	1	0.967**	0.687**
N	16	16	16	16	16	16
M2P	0.910**	0.921**	0.752**	0.967**	1	0.689**
N	16	16	16	16	16	16

MIT: Motilidad Inicial Total mediante el sistema CASA, MIP: Motilidad Inicial Progresiva mediante el sistema CASA, MIS: Motilidad Inicial Subjetiva mediante microscopía óptica, M2T: Motilidad Total 2 h postdescongelación mediante el sistema CASA, M2P: Motilidad Progresiva 2 h postdescongelación mediante el sistema CASA y M2S: Motilidad subjetiva 2 h postdescongelación evaluada mediante microscopía óptica. ** $p < 0.01$

El porcentaje de espermatozoides con características morfológicas normales fue diferente cuando se evaluó mediante la tinción E-N que tuvo 70.4% y

mediante el sistema CASA siendo este de 58.7%. En el Cuadro 3 se muestran la media de los porcentajes de las características morfológicas evaluadas a las muestras de semen bovino criopreservado mediante la tinción E-N y su observación al microscopio óptico y la morfología evaluada por el sistema CASA.

Cuadro 3. Media de los porcentajes de características morfológicas evaluadas por microscopía óptica y tinción Eosina-Nigrosina, y por el sistema CASA.

ANORMALIDADES E-N (%)					ANORMALIDADES CASA (%)				
Normales %	Cabeza	Pza. media	Cola	Gota Prox.	Normales %	Cabeza	Cola	Gota Distal	Gota Prox
d.s.					d.s				
70.48	8.04	2.12	7.96	2.6	58.79	8.69	9.09	17.05	3.8
± 14.9	±5.74	±1.98	±8.78	±0.54	±20.31	±5.56	±5.54	±11.85	±2.8

E-N: Eosina – Nigrosina., CASA: Sistema CASA (Análisis de Semen Asistido por Computadora), d.s.: Desviación Estándar.

No se encontró correlación ($p>0.05$) entre la evaluación de la morfología espermática por medio de microscopía óptica y la tinción E-N, y la evaluación de la morfología mediante el sistema CASA.

En el Cuadro 4 se muestran la media y desviación estándar de los valores porcentuales de acrosomas intactos evaluados por BBC, fijados mediante GLSB y la tinción Rosa de Bengala, observados por microscopía de contraste de fases.

Cuadro 4. Evaluación de la integridad del acrosoma.

BBC (\pm DS)	GLSB (\pm DS)
54.95 \pm 15.8	34.37 (\pm 19.4)
n=19	n=30

BBC: Azul Brillante de Coomassie, GLSB: Fijación con Glutaraldehído Salino Bufferado y Rosa de Bengala.

No se encontró correlación ($p > 0.05$) entre la evaluación de la integridad de la membrana acrosomal mediante la tinción BBC y la fijación con GLSB observada al microscopio de contraste de fases.

En el Cuadro 5 se observan los coeficientes de correlación de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática mediante la técnica de termoresistencia (M2P, M2T y M2S) que fueron de $r=0.668$ ($p < 0.01$), $r=0.645$ ($p < 0.05$), y $r=0.587$ ($p < 0.05$) con respecto al Test Hiposmótico (HOST). No se encontró correlación significativa ($p > 0.05$) entre la tinción supravital E-N para evaluar la viabilidad (VEN, VEN2) y HOST. En cuanto a la correlación que existe entre la termoresistencia y la viabilidad se encontraron valores significativos entre M2P y VEN ($r=0.578$, $p < 0.05$), M2P y VEN2 ($r=0.757$, $p < 0.01$).

Se observó una correlación baja ($r=0.421$; $p < 0.05$) entre la evaluación de la concentración mediante el uso de la cámara de Neubauer y la concentración mediante el sistema CASA.

Cuadro 5. Coeficientes de correlación para el análisis de las técnicas para evaluar la viabilidad espermática o integridad de la membrana plasmática postdescongelación mediante termoresistencia, hiposmosis y la tinción supravital Eosina-Nigrosina evaluada 0 h postdescongelación y 2 h postdescongelación.

	M2P	M2T	M2S	HOST	VEN	VEN2
M2P	1	.967**	.689**	.668**	.578*	.757**
N	16	16	16	14	16	13
M2T	.967**	1	.687**	.645*	.542*	.747**
N	16	16	16	14	16	13
M2S	.689**	.687**	1	.587*	.475	.113
N	16	16	17	15	17	13
HOST	.668**	.645*	.587*	1	.461	.546
N	14	14	15	15	15	11
VEN	.578*	.542*	.475	.461	1	.351
N	16	16	17	15	17	13

M2T: Motilidad Total 2 h postdescongelación. M2P: Motilidad Progresiva 2 h postdescongelación. M2S: Subjetiva Motilidad 2 h postdescongelación. HOST: Test Hiposmótico. VEN: Viabilidad Eosina-Nigrosina. VEN2: Viabilidad Eosina-Nigrosina 2h postdescongelación. ** p< 0.01, * p< 0.05.

Por su parte el DFI mostró un valor medio de 5.8% (\pm 3.4). En el Cuadro 6 se observa que no existe correlación entre las variables estudiadas para determinar la calidad de semen bovino criopreservado y el DFI ($\rho > 0.05$).

Cuadro 6. Coeficientes de correlación entre las características para evaluar la calidad de semen bovino y el DFI.

	MIT	MIP	MIS	M2T	M2P	M2S	HOST
DFI*	0.058	0.032	0.090	0.062	0.093	0.098	-0.059

*p>0.05

VEN	VEN2	BBC	GLSB	MRF	MRF2	CONCNEU	CONCC
-----	------	-----	------	-----	------	---------	-------

DFI*	0.234	0.134	-0.003	0.002	0.079	0.321	-0.136	0.035
-------------	-------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------

MIT: Motilidad Inicial Total mediante CASA; MIP: Motilidad Inicial Progresiva mediante CASA; MIS: Motilidad Inicial Subjetiva mediante microscopía óptica; M2T: Motilidad Total 2 h postdescongelación mediante CASA; M2P: Motilidad 2 h Progresiva postdescongelación mediante CASA; M2S: Motilidad Subjetiva 2 h postdescongelación mediante microscopía óptica, HOST: Test Hiposmótico. VEN: Viabilidad Eosina-Nigrosina. VEN2: Viabilidad Eosina-Nigrosina 2 h Postdescongelación, BBC: Azul Brillante de Coomassie, GLSB: Glutaraldehído Salino Bufferado, MRF: Morfología mediante E-N y microscopía óptica, MRF2: Morfología mediante el sistema CASA, CONCNEU: Concentración mediante la cámara de Neubauer, CONCC: Concentración mediante el sistema CASA.

*p > 0.05.

En el Cuadro 7 se muestra que la correlación entre la motilidad y HOST siendo de $r=0.559$, $r=0.631$ y $r=0.563$ ($p<0.05$) con la MIT, MIP y MIS respectivamente y de $r=0.522$, $r=0.575$ y $r=0.528$ ($p<0.05$) entre éstas últimas y la evaluación de la viabilidad mediante E-N, existe también correlación ($p<0.05$) entre HOST y la evaluación de la integridad acrosomal mediante BBC ($r=0.744$), y por último entre la viabilidad mediante E-N y la tinción BBC ($r=0.611$).

Cuadro 7. Correlaciones encontradas entre algunas características para evaluar la calidad de semen.

	HOST	MIT	MIP	MIS	EN	EN2	BBC
HOST	1	0.559	0.631	0.563	-	-	0.744*
MIT	0.559*	1	-	-	0.522*	0.641*	-
MIP	0.631*	-	1	-	0.575*	0.595*	-
MIS	0.563*	-	-	1	0.528*	-	0.419*
EN	-	0.522	0.575	0.528	1	-	0.611*
EN2	-	0.641	0.595	-	-	1	-
BBC	-	-	-	0.419	0.611	-	1

HOST: Test Hiposmótico MIT: Motilidad Inicial Total mediante CASA; MIP: Motilidad Inicial Progresiva mediante CASA; MIS: Motilidad Inicial Subjetiva mediante microscopía óptica.

VEN: Viabilidad Eosina-Nigrosina. VEN2: Viabilidad Eosina-Nigrosina 2h Postdescongelación,
BBC: Azul Brillante de Coomassie, *p<0.05

XII. DISCUSION.

Januskauskas *et al.* (1999), encontró una correlación entre la motilidad total evaluada subjetivamente ($r=0.65$, $p<0.001$) y por medio del sistema CASA ($r=0.50$, $p<0.001$) cuando evaluaron semen bovino congelado a diferentes tiempos de enfriamiento siendo valores similares a los encontrados en ésta investigación utilizando semen bovino descongelado. En ese mismo estudio Januskauskas *et al.* (1999) encontró que existe una correlación significativa ($p<0.001$) entre la motilidad subjetiva y el porcentaje de espermatozoides vivos con la membrana acrosomal intacta ($r=0.42$) y con el CASA ($r=0.56$), similares a las de éste estudio. Es por eso que en muchos centros de IA relacionan la motilidad subjetiva con calidad seminal.

El sistema CASA en este estudio y en los laboratorios en donde se utiliza ha sido subutilizado, ya que por lo general no se toman en cuenta aspectos cinemáticos importantes de la calidad del movimiento del espermatozoide, como la velocidad o patrones de movimiento de los espermatozoides.

Algunos autores han encontrado variaciones de hasta 30 y 60% en evaluaciones de motilidad subjetiva en semen de humanos y animales en una misma dosis (Contri *et al.*, 2010). En éste estudio los porcentajes de motilidad fueron muy variables, siendo el mínimo de 5% al 90%. Esto puede estar relacionado con diferencias entre las distintas razas de toros utilizados y entre los distintos lugares de procesamiento de las muestras evaluadas.

Según Barth y Okko (1989), las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% deberán descartarse para congelación e IA y cualquier anomalía, ya sea primaria o secundaria puede llegar a comprometer la fertilidad del semen, pese a la alta motilidad que pudiera tener (Muiño *et al.*, 2008).

En éste estudio el porcentaje de espermatozoides normales evaluado mediante tinciones como E-N fue de 70.4, mientras que por el sistema CASA fue de 58.7, encontrándose una correlación baja entre ellos ($r=0.227$) no significativa

$p > 0.05$, esto podría deberse a que el sistema CASA evalúa morfometría o tamaño celular. Un determinado número de píxeles le indica a la computadora el rango de píxeles que es aceptable para una cabeza espermática normal, así como los rangos mínimos y máximos por especie (Mortimer, 1997), también aporta parámetros como anchura, longitud, área y perímetro y algunos derivados de las formas de la cabeza espermática, elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, parámetros que con los métodos tradicionales de observación visual y subjetiva no se podrían detectar (Holt *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 2008).

El porcentaje de acrosomas intactos encontrados mediante GLSB y el microscopio de contraste de fases fue de 34.3%, menor que al evaluarlo con CBB y microscopio de campo claro que fue de 54.9%, y su correlación fue baja y no significativa ($r = 0.346$, $p > 0.05$).

La subjetividad de la evaluación de las muestras mediante GLSB y la baja correlación que se encontró entre ésta y la evaluación del acrosoma mediante BBC en el presente estudio sugiere la existencia de distintos grados de daño acrosomal en el semen descongelado, en muchos casos indetectable en la valoración subjetiva. Puede ser que debido a la inexperiencia del evaluador, la subjetividad de la técnica y la calidad del microscopio de contraste de fases, la integridad acrosomal de los espermatozoides con GLSB no se pudo determinar correctamente y menos células con acrosomas dañados pudieron ser contadas. Esta explicación es solamente especulativa y merece una mayor investigación.

Richardson *et al.* (1992) compararon diferentes técnicas para evaluar acrosomas mediante GLSB y FSB en semen bovino descongelado en donde observó un decremento del porcentaje de acrosomas intactos del día 0 al día 7. Demostraron también que muestras diluidas en Yema de Huevo y fijadas con FSB tenían una alta precipitación después de conservarlas por varios días. La media del porcentaje de acrosomas evaluados con GLSB al 2% fue de $51.6 \pm$

11.9. La correlación entre el porcentaje de acrosomas intactos y el porcentaje de motilidad progresiva en muestras no fijadas fue de 0.65.

Saacke y White (1970) reportaron una alta correlación entre la integridad acrosomal después de 2 h postdescongelación y la fertilidad por medio de la medición de 90 días de no retorno al estro.

Johnson *et al.* (1976) encontraron un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos cuando al GLSB al 2% se le adicionó cacodilato de Na, es posible que éste necesite ser adicionado al GLSB para preservar la integridad acrosomal como el FSB lo hace.

La integridad del acrosoma está altamente correlacionada con la fertilidad y es una de las mejores estimaciones prácticas en la actualidad. Un estudio sobre los acrosomas demostró la existencia de una correlación de 0.80 a 0.81 entre acrosomas intactos y la fertilidad, después de incubar el semen durante 2 y 10 h, respectivamente (Sorensen, 1982).

Chan *et al.* (1996) encontraron una correlación positiva ($r=0.43$, $p<0.05$) entre el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos teñidos con el colorante comercial Spermac y el porcentaje de espermatozoides que penetraron en ovocitos de Hamster “libres de zona”, siendo ésta última también correlacionada con la velocidad lineal de los espermatozoides ($r=0.34$). Estos datos demuestran que la integridad de la membrana acrosomal puede estar relacionada también con la integridad de otras membranas y la motilidad.

Los resultados obtenidos en éste estudio concuerdan con los reportados en las correlaciones de Host vs E-N por Cardona *et al.* (2007) ($r=0.56$, $p<0.001$), Lin *et al.* (1998) ($r=0.3413$, $p<0.015$), Bahamondes *et al.* (2001) ($r=0.435$, $p<0.001$), Munuce *et al.* (2000) ($r=0.47$, $p<0.05$). A pesar de que las 3 técnicas evalúan la integridad de la membrana plasmática, la baja correlación se explica por el hecho de que cada técnica evalúa diferentes aspectos: E-N examina la integridad de la membrana, si ésta se encuentra dañada, la tinción entra a la célula, además que la presencia de glicerol en una muestra en porcentajes que

excedan el 4%, puede interferir con las tinciones vivos/muertos, haciendo disminuir los porcentajes de espermatozoides viables probablemente porque el glicerol induzca un aumento de la permeabilidad de la célula al colorante (Cardona *et al.*, 2007). Por otra parte, HOST evalúa la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, mediante el influjo de agua dentro de la célula, el enrollamiento de la cola indica un funcionamiento normal de la membrana. Los resultados permiten proponer que estas pruebas sean complementarias para la evaluación de la membrana espermática de los animales, ya que la integridad y la actividad funcional son importantes para los cambios fisiológicos que ocurren en el trayecto que recorre el espermatozoide hacia el sitio de fertilización (Chang, 1951, Austin, 1952). La respuesta a esta prueba está correlacionada con la capacidad del espermatozoide de penetrar los ovocitos, por lo tanto, es indicativo del potencial fertilizante de la muestra (Jeyendran *et al.*, 1984).

Varios autores han demostrado que no existe una correlación entre la evaluación seminal *in vitro* y la fertilidad en campo (Januskauskas, 1999), sin embargo se asume que solo los espermatozoides viables son capaces de atravesar el tracto genital femenino, es por eso que se le da tanto peso a la evaluación de la viabilidad espermática, siendo la que más se toma en cuenta para la IA.

La falta de relaciones significativas entre las características de calidad del semen y la fertilidad, puede ser atribuida en parte al número de espermatozoides presentes en la dosis seminal, algunas investigaciones han demostrado que la cantidad óptima para fertilizar es de entre 15 y 20 millones de espermatozoides por dosis, aunque también es un factor importante la variación entre individuos (Haard y Haard, 1984; Gerard y Humblot, 1991; Januskauskas *et al.*, 1999). De ahí la importancia de evaluar la concentración de las dosis seminales para los centros de IA.

En éste estudio la concentración espermática se evaluó mediante el conteo con la cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases y por medio del

sistema CASA, encontrando una correlación de $r=0.41$ ($p<0.05$). Existen varios factores que se pudieron inferir con estos resultados, como por ejemplo, cuando la dosis seminal está muy concentrada el sistema CASA puede tener algunos problemas para detectar el número de células, de igual manera pasa al momento de evaluar la motilidad de una muestra con ciertos diluyentes, por esto cada laboratorio deberá estandarizar su protocolo de evaluación de motilidad, concentración y morfología mediante el sistema CASA (Contri *et al.*, 2010).

Un error que se puede encontrar con algunos sistemas CASA es que podría no diferenciar entre una cabeza de espermatozoide o un detritus si éste tiene un tamaño dentro del rango que se especificó para el conteo celular (Contri *et al.*, 2010).

Ya se ha demostrado que la motilidad espermática, la morfología y la integridad de membrana plasmática es afectada por la CP, sin embargo, sobre la integridad del ADN espermático poco se sabe aun, no se ha informado que tan alterada se encuentra después de la CP.

En éste estudio se encontró un promedio de DFI de 5.8%, muy similar a lo reportado por Waterhouse *et al.* (2010) quienes realizaron una comparación del daño ocasionado en el ADN espermático de toros congelados en dos diluyentes distintos mediante la prueba SCSA y encontraron en promedio porcentajes de DFI de 6.2% y 8.9%. De igual manera Posado *et al.* (2011) reportaron porcentajes de DFI de 10%, 8% y 3.5% cuando compararon el semen bovino criopreservado de 3 razas bovinas diferentes, ganado de Lidia, Charolais y Holstein respectivamente, siendo ésta última el valor más bajo de fragmentación encontrado que probablemente esté ligado a la selección de esta raza.

En lo que respecta a este trabajo no se encontraron correlaciones entre el DFI y los demás parámetros evaluados. De igual manera, López-Fernández *et al.*, (2008) no observaron correlaciones entre el DFI y la motilidad, la integridad del acrosoma, las presencia de gotas citoplasmáticas distales, colas enrolladas y

morfología anormal de la cabeza cuando evaluaron semen de cerdo refrigerado. Solo las gotas citoplasmáticas proximales mostraron una tendencia a incrementar el DFI. En otro estudio con semen de cerdo conservado sin diluir, que sufría un incremento significativo del DFI en el momento en que la motilidad, y el estado de la membrana plasmática evaluado mediante HOST, decaían (Pérez-Llano *et al.*, 2005). Las correlaciones encontradas en ese trabajo entre el DFI y calidad seminal se encontraban alrededor de $r=-0.40$ ($p<0.001$), es decir, una correlación moderada, negativa pero significativa.

Se ha propuesto que el empaquetamiento del ADN espermático es un medio para protegerlo contra las especies reactivas de oxígeno (Gopalkrishnan *et al.*, 1999; Agarwal y Said, 2003). Varios autores han observado una relación entre la infertilidad y el daño al ADN (Saleh *et al.*, 2002; Saleh *et al.*, 2003) y entre el desarrollo embrionario y anomalías en la cromatina en programas de FIV (Hoshi *et al.*, 1996). Otros reportes han mostrado una fuerte correlación entre la morfología normal y un empacamiento normal de la cromatina (Saleh *et al.*, 2002; Saleh *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2003; Shibahara *et al.*, 2003), mientras que otros estudios han reportado que un empacamiento anormal incrementa el rompimiento de ADN y la susceptibilidad a la desnaturalización, en hombres con problemas de fertilidad (Lopes *et al.*, 1998; Hofmann y Hilscher, 1991; Filatov *et al.*, 1999).

Recientemente se ha demostrado que la intensidad de la fragmentación de ADN está correlacionada con la falla en la concepción en humanos (Zini *et al.*, 2001; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Es por esto que el desarrollo de una técnica simple para determinar el DFI en cualquier laboratorio podría ser de gran interés. Esto complementarían el análisis seminal estándar, principalmente en muestras dirigidas a IA, en la evaluación de semen criopreservado, o para propósitos de investigación en la cromatina espermática influenciada por el factor macho. La metodología de la técnica de SCD ya ha sido contrastada y se ha propuesto como una alternativa para el ensayo TUNEL, Cometa o SCSA (Fernández *et al.*, 2003; Enciso *et al.*, 2006; Chohan *et al.*, 2006; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Aun no se ha descrito cual es el porcentaje mínimo aceptado de DFI para afirmar que el semen sea capaz de fertilizar, pero se ha encontrado que el daño al ADN de espermatozoides fertilizantes afecta el desarrollo y sobrevivencia embrionaria (Ahmadi y Ng, 1999; Fatehi *et al.*, 2006), y que se relaciona con la infertilidad y subfertilidad en diferentes especies (Evenson *et al.*, 2002; Gillan *et al.*, 2005; Evenson y Wixon, 2006). Así mismo, que el DFI espermático es afectado por el proceso de CP espermática (Waterhouse *et al.*, 2010).

XIII. CONCLUSIONES.

El porcentaje mínimo del DFI para semen bovino descongelado aun no está reportado y se encontró que no existe correlación con ningún valor del análisis seminal estándar que se realizó, incluyendo técnicas convencionales y avanzadas.

La gran variación en los valores obtenidos en las pruebas funcionales en semen bovino criopreservado requiere una re-evaluación del uso de éstas pruebas en la evaluación de la calidad del semen bovino criopreservado, pero también podrían estar relacionados con diferencias entre las distintas razas de toros utilizadas y los diferentes lugares de colección de las muestras.

En resumen, ninguno de los métodos de análisis rutinarios de la calidad de semen bovino utilizados en esta investigación se correlacionó con el DFI de las muestras analizadas. Por lo tanto se concluye que es importante incluir la prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) para su uso rutinario en laboratorios de reproducción asistida y de procesamiento y evaluación de semen para determinar la integridad del ADN espermático antes de iniciar programas de reproducción en los que se utilice semen bovino criopreservado, desde los más sencillos como la IA con semen convencional o sexado, a los más complejos como la FIV o la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

La técnica de SCD es un método simple, rápido y altamente reproducible para el análisis de la fragmentación de ADN espermático y procesamiento de semen, además el SCD no requiere el uso de instrumental tan complejo, y puede ser llevado a cabo con el material y equipo disponible en los laboratorios de reproducción (como por ejemplo el microscopio de campo claro). Esta prueba puede utilizarse rutinariamente tanto en un laboratorio de reproducción asistida como de procesamiento y evaluación de semen.

Los resultados obtenidos en esta investigación de la evaluación de muestras de semen bovino criopreservado utilizando pruebas convencionales y modernas,

así como su falta de correlación con el índice de fragmentación del ADN espermático ayudan a conocer las diferencias que existen entre técnicas y a seleccionar las más idóneas para evaluar el semen con una mayor eficiencia, eliminando la subjetividad. También ayuda a conocer en mayor profundidad la forma en que la CP afecta el potencial fertilizante de los espermatozoides y del semen congelado.

De esta forma es posible proponer estrategias para alcanzar mayores porcentajes de fertilidad al utilizar semen congelado de bovino en programas de IA en México.

Esto en consecuencia contribuye a favorecer el uso de semen congelado con mayor calidad, lo que a su vez contribuye a mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de la industria ganadera nacional.

XIV. REFERENCIAS.

1. Abaigar T, Holt W, Harrison R, Del Barrio G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*. 60: 32-41.
2. Agarwal A, Said TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 9: 331.
3. Ahmadi A. 1999. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Human Reproduction*. 14 (9): 2279-2285.
4. Ahmadi A, Ng SC. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*. 284: 696-704.
5. Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a semen sample be predicted accurately?. *Journal of Andrology*. 10: 89-98.
6. Austin CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. 170: 326.
7. Bahamondes L, Fazano F, De Lucio MA. 2001. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. *Andrologia*. 33: 75.
8. Baracaldo MI, Barth AD, Bertrand W. 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*. International Veterinary Information Service. Ithaca, Nueva York, USA.
9. Barth AD. 1989. Evaluation of frozen bovine semen. En *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology*. Idaho. USA. 92-99.
10. Barth AD, Oko RJ. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames IA. USA. Pp. 17, 37.

11. Bonet SM, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. 2000 Morfología espermática del porcino. Instituto de estudios Catalanes de la Universidad de Barcelona, 49 – 59.
12. Boyers SP, Davis R, Katz DF. 1989. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*. 12: 172-200.
13. Breitbart H, Naor Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod*. 4: 151-159.
14. Brouwers JF, Neild DM, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM, 2005. Lipid Peroxide Formation in Relation to Membrane Stability of Fresh and Frozen Thawed Stallion Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 72: 230–238.
15. Bungum M. 2005. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*. 20(3): 839-840.
16. Cabodevila J, Catalano R, Callejas S. 2005. Evaluación de semen bovino congelado/descongelado: Resultados de espermogramas realizados en el período 2003-2004. *Revista Argentina de Producción Animal*. 25 (Supl. 1): 251-252.
17. Cardona MW, Berdugo GJ, De los Ríos J, Cadavid JA. 2007. Functional evaluation of sperm in colombian fertile men. *Archivos Españoles de Urología*. 60 (7): 827-831.
18. Catena M, Cabodevila J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*. 1(3): 18-31.
19. Chan PJ, Corselli JU, Jacobson J.D., Patton W.C., King A., 1996. A correlation between intact sperm acrosome using Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Archives of Andrology*. 76 (94): 25-27.

20. Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168: 697.
21. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. 2006. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*. 27(1): 53-59.
22. Chun-Xia Zou, Zeng-Ming Yang. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*. 53: 1477-1488.
23. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 31(2): 120-131.
24. Contri A, Claudio Valorz C, Massimo Faustini, Laura Wegher, Augusto Carluccio. 2010. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 74 (3): 424–435.
25. Correa JR, Pace MM, Zavos PM. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*. 48: 721-73.
26. Cox JF, Fernández P, Saravia F, Santa María A. 1998. Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. (30): 1.
27. Cruz ZA, Pajan VJ, Puza RR, Cuesta CC. 2006. Principales factores que frenan la prolificidad del ganado vacuno en Latinoamérica. *Memorias del XXX Congreso Nacional de Buiatría*; agosto 10-12; Acapulco (Guerrero) México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC: 219.

28. Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW. 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modelling of sperm cryosurvival. *Fertility and Sterility*. 63: 1051-1057.
29. Decuadro-Hansen G. 2003. Fertilidad de los Toros de Inseminación Artificial: Factores de Variación. *Taurus* 17: 20-34.
30. Den Daas N. 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*. 28: 87-94.
31. Enciso M, López-Ferández C, Fernández JL, Garcia P, Gosálbez A, Gosálvez J. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*. 65(2): 308-316.
32. Espinosa GR. 1991. El semental y la inseminación artificial actual. Memorias de la 7a. conferencia internacional sobre ganado lechero. CIGAL. México, D.F. México. Pp. 84-93.
33. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. 23: 25–43.
34. Evenson D, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 65 (5): 979–991.
35. Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH, Douglas Hamilton D. 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertility and Sterility*. 64 (1): 208-10.
36. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block

- fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*. 27: 176–188.
37. Felipe-Pérez YE. 2006. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación del semen bovino (tesis de maestría). México (D. F.). Universidad Nacional Autónoma de México.
 38. Felipe-Pérez YE. 2009. Dinámica del citoesqueleto de actina en espermatozoides epididimales, frescos y descongelados de bovino (tesis de doctorado). México (D. F.). Universidad Nacional Autónoma de México.
 39. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. 24(1): 59-66.
 40. Filatov MV, Semenova EV, Vorobeva OA, Leonteva OA, Drobchenko EA. 1999. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Molecular Human Reproduction*. 5: 825.
 41. Fischer M.A, Willis J, Zini A. 2003. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*. 61: 207.
 42. Fiser PS, Fairfull RW. 1989. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on the cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*. 21: 542-551.
 43. Fraser L, Strzeżek J. 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?. *Theriogenology*. 68 (2): 248–257.
 44. Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*. 52: 473–480.

45. Galina C, Valencia J. 2006. Reproducción de Animales Domésticos. Segunda Edición. Editorial Limusa SA de CV. México. 215-223.
46. García-Macías V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Alvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E, Anel L 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *International Journal of Andrology*. 30(2): 88-98.
47. Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*. 53: 276-284.
48. Garzón-Pérez C. 2008. Desarrollo y validación de una prueba de estrés osmótico precongelación para predecir la criosupervivencia de semen de cerdo. Tesis de Maestría. FESC. UNAM. México.
49. Gerard O, Humblot P. 1991. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on non return rate estimates of fertility for individual Holstein bulls. *Theriogenology* 36: 727-736.
50. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457.
51. Gonzalez-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC, Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S, Cárdenas S. 2006. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: Motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcinos*. Ed: Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. 19-35.

52. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. 1999. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia*. 31: 277.
53. Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Uribe CS, Trujillo OME. 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58: 287–292.
54. Haard MGM, Haard MCh. 1984. Influence of reduced sperm number on bull fertility in AI. Proc 10th. In: Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Illinois U.S.A. 3: 366 abstract.
55. Hafez ESE. 2000. Reproducción e Inseminación artificial de los animales. 7a Edición. Interamericana. México.
56. Hamamah S, Royere D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. 1990. Effects of freezing–thawing on the spermatozoon nucleus a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition and Development*. 30: 59–64.
57. Harasymowycz J, Ball L, Seidel GE Jr. 1976. Evaluation of bovine spermatozoa morphologic features after staining or fixation. *American Journal of Veterinary Research*. 37: 1053-1057.
58. Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88: 343-352.
59. Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Soler C. 2008. Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science*. 103: 374-378.
60. Hidalgo OC, Tamargo MC, Díez MC. 2005. Análisis del semen bovino *Tecnología Agroalimentaria. Boletín informativo SERIDA - n.º 2 (2): 39-43.*

61. Hofmann N, Hilscher B. 1991. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Human Reproduction*. 6: 979.
62. Holt WV. 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animal*. 31: 17-24.
63. Holt WV, Van Look JW. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*. 127: 527-535.
64. Holt WV, Watson PF, Curry M, Holt C. 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different system used in a practical workshop. *Fertility and Sterility*. 62: 1277-1282.
65. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. 1996. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility*. 66: 634.
66. Januskaukas A, Gil J, Soderquist L, Haard M.G.M, Haard MCh, Johannisson A., Rodríguez-Martínez H., 1999. Effect of cooling rates of post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52: 641- 658.
67. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Pérez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 219-228.
68. Johnson L, Berndtson WE, Picket BW. 1976 An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*. 42: 951-954.

69. Ley-López A. 2012. Manejo sustentable del inventario de la extracción de ganado en México; abasto de carne para el mercado nacional. II Congreso Ganadero Bovinos Virbac, Jalisco, México.
70. López-Fernández C, Pérez-Llano B, García-Casado P, Sala R, Gosálbez A, Arroyo F, Fernández JL, Gosálvez J. 2008 Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science* 103: 87–98.
71. Liu Z, Foote RH, 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *Journal of Dairy Science*. 81: 1868-73.
72. Lin MH, Morshedi M, Srisombut C, Nassar A, Oehninger S. 1998. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertility and Sterility*. 70: 1148.
73. Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47 (2): 283-291.
74. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. 1998. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 69: 528.
75. Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C, Manjunath P. 2007. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biology of Reproduction*. 76: 424-432.
76. Marigorta del Val P, Pérez Gamelo S. 2008. Seminogramas. determinación de los parámetros cuantitativos y cualitativos del eyaculado. XXXI Curso Internacional de Reproducción Animal. Madrid. España.

77. Martín-Rillo S, de Alba-Romero C, Corcuera B, García-Artiga C, Lleó-Casanova B. 1999. Efecto del semen congelado porcino sobre el desarrollo embrionario. En: "II Congreso Ibérico de Reproducción Animal". Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones: 396-376
78. Martínez RV. 2007. Evaluación de la Trealosa sobre la viabilidad del espermatozoide criopreservado del ovino. Tesis de Licenciatura. UNAM. México D.F.
79. Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction*. Update 3: 403-439.
80. Moura AA. 2005. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. *Animal Reproduction*. 2 (1): 3-10,
81. Muiño R, Fernández M, Areán H, Viana JL, López M, Fernández A, Peña AI. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de Inseminación Artificial. *ITEA* 101(3): 175-191.
82. Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Peña AI. 2008. Effects of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*. 109: 50-64.
83. Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. 2007. Identification of sperm subpopulation with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109 (1): 27-39.
84. Munuce MJ, Caille AM, Berta CL, Perfumo P, Morisoli L. 2000. Does the hypoosmotic swelling test predict human sperm viability?. *Archives of Andrology*. 44: 207.
85. Noiles EE, Tompson KA, Storey BT. 1997. Water permeability, L_p of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly

- dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 35: 79-92.
86. Neild DM, Gadella BM, Cháves MG, Miragaya MH, Colenbrader B, Agüero A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 59: 1693-1705.
 87. NOM-027-ZOO-1995. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=514>. Última Actualización. Noviembre 2008. Consultado Abril 2010.
 88. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19 (4): 426-436.
 89. Palacios AA. 1994. Aspectos fisiológicos acerca de la congelación de semen. *Veterinaria México*. 25: 207-210.
 90. Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-22.
 91. Pérez GS. 2008. Estudio de parámetros seminales y conservación de esperma en animales salvajes. XXXI Curso Internacional De Reproducción Animal. Madrid. España.
 92. Pérez-Llano B, García Casado P, Sala Echave R, Enciso M, Gosálvez J. 2005. Acromax protects boar spermatozoa from DNA fragmentation. 7° Int. Conf. on Pig Reproduction. Kerkrade, Holanda. Abst.: 144
 93. Phillips NJ, Evans G, McGowan MR. 2004. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Australian Veterinary Journal*. 82 (5): 309-310.
 94. Posado R, Hernández M, García J, Bartolomé D, Olmedo S, Rodríguez L, López-Fernández C, Gosálvez, J. 2011. Evolución de la fragmentación

- del ADN en semen criopreservado de toros de lidia. Archivos de zootecnia 60(231): 441-444.
95. Pursel VG, Johnson LA. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology. 1 (2): 63-63.
 96. Pursel VG, Schulman II, Johnson LA. 1978. Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of guts after artificial insemination. Biology of Reproduction. 19, 69-76.
 97. Richardson GF, Donald AW, MacKInnon CE. 1992. Comparison of different techniques to determine the percentage of intact acrosomes in frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 38: 557-564.
 98. Rodríguez-Almeida F, Ávila Cota O, Anchondo Garay A., Sánchez-Ramírez B, Jiménez Castro JA. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. Agrociencia 42: 399-406.
 99. Rodríguez-Martínez, H., Larsson, B., Zhang, B.R., Söderquist, L., 1997. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. J. Reprod. Dev. 43, 1-11.
 100. Rodríguez-Martínez H. 2000. Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. Topics in Bull Fertility, P. J. Chenoweth. International Veterinary Information Service (www.ivia.org), Ithaca, Nueva York, USA.
 101. Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. 2008. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, ovino, equino, porcino, ovino y canino. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 55: 22-28.
 102. Saacke RG, White JM. 1970. Acrosomal alteration of freeze-thawed bovine sperm. Journal of Animal Science. 31: 229-230.

103. Saacke RG, White JM. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. NAAB. Proc. 4th Technical. Conference of AI and Reproduction. pp. 22-27.
104. SAGAR: Censo ganadero 1990. www.sagarpa.gob.mx
105. SAGARPA: Censo ganadero 2000. www.sagarpa.gob.mx
106. Saleh, R.A.; Agarwal, A.; Nelson, D.R. 2002. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*. 78: 313.
107. Saleh RA, Agarwal A, Sharma, RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*. 80: 1431.
108. Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR. 1978. *Fisiología de la reproducción artificial en los Bóvidos*. Acribia. 2ª. Edición. Zaragoza España.
109. Salomon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen I. progressing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 3-4 (37): 185-249.
110. Sánchez OH. 2000. Estado actual del procesamiento de semen bovino y la inseminación artificial en la República Mexicana. Tesis de Licenciatura. FMVZ. UNAM. México.
111. Schmidt H, Kamp G. 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*. 128: 171–179.
112. Shibahara H, Onagawa T, Ayustawati. 2003. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. *International Journal of Andrology*, 26: 236.

113. Sorensen AM. 1982. Reproducción Animal. Principios y Prácticas. Mc. Graw Hill Books U.S.A. 125-150, 129-132.
114. SPSS Version 16.0. 2007. SPSS Inc. Copyrigh 1989-2007. <http://www.winwrap.com>
115. Swanson Eric W, Bearden HJ. 1951. An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. Journal of Animal Science. 10: 981-987.
116. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. 2007. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. Reproductive BioMedicine Online. 14 (6): 746-757.
117. Therien I, Bousquet D, Manjunath P. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. Biology of Reproduction. 64: 41 –51.
118. Uwland J. 1984. Possibilities and limitations of semen evaluation for prognosis of male fertility. The male in farm reproduction. 269-325.
119. Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Biology of Reproduction. 59: 1-6.
120. Waterhouse KE, Gjeldnes A., Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Haard M, Kommisrud E. 2010. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. Animal Reproduction Science. 117: 34-42.
121. Watson PF, Plummer JM. 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. En: Johnson LA, Larsson K. Deep freezing of boar semen. Ed. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 113-127.

122. Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 7: 871-891.
123. White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development*. 5: 639-658.
124. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. 1994. En: Knobil E, Neill J. *The Physiology of Reproduction*. 3a. Ed. New York. Raven Press. 189 –317.
125. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. 75(4): 674-677.