

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN
FRAGMENTACIÓN DEL ADN, VIABILIDAD, MOTILIDAD Y
CINÉTICA ESPERMÁTICA EN TOROS BROWN SWISS
EMPLEANDO SISTEMA CASA”**

Presentada por:

MARTIN DANIEL ARBAIZA BARNECHEA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER
SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima – Perú

2020

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN FRAGMENTACIÓN
DEL ADN, VIABILIDAD, MOTILIDAD Y CINÉTICA ESPERMÁTICA
EN TOROS BROWN SWISS EMPLEANDO SISTEMA CASA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

MARTIN DANIEL ARBAIZA BARNECHEA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....

Ph.D. Edwin Alberto Mellisho Salas
PRESIDENTE

.....

Ms.Sc. Próspero Cabrera Villanueva
ASESOR

.....

Ph.D. Juan Chávez Cossío
MIEMBRO

.....

Ms.Sc. Enrique Alvarado Malca
MIEMBRO

DEDICATORIA

Dedicado con todo mi cariño y amor: A mi madre Cecilia Jesús Barnechea Maltesse, por su inquebrantable espíritu de lucha para sacarnos adelante día a día frente a las adversidades, por su apoyo incondicional y por nunca perder la fe en mi potencial, porque mientras exista alguien confiando en nosotros, siempre tendremos la fuerza para seguir, gracias por hacerme una mejor persona, por motivarme y por ser parte de mi vida.

Agradecimientos

A Dios, por iluminar mis pasos día a día y por darme siempre la fortaleza para seguir adelante, vencer los obstáculos de la vida y cumplir mis metas.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), por haberme otorgado la beca de estudios para la Maestría en Producción Animal, dándome con ello, los medios y la oportunidad de ejecutar la presente investigación.

A mi asesor, el Ing. Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva por sus consejos, su guía y su apoyo para el desarrollo de esta investigación dentro de las instalaciones del Banco Nacional de Semen de la Universidad nacional agraria la molina.

A toda mi Familia, mi madre Cecilia Jesús Barnechea Maltesse, mis hermanos Daryl Arbaiza Barnechea y Dany Arbaiza Barnechea, por darme aliento y la motivación para salir adelante les agradezco por ser parte de mi vida, ustedes son mi alegría y mi motivo para seguir creciendo profesionalmente.

A Stephane Gordillo Espinal por su constante motivación, comprensión y apoyo, incentivándome a perseverar frente a los obstáculos, porque cuando amas a una persona no importa con qué frecuencia la veas, lo importante son las veces que le haces saber que es especial para ti, todo mi cariño y mi amor para ti mi princesa.

A mi tía Sara Barnechea Maltesse, mi tío German Castro Rivera y mi prima Claudia Castro Barnechea, por confiar en mí, apoyarme y avalarme. Mi cariño y agradecimiento siempre con ustedes.

A Olga Maltesse mi Nona in memoriam, gracias por haber formado parte de mi vida siempre te llevo en mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
	2.1 Importancia de la ganadería.....	3
	2.2 Inseminación artificial.....	3
	2.3 Evaluación seminal.....	5
	2.3.1 Concentración espermática.....	5
	2.3.2 Motilidad y cinética espermática.....	6
	2.3.3 Morfología.....	7
	2.3.4 Viabilidad espermática.....	8
	2.3.5 Fragmentación del ADN espermático.....	9
	2.4 Criopreservación de espermatozoides.	18
	2.4.1 Criopreservación seminal.....	18
	2.4.2 Técnicas de criopreservación seminal.....	19
	2.4.3 Daño espermático.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
	3.1 Localización	23
	3.2 Animales	24
	3.3 Colección de semen	25
	3.4 Dilución seminal	25
	3.5 Evaluación de los parámetros seminales.....	26
	3.5.1 Volumen seminal.....	27
	3.5.2 Concentración espermática.....	27
	3.5.3 Motilidad espermática.....	27
	3.5.4 Viabilidad.....	30
	3.5.5 Fragmentación del ADN espermático.....	30
	3.6 Criopreservación seminal.....	33
	3.7 Análisis estadístico	34

IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
V.	CONCLUSIONES	44
VI.	RECOMENDACIONES	45
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
VI.	ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides 8

Tabla 2: Estadísticos descriptivos de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria la Molina	23
Figura 2: Toros raza Brown Swiss en brete de colección previo a la colecta.	24
Figura 3: Dilución seminal en baño maría con dilutor Andromed.....	26
Figura 4: Tubo graduado, para evaluación volumen.....	27
Figura 5: Evaluación concentración espermática fotómetro SD1M bovino maca Leaflet minitube.....	27
Figura 6: Tinción Hoeschst 333242/PI (Minitube, Germany)	30
Figura 7: Evaluación módulo de viabilidad sistema CASA Espermatozoides azules = Viables / Espermatozoides violetas = No viables.....	30
Figura 8: Kit Sperm-Halomax® y kit de fluorescencia Fluored® HT-RFS100	31
Figura 9. Evaluación módulo de fragmentación del ADN espermático sistema CASA Espermatozoides fragmentados = Presencia de halo / Espermatozoides no fragmentados = ausencia de halo	32
Figura 10: Evaluación de láminas de fragmentación espermática	33
Figura 11: Criopreservación pajillas semen.....	34
Figura 12: Análisis de Fragmentación de ADN utilizando módulo Androvision Sistema (C.A.S.A) A. Análisis de Espermatozoides vista simple contraste de fase vista 250X. B. Espermatozoides sometidos al tratamiento con el Kit Sperm-Halomax® y teñidos con el kit de fluorescencia Fluored® HT-RFS100 vista 250X C. Espermatozoides detectados con el modulo fragmentación, presencia de halo indicador de fragmentación de ADN espermática, espermatozoides sin halo normales, vista microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluoresence) objetivo fluorita vista 250X longitud de onda excitación a 300nm, emisión 595nm.....	36
Figura 13: Análisis de viabilidad espermática utilizando módulo Androvision Sistema (C.A.S.A) A. Análisis de Espermatozoides vista simple contraste de fase. B. Espermatozoides sometidos a la tinción Kit Hoechst 33342/PI Double Stain Apoptosis Detection C. Espermatozoides detectados modulo análisis viabilidad AndroVision en microscopio de fluorescencia, espermatozoides teñidos rojo (Muertos) ya que el colorante solo es permeable en células muertas, Espermatozoides azules (Vivos) vista microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluoresence) objetivo fluorita	

vista 250X, longitud de onda para el colorante Hoescht 33342 fluorescencia azul longitud de onda excitación a 350nm, emisión 461nm, y Yoduro de propidio (PI) fluorescencia roja longitud de onda excitación a 535nm, emisión 617nm.38

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para las diferencias de los parámetros seminales. En negrita se resaltan los parámetros no normales ($p > 0.05$).....	58
ANEXO 2: Parámetros descriptivos del promedio de las repeticiones obtenidas de las 76 colecciones de semen (Anibal n=18), (Bolt n=14), (Elipse n=10), (Ranger n=18), (San Martin n=16),	59
ANEXO 3: Prueba T para muestras relacionadas de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.002$. En negrita se resaltan los parámetros significativos. t = estadístico t. gl = grados de libertad. Sig = significancia.....	60
ANEXO 4: Prueba de rangos con signo de Wilcoxon de los parámetros seminales que no presentaron normalidad. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.025$. Z = estadístico Z. Sig = significancia.....	61
ANEXO 5: Microscopio de fluorescencia fragmentación AND espermático 250X Kit Sperm-Halomax® C y Tinción Fluored® HT-RFS100	61
ANEXO 6: Imagen del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (C.A.S.A) software AndroVision	62
ANEXO 7: Evaluación de láminas fluorescencia A. Láminas para con 8 pocillos para evaluación de fragmentación espermática Kit Sperm-Halomax® C B. 20 láminas evaluadas durante todo el procesamiento seminal antes y después de la congelación seminal.....	63
ANEXO 8: Evaluación de las muestras microscopios de fluorescencia.....	64

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, la viabilidad, y cinética espermática, mediante el sistema computarizado de análisis seminal (CASA), se colectaron 5 toros de la raza Brown Swiss ubicados en el Banco Nacional de Semen de la UNALM, se procesó y congeló los 76 eyaculados obtenidos. Para el análisis de la fragmentación del ADN se utilizó el Kit Sperm-Halomax® y para el análisis de la viabilidad espermática la tinción Hoeschst 333242/PI, se evaluó si existió un cambio significativo entre los valores antes y después de la criopreservación para cada uno de los parámetros seminales evaluados utilizando la prueba T de muestras relacionadas, previa verificación de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk en caso que los datos fueran no normales, se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se aplicó ajuste de Bonferroni para las comparaciones antes mencionadas. Todos los análisis se realizaron considerando 5 réplicas biológicas en el paquete estadístico SPSS v.23 con un 95% de confiabilidad. Se encontraron diferencias significativas en 16 de los 21 parámetros evaluados, se evidenció un aumento de la fragmentación del ADN del 3%, en el parámetro de viabilidad espermática se manifestó una disminución de los valores analizados. Se observó la disminución de los valores de los siguientes parámetros motilidad, motilidad progresiva, motilidad rápida, al igual que los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, STR, y un incremento en los valores de motilidad local y espermatozoides inmóviles, atribuidos al efecto de la criopreservación seminal.

Palabras claves: Criopreservación, Fragmentación del ADN, Viabilidad, Motilidad y cinética espermática.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of sperm cryopreservation on DNA fragmentation, viability and sperm kinetics using the computer-assisted semen analysis (CASA), 5 bulls of the Brown Swiss breed located in the National Semen Bank of the UNALM were collected, we proceeded to collect, process and freeze the 76 ejaculates obtained. For the analysis of DNA fragmentation the Sperm-Halomax® Kit was used and for the analysis of the sperm viability Hoeschst 333242 / PI stain, it was evaluated if there was a significant change between the values before and after the cryopreservation for each one of the seminal parameters evaluated using the T test of related samples, after verification of normality with the Shapiro-Wilk test in case the data were not normal, the Wilcoxon signed rank test was used. The Bonferroni adjustment was applied for the referred above comparisons. All the analyzes were made considering 5 biological replicas in the statistical package SPSS v.23 with a 95% reliability. Significant differences were found in 16 of the 21 parameters evaluated, an increase in DNA fragmentation of 3% was evidenced, in the sperm viability parameter a decrease in the analyzed values was manifested. The decrease in the values of the following parameters motility, progressive motility, rapid motility was observed, as were the kinetic parameters VCL, VSL, VAP, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, STR, and an increase in the values of local motility and immobile sperm, attributed to the effect of seminal cryopreservation.

Keywords: *Cryopreservation, DNA fragmentation, viability, motility and sperm kinetics.*

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversas técnicas para evaluar los parámetros seminales, desde lo más simple a lo más complejo, los métodos de análisis básicos incluyen el estudio del volumen seminal, concentración espermática, motilidad, viabilidad y morfología espermática, sin embargo; en la práctica se ha comprobado que eyaculados con valores aceptables en los parámetros citados presentan importantes variaciones en los resultados de fertilidad individual (Fatehi et al., 2005)

El estudio de la motilidad espermática se puede realizar por dos métodos el más utilizado es la valoración subjetiva que consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como, el tipo de movimiento que presentan de forma inmediata y económica (Gadea et al., 2004) Es de gran valor cuando lo realizan personas experimentadas, sin embargo, la exactitud y precisión están limitadas en función de las condiciones del sistema de medida y de la destreza del observador (Graham et al., 1980). El otro método, se basa en el uso de sistemas informatizados de digitalización de imágenes denominados C.A.S.A (Computer Assisted Motility Analysis) (Davis y Siemers, 1995). Capturan el movimiento espermático y permite analizar valores cinéticos de velocidad espermática aportando un gran volumen de información, siendo mucho más preciso al momento de la evaluación (Tuli et al., 1992).

Los problemas en la fertilidad animal abarcan un nivel mucho más profundo, estudio reciente han demostrado que uno de los factores asociados a una mala calidad seminal pudiera estar relacionado con altos porcentajes de fragmentación ADN espermático, ya que si bien espermatozoides con el ADN dañado son capaces de fecundar un ovocito y lograr una preñez a término, las consecuencias de esta concepción pueden ser observadas a largo plazo, tales como crecimiento anómalo, envejecimiento prematuro, tumores y abortos (Gonzales et al., 2016) este tiene un efecto negativo en la fertilización *in vivo* como *in vitro*. Niveles de fragmentación del ADN superior al 20% son

incompatibles con la concepción y el mantenimiento de la preñez (Karabinus et al., 1990). Para que el proceso reproductivo se desarrolle con éxito es necesario que la molécula de ADN del espermatozoide permanezca íntegra, sin la presencia de roturas en la doble hebra (Enciso et al., 2006) ocasionados aparentemente por la presencia de radicales libres de oxígeno, errores en la sustitución de histonas por protaminas, deficiencias en la recombinación, o la exposición a ciertos fármacos, contaminación atmosférica, fiebre alta (Carrel et al., 2007).

La evaluación de los parámetros básicos de calidad espermática no aporta información completa sobre la calidad del espermatozoide. Así pues, resulta prudente determinar si existe daño en el ADN, especialmente en los casos en los que los parámetros sistemáticos de rutina no hayan evidenciado ninguna anomalía obvia, se puede decir a ciencia cierta que mientras mayor sea el grado de fragmentación de ADN transmitido al embrión por el genoma del espermatozoide, más temprano se observará en el proceso de desarrollo embrionario y viceversa; en cambio, cuando menor sea el daño de ADN, más tarde se va a manifestar en el desarrollo embrionario y fetal

La presente investigación tiene como objetivo principal evaluar el efecto de la criopreservación en la fragmentación del ADN, la viabilidad y cinética espermática, en toros donadores de semen de la raza Brown Swiss, todas las evaluaciones se realizarán en un sistema computarizado de análisis seminal (CASA), siendo los objetivos específicos:

- a) Evaluar los niveles de fragmentación del ADN espermático mediante el Test de Dispersión de la Cromatina Espermática.
- b) Determinar la viabilidad espermática utilizando una tinción de fluorescencia Hoeschst 333242/Propidio iodado
- c) Caracterizar los parámetros de cinética espermática (VCL, VSL, VAP, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, STR, DCL, WOB y LIN)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de la ganadería

La población total de vacunos en el Perú se estima alrededor de 5,2 millones de cabezas. En donde el 63,9 por ciento de los vacunos son Criollos, siendo las razas predominantes Brown Swiss (17.6 por ciento), Holstein (10,3 por ciento) y Cebú (3,4 por ciento). El 73 por ciento se encuentra en la sierra, 12 por ciento en la costa y 15 por ciento en la selva (CENAGRO, 2012).

Del total de la superficie del territorio nacional (1 285 215,60 km²), de acuerdo al Censo Agropecuario del 2012, el 30,1 por ciento está dedicado al desarrollo de la actividad agropecuaria que, comparado con el Censo de 1994, este se ha incrementado en 3 360,7 miles de hectáreas, es decir, la superficie agropecuaria se amplió en 9,5 por ciento en los últimos 18 años (INEI 2012).

En referencia al impacto económico se ha observado un incremento en la demanda mundial de productos cárnicos derivados de la ganadería, con un ritmo anual de 1.3% entre 2007 y 2050 (Alexandratos y Bruinsma, 2012). En el periodo comprendido entre 2005 y 2017, la producción mundial de carne de bovino presentó un crecimiento promedio anual de 0.7% (OCDE- FAO, 2015).

La población de vacas en ordeño es 893,769 cabezas (MINAGRI, 2017), mostrando un ritmo de crecimiento anual de 1,9 por ciento (periodo 2007-2016). El consumo anual de leche es 87 kg/persona/año, habiendo mostrado un incremento anual de 2,88 por ciento periodo 2007-2016 (MINAGRI, 2017).

2.2 Inseminación artificial

La inseminación artificial ha tenido una gran importancia en el mejoramiento genético de los animales, especialmente en el ganado bovino donde su práctica se ha visto

indispensable para disminuir el intervalo generacional y promover el mejoramiento genético, mediante el uso de pajillas de semen congelado (McClure et al, 1994).

Las ventajas que podemos obtener mediante esta técnica, según Saacke (1994):

- Conservación prolongada de material fecundante de animales valiosos (pajillas crio preservadas de semen)
- Eliminar las limitaciones de manejo y/o sanitarias que impedirían la utilización de algunos individuos.
- Aceleración de la selección genética y transferencia de material genético entre ganaderías que se encuentren geográficamente distantes.
- Facilitar la comprobación de la descendencia.
- Obtención de beneficios económicos con la comercialización del semen.

Factores que afectan la técnica de inseminación artificial:

- El primero controlado por el hombre (técnico inseminador o por el encargado responsable de la inseminación); El segundo por factores asociados a la vaca (edad, raza, lactancias, etc.). los factores genéticos que afectan el temperamento interactúan de manera compleja para determinar cuánto miedo va manifestar el animal cuando se le maneje. El ganado vacuno, entrenado y habituado, puede tener niveles de cortisol normales y mantenerse en calma al ser inmovilizado; en tanto que otros animales, criados extensivamente, pueden tener niveles elevados de cortisol en la misma situación; los bovinos son muy sensibles a la aversión que provocan las distintas partes de los procedimientos de manejo (Buxadé et al, 1996). El tercer grupo está compuesto por factores ambientales (clima, manejo, etc.) Intensa reacción de estrés en animales muy agresivos y poco habituados a la interacción con el ser humano. Por último, factor toro su calidad seminal; Alta variabilidad en la calidad seminal, entre sementales y entre eyaculados, está comprobado que a una mayor frecuencia de colección disminuirá el volumen del eyaculado obtenido, también influido por factores climáticos, estrés y aptitud genética) (McClure et al, 1994); Baja calidad seminal por el proceso de congelación y descongelación, lo que provoca un daño irreversible en aproximadamente el 50% de los espermatozoides de cada dosis. El estrés

ocasionado por el congelamiento seminal produce una contracción celular que puede causar la pérdida irreversible de la membrana y la alteración del citoesqueleto y de los organelos. La célula puede verse afectada por las altas concentraciones de solutos en las partes no congeladas del espacio extracelular que dañan la membrana, por cambios en el pH y desnaturalización de proteínas (Watson, 1995; Holt, 2000);

En resumen, la inseminación artificial frente a la monta natural se utiliza mayoritariamente en el sector vacuno de aptitud lechera, donde más del 80% de los apareamientos se realizan con esta técnica (Buxadé et al, 1996).

2.3 Evaluación seminal

2.3.1 Concentración espermática

La concentración media para el ganado bovino es entre 300-800 millones de espermatozoides/ml, pero existe una alta variabilidad entre toros, e incluso entre distintos eyaculados de un mismo animal (Hafez, 2000). En animales jóvenes entre 1 a 2 años se estima un volumen de 2 ml por eyaculado y entre 4 y 12 ml en animales adultos (Vejarano, 2005).

Existen dos métodos para evaluar la concentración seminal el método directo e indirecto;

Método directo, el uso de cámaras de recuento celular como la de Bürker®, Neubauer® o Makler® (Woelders et al, 1990), se lleva a cabo mediante contaje en un microscopio óptico con el que se examina la muestra de semen previamente diluida, utilizando un contador manual, el contaje se realiza contando todos los espermatozoides que se encuentran dentro de todos los cuadrados de la cámara o contando aquellos que están en los cuadrados externos y centrales, se cuentan ambos lados de la cámara celular y finalmente se calcula el promedio de ambos lados (Hafez, 2000)

Método indirecto, La espectrofotometría es la técnica más empleada tanto en condiciones de campo como en centros de inseminación, por su rapidez, simplicidad y coste, este método mide la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión

o los espermatozoides, esta medición de la densidad óptica de la muestra es comparada frente a una curva estándar patrón previamente calibrada (Olegario et al, 2007).

2.3.2 Motilidad y cinética espermática

Este parámetro de motilidad es fundamental para el transporte espermático y la capacidad de penetración del ovocito, sin embargo este no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, pero refleja una de las funciones primordiales del espermatozoide, la actividad flagelar (Ormachea et al, 2019)

El estudio de la motilidad espermática se puede realizar por dos métodos, el más utilizado es la valoración subjetiva (Ormachea et al, 2019); que consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como, el tipo de movimiento que presentan, es factible de realizar de forma inmediata y económica. Es de gran valor cuando lo realizan personas experimentadas, sin embargo, la exactitud y precisión están limitadas en función de las condiciones del sistema de medida y de la destreza del observador (Graham et al., 1980);

- Motilidad masal: movimiento de superficie que refleja el vigor de las ondas que produce la masa espermática en movimiento;
- Motilidad individual: se observa el porcentaje de espermatozoides móviles de una muestra y la calidad del movimiento en semen puro;
- Motilidad progresiva: es el porcentaje de espermatozoides con movimiento de avance.

El otro método, se basa en el uso de equipos que utilizan sistemas informatizados de digitalización de imágenes denominados CASA (Computer Assisted Motility Analysis) (Davis y Siemers, 1995). Estos capturan el movimiento espermático y lo analizan, aportando un gran volumen de información (Ormachea et al, 2019).

Los sistemas CASA reflejan una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo. Los parámetros evaluados en las muestras seminales se caracterizan por una serie de parámetros globales (Amann et al, 2004);

Entre ellos encontramos el porcentaje de espermatozoides inmóviles, lentos, medios, rápidos y progresivos. Además, otros parámetros definen la cinética de cada espermatozoide como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad media (VAP) y la velocidad rectilínea (VSL), los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y de oscilación (WOB), obtenidos de las variables anteriores, la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de cruces sobre la trayectoria media (BCF). Estos parámetros cinéticos serán descritos en el apartado 3.4.3 (Material y Métodos).

Para conocer qué método es más objetivo, Januskauskas et al, (2001) analizaron la motilidad post-descongelación con la valoración subjetiva y el análisis informatizado; sin embargo, los resultados no difirieron significativamente. En ambos casos hubo correlaciones positivas entre motilidad y fertilidad.

2.3.3 Morfología

Este análisis de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del seminal. Las anomalías se producen por una espermatogénesis defectuosa, consecuencia de la herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Barth et al, 2000).

Las anomalías del espermatozoide han sido tradicionalmente clasificadas en función de:

- La morfología: cabeza, cola, pieza intermedia y presencia de gotas citoplasmáticas. (acúmulos de citoplasma no reabsorbido en el proceso de maduración del espermatozoide) (Barth et al, 2000).
- La importancia: defectos mayores y menores (Blom et al, 1983).
- El origen: primarias, originadas durante la espermiogénesis en el testículo y secundarias: originadas en el epidídimo o post eyaculación (Barth et al, 1989).

La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que hay entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto

morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo* de los sementales lo cual se ha correlacionado significativamente (Söderquist et al, 1996).

Se pueden utilizar técnicas de valoración subjetiva con diversas tinciones (Eosina-Nigrosina, Papanicolau, Giemsa, Diff-Quik), por fijación con glutaraldehído o formaldehído de la muestra y la valoración por microscopía de contraste de fases.

Indistintamente de su clasificación, generalmente se acepta que no deben existir más de un 30% de anomalías morfológicas en los recuentos efectuados (Barth, 2000).

TABLA 1. Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides adaptado y actualizado de “XX Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa”. Fuente: Barth y Oko (1989)

PRIMARIAS		
Anormalidades de cabeza	Anormalidades de cuello	Anormalidades de la cola
Cabezas gigantes	Unión del cuello fuera del eje (descentrado)	Cola corta (defecto de la cola en muñón)
Cabezas pequeñas	Cuello doble	Colas abaxiales, accesorias o múltiples
Cabezas periformes	Cuello en espiral	Pieza media doblada, hinchada, abaxial, incompleta
Cabezas cónicas y estrechas	Cuello deshilachado, granular o hinchado	Aplasia segmentaria de la pieza media y defectos de la vaina mitocondrial
Anormales desprendidas		Gota citoplasmática proximal
Formas teratoides		Defecto Dag
Defectos de acrosoma		
Vacuolas nucleares		
Condensación anormal del ADN		
SECUNDARIAS		
Anormalidades de cabeza	Anormalidades de la cola	Otras células
Cabezas normales desprendidas	Pieza media distal doblada	Células epiteliales
Acrosoma roto, deforme o desprendido	Pieza principal doblada	Eritrocitos
	Pieza principal doblada por shock hipotónico	Formaciones de medusa
	Gota citoplasmática proximal y distal	Células precursoras de esperma
		Células redondas
		Glóbulos blancos

2.3.4 Viabilidad espermática

Esta refleja el grado de integridad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides, existe una alta correlación entre el número de células viables en una dosis de semen y su capacidad para fecundar a los ovocitos (Shannon y Vishwanath, 1995; Des Daas et al., 1992).

La criopreservación del semen produce un estrés térmico que afecta la membrana del espermatozoide (membrana plasmática, membrana externa del acrosoma y membranas

mitocondriales), produciendo modificaciones en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica, causando daño irreversible, y afecta la motilidad y supervivencia espermática (Watson et al, 1995).

En la actualidad se utilizan técnicas más precisas para valorar la viabilidad espermática que emplean un marcaje fluorescente del ADN, el estudio de determinadas enzimas intracitoplasmáticas o la medición del potencial de membrana. (Cross et al, 1986) el fluorocromo específico del ADN Hoechst 33258. Este fluorocromo penetra en aquellas células espermáticas cuya membrana está dañada, fijándose al ADN espermático e incrementando la fluorescencia de estos espermatozoides (Cross et al, 1986).

Respecto a la valoración de la viabilidad espermática, este ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados debido a que juega un papel clave en la fecundación (Cabrera et al, 2012), gracias a que solo los espermatozoides que son viables podrán realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito y, como consecuencia, fusionarse con éste para formar un embrión (Januskauskas et al ,2001).

2.3.5 Fragmentación del ADN espermático

Se identificó por primera vez, en toros con baja fertilidad, en 1966, al comprobar mediante la reacción de Feulgen, que los espermatozoides presentaban el complejo ADN-proteína anormal. La coloración intensa de la cabeza del espermatozoide, se asociaba a una alta densidad de ADN por una compactación elevada de la cromatina y por ende a una menor sensibilidad a la hidrólisis y viceversa.

Posteriormente, Calvin y Bedford (1971) relataron el papel que jugaban los puentes disulfuro en la compactación de la cromatina de los espermatozoides y las diferencias existentes con respecto a la línea somática. Estos estudios fueron cobrando más interés, cuando se comenzó a asociar problemas de infertilidad inespecífica con alteraciones de la estructura del núcleo del espermatozoide (Evenson et al., 2002).

Actualmente está totalmente demostrado que la fragmentación del ADN espermático presenta una alta correlación con la infertilidad masculina. Diferentes autores proponen

que, si el IF de una muestra seminal supera el 30%, la fertilidad de ese eyaculado está muy comprometida (Evenson et al., 2002). También afecta a la fertilización del ovocito, a la calidad del embrión, a su desarrollo hasta blastocisto, e incluso a la implantación, siendo una de las causas principales de pérdidas embrionarias tempranas por desarrollo anormal embrionario.

Sin embargo, existen mecanismos de reparación de la célula espermática con ADN fragmentado de manera que puede ser reparado, reparado de forma aberrante o no ser reparado. En todos los casos, puede tener capacidad para fertilizar el ovocito. (Yoshii et al., 2005).

Los mecanismos de reparación pueden activarse durante la espermiogénesis, una vez que el ovocito ha sido fertilizado, en el cigoto, durante el desarrollo embrionario y antes o después de la implantación del embrión. Pero únicamente pueden reparar una cantidad limitada de daño en el ADN espermático.

Si durante la espermiogénesis, las roturas en el ADN celular persisten, pueden conducir a la inestabilidad genómica y las células podrían sufrir apoptosis para prevenir la acumulación potencial de mutaciones tumorigénicas. Si la respuesta al daño falla, aparecerán de nuevo esas mutaciones condicionando la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares, pudiendo ser transmitidas en el momento de la fecundación y provocar una pérdida de funcionalidad celular, incompatible con la formación de un embrión normal y el desarrollo fetal (Evenson et al., 2002).

En respuesta al daño en el ADN, la integridad del genoma es controlada por una red celular muy sofisticada, donde tres complejos de proteínas distintos, actúan como sensores, transductores y efectores de esta respuesta. Los componentes de estos tres complejos, actúan recíprocamente entre sí y consiguen resultados diferentes dependiendo de la severidad del daño y del tipo de célula. De no ser reparadas, las roturas persistirán y una vez que el espermatozoide alcanza la madurez, la reparación del daño en el ADN ya no será posible (Evenson et al., 2002).

Si el daño en el ADN no se repara, o si sucede en el espermatozoide por factores extrínsecos, el daño puede ser reparado durante la fertilización, dependiendo del nivel de fragmentación de ADN que presente, pueden darse tres situaciones:

1. El ovocito es capaz de reparar las roturas de la molécula de ADN del espermatozoide antes de iniciar la primera división celular. Se cree que la reparación de ADN en el embrión recién fertilizado, es debido al ARNm materno y a las proteínas depositadas y almacenadas en el ovocito antes de la ovulación. Los genes de reparación del ADN, se expresan en las primeras etapas del desarrollo. Durante la formación del cigoto también existen mecanismos de reparación, pero vinculados a la transición de la expresión génica reparadora de la madre, antes de la formación del genoma embrionario (Derijck et al., 2008).
2. La maquinaria de reparación del ovocito no es suficiente para reparar el daño, o si la expresión génica del cigoto no comienza en el tiempo correcto, el embrión puede fallar en su desarrollo, en la implantación o puede ser abortado naturalmente en una etapa posterior (Acton 2004).
3. El ovocito realiza una reparación parcial. Esto da lugar a errores en la secuencia de ADN que pueden dar lugar a un descendiente anormal. Se ha postulado, la posible presencia de daño en el ADN en embriones generados *in vivo* e *in vitro*, para explicar el fracaso en su desarrollo después de la implantación de embriones con cariotipos normales. Otros estudios, sugieren que durante la preimplantación también hay pérdida de embriones, entre la activación del genoma postembrionario y la etapa de blastocisto (Ñunez et al., 2012). Otros proponen que, este tipo de daño puede ser expresado durante y/o después de la implantación y ha sido caracterizado como el efecto paterno tardío (Spano et al., 2000). Esto se corrobora con los fracasos en la obtención de blastocistos al utilizar muestras espermáticas con altos niveles de daño en el ADN (Shimada et al., 2000). Pero la situación más grave puede suceder durante la embriogénesis, por los errores derivados del daño en el ADN, durante la replicación, la transcripción

y la traducción del ADN, contribuyendo al desarrollo de futuras enfermedades que afectarán no sólo al futuro individuo sino a las generaciones siguientes (Aitken et al., 2009).

En el mundo animal, también se correlacionan las alteraciones de la cromatina con la infertilidad en la especie bovina (Ballachey et al., 1987; Karabinus et al., 1990), caprina y porcina. Valores por debajo de un 15-20% de fragmentación del ADN espermático, no experimentarían retrocesos apreciables en la fertilidad en bovino y porcino. En semen fresco de verraco (Ardon et al., 2008) concluyeron que la probabilidad de que el espermatozoide con cromatina inestable alcance el huevo y lo fertilice, es baja y para los equinos, la integridad de la cromatina junto con las anomalías del espermatozoide serían los parámetros más útiles a la hora de predecir la capacidad fecundante. Por otra parte, experimentos realizados por fecundación *in vitro* (FIV) utilizando espermatozoides de toro con daño severo en su ADN provocado por radiaciones gamma (10 Gy) demostraron que el espermatozoide permanecía intacto funcionalmente a nivel de membrana, de organelas y de motilidad (Fatehi et al., 2005), presentaban normalidad en la unión a la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación y las tasas de ovocitos fertilizados, permanecieron normales. Sin embargo, los embriones obtenidos murieron por apoptosis durante la etapa de 4 a 8 células, debido a una expresión defectuosa del genoma.

Estructura de la cromatina espermática

La cromatina es una estructura sumamente organizada y compacta, compuesta de ADN y nucleoproteínas heterogéneas (Orfaly et al, 2009). Organización que permite, la replicación del ADN de forma adecuada, para que la información genética sea transmitida de manera estable a la próxima generación (Enciso et al, 2011).

En las células somáticas de los mamíferos, el ADN rodea los octámeros de histonas, organizando los nucleosomas que a su vez forman solenoides, lo cual conduce al superenrollamiento del ADN; sin embargo, el espermatozoide, tiene una estructura nucleoproteínica muy específica (Fernández et al 2007) formada por ADN y proteínas básicas, distintas a las histonas, denominadas protaminas, necesarias para mantener la capacidad de fertilización (Fuentes et al. 2000). Las protaminas están involucradas en el empaquetamiento final del ADN espermático y en la condensación apropiada, lo que

probablemente estabiliza el ADN y lo hace menos vulnerable frente a cualquier tipo de daño (Brewer et al., 1999). Algunas especies de mamíferos presentan sólo un tipo de protamina mientras que en otras existen dos tipos: Protamina 1 (PRM1 o P1) y Protamina 2 (PRM2 o P2), se ha descrito la familia de la protamina 1 (P1) en todos los mamíferos (McKay et al., 1985) y la familia P2 (formada por un compendio de otras protaminas) presente en los primates y roedores (Biegeleisen,). El esperma de caballo, lagomorfos y proboscidos, contiene la protamina P2 procesada (Balhorn, 2007; McKay et al., 1985). Y en el toro y el verraco está presente el gen para la protamina P2, que parece disfuncional o produce una proteína aberrante (Balhorn, 2007). Variaciones en la expresión de las protaminas han sido asociadas con la infertilidad masculina.

Normalmente las familias de protaminas P1 y P2 aparecen en una proporción P1/P2 que varía dentro de los mamíferos euterianos (Corzett et al., 2002). Se expresan en una proporción 1:1 en esperma humano, y en ratones la cantidad de P2 duplica la de P1 (2:1) (Corzett et al., 2002) proporcionando un embalaje adecuado del ADN espermático. La desestabilización de la proporción P1/P2 está altamente correlacionada con el incremento de la fragmentación del ADN espermático, generando fallos en la fertilización, mala calidad embrionaria y tasas bajas de embarazo (Aoki et al., 2005) Durante la espermatogénesis los espermatozoides sufren un proceso de maduración en el epidídimo y se produce el cambio de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides (Saacke et al., 1994). Este proceso de maduración con lleva el empaquetamiento de la cromatina nuclear y la adquisición de la motilidad espermática. El núcleo de la espermátida va a sufrir alteraciones complejas, de tipo bioquímico y fisiológico, así como cambios drásticos en su morfología, tamaño y condensación (Kierszenbaum et al, 2001).

La estabilización del núcleo espermático sucede durante las dos últimas fases de transición de la espermátida, proceso en el que las actividades de transcripción y reparación están inactivadas (Kierszenbaum, 2001; Foresta et al., 1989). Entre los cambios en el complejo ADN-proteína destacan la eliminación de la organización nucleosomal de la cromatina y la adquisición de una conformación toroidal fuertemente empaquetada que puede contener hasta 60 Kb de ADN, unas seis veces más compactado que en el cromosoma mitótico (Fuentes et al., 2000). Las histonas sufren una hiperacetilación, siendo sustituidas por unas variantes específicas de las histonas y

reemplazadas por las proteínas nucleares de transición. Posteriormente, las protaminas 1 y 2, sustituirán a las proteínas de transición, interaccionando con el ADN y compactándolo de nuevo por puentes disulfuro covalentes intra e intermoleculares que estabilizarán rígidamente la estructura impidiendo la expresión génica (Bellve et al, 1975).

Durante el cambio en el complejo ADN-proteína, aparecen roturas endógenas y transitorias de cadena simple o cadena doble cuya función, es la eliminación del superenrollamiento (Evenson et al., 2002). Una vez que la protaminación se completa, estas “roturas biológicamente correctas” serán reparadas por tres complejos de proteínas altamente especializadas (Jackson et al, 2011).

Una vez que se produce la penetración del espermatozoide en el ovocito, éste debe remodelar la cromatina condensada del espermatozoide en su forma activa y accesible. De nuevo, este cambio, implica un proceso estricto secuencial de descondensación, que es iniciado por la pérdida de las protaminas nucleares y el reemplazo por las histonas. (Shimada et al., 2000). Finaliza una vez que las histonas vuelvan a provocar el superenrollamiento del ADN (Evenson et al., 2002).

En resumen, la capacidad funcional del espermatozoide incluye una correcta condensación cromatínica durante la espermiogénesis, la estabilización de la cromatina durante la maduración espermática epididimaria y después de la penetración dentro del ovocito, la descondensación correcta tras la fecundación (Hingst y Blottner, 1995).

Causas de la fragmentación del ADN

Durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo se pueden producir roturas endógenas de la molécula de ADN en los espermatozoides, por:

- Errores durante la recombinación celular: Una vez que se producen las roturas programadas genéticamente en la molécula de ADN, a veces, se originan enlaces cruzados no programados de ADN-ADN y ADN-proteína en la cromatina compactada de los espermatozoides maduros, provocando un superestabilización que impide la descondensación de la cromatina (Bennetts et al., 2008);

- Maduración espermática anormal: Durante la eliminación del superenrollamiento de la fibra de ADN, las roturas “biológicamente correctas”, no son reparadas y aparecen en el eyaculado espermatozoide con fragmentación en su ADN (Evenson et al., 2002);
- Protaminación deficiente: las deficiencias en la expresión de protaminas durante la espermiogénesis, se han asociado con niveles elevados de fragmentación del ADN espermático e infertilidad humana. Se ha descrito que las proporciones P1/P2 distintos a 1, proporciones anormalmente elevadas o reducidas de P1/P2 o alteraciones en la expresión de P1 o incluso la ausencia completa de P2, pueden dar lugar a daños en el ADN espermático en humanos (Balhorn, 2007; Aoki et al., 2005).

Técnicas para evaluar el daño en el ADN

El estudio de la fragmentación del ADN espermático se puede realizar mediante el empleo de diferentes técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN.

Inicialmente, se utilizaron pruebas con colorantes fluorescentes que actualmente son poco utilizadas, o bien en algunos casos, controvertidas y son las siguientes:

- Naranja de Acridina (AO), es un fluorocromo que distingue entre roturas simples y dobles de los ácidos nucleicos.
- Azul de Toluidina (AT), señala la persistencia de las histonas.
- Cromomicina A3 (CMA), señala la deficiencia de protaminas.

Actualmente las técnicas más innovadoras se basan en dos estrategias diferentes para estudiar la fragmentación del ADN espermático:

La primera estrategia incluye las metodologías que implican el marcaje de roturas de cadena sencilla y de cadena doble de la molécula de ADN *in situ*, que se registran de forma natural o fortuita. Se utilizan procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos modificados sobre los espermatozoides fijados en un portaobjetos (Cortés et al., 2007). En este grupo se incluyen:

- TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling, por marcado del extremo libre utilizando una transferasa terminal (Waterhouse et al., 2006).
- *In Situ* Nick Translation (ISNT), por marcado del extremo terminal 3- OH utilizando un ADN polimerasa (Gorczyca et al., 1993).

La segunda estrategia incluye aquellas técnicas que miden la capacidad de la cromatina y en particular del ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos (Cortés-Gutiérrez et al., 2007). En este grupo se incluyen:

- Test de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersión) (Fernández et al., 2003, 2007).
- Ensayo de Cometas.
- Ensayo de estructura de la cromatina (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson et al., 1980).
- Test de detección de la rotura del ADN mediante hibridación fluorescente *in situ*. (DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence *in situ* Hybridization).

Metodología para la detección del daño en el ADN espermático

El Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) (Fernández et al., 2007) está basado en la respuesta diferencial de la fragmentación o no, del núcleo del espermatozoide a un tratamiento de desproteización mediante una solución de lisis específica. Una vez extraídas las proteínas, los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran grandes halos alrededor del núcleo del espermatozoide.

Se ha ensayado con éxito para la determinación de la fragmentación del ADN en humana (Fernández et al., 2003) y en otras especies como: verraco, toro, carnero, etc. La técnica, es versátil, está comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia o de campo claro, valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina. Sólo requiere que los espermatozoides se incluyan en microgeles de agarosa y sean sometidos a una solución de lisis apropiada (Fernández et al., 2005).

La principal ventaja de esta técnica es la simpleza en su ejecución, y no requiere un equipo complejo, ni personal especializado en la interpretación de los resultados.

La comparación de los resultados obtenidos del test SCD, muestran una correlación positiva con otras metodologías, tales como el SCSA o el TUNEL (Fernández et al., 2005).

Fernández et al. (2017) en su investigación utilizando la técnica de dispersión de la cromatina (SCD) identifica 5 tipos de espermatozoides según su clasificación: a) con halos grandes cuando el ancho del halo es mayor o similar al diámetro del núcleo evaluado b) con halos medianos, cuando el tamaño del halo se encuentra entre el halo grande y el tamaño muy pequeño, c) con halo muy pequeño, cuando el ancho del halo es igual o menor a una tercera parte del diámetro mínimo del núcleo, d) sin halo o degradado y e) similar al anterior pero con una tinción más débil o irregular, esta clasificación permite identificar y clasificar los espermatozoides fragmentado de manera que se pueda identificar visualmente mediante una observación subjetiva de acuerdo al evaluador.

En la investigación de Ming-Huei Lin (2008), observo que la incidencia de abortos estaba relacionado directamente a la estabilidad del ADN cuando esta superaba el 15% en un grupo de FIV, pero no cuando utilizaban la técnica de ICSI. Al parecer las tasas de aborto mediante esta técnica de ICSI no parecían estar relacionadas con la fragmentación espermática, por lo que en su investigación concluye, que ICSI aparentemente compensaba las anomalías funcionales espermáticas asociadas al daño en el ADN, esto fue posible a que el esperma morfológicamente maduro fue seleccionado para inyectar mediante esta técnica directamente al ovocito. Se observó en esta investigación un índice de fragmentación en las muestras de (>27%) lo que se asoció con un mayor índice de abortos espontáneos, aunque no se encontraron significación estadística.

Saleh y Agarwal (2012) determinaron que la integridad del ADN podría ser un marcador más objetivo que la viabilidad espermática, e incluso que los análisis convencionales utilizados de rutina, en cualquier laboratorio de procesamiento seminal, debido a que los espermatozoides de los individuos estériles presentan más daño en el ADN que los espermatozoides de individuos fértiles, por lo que cuanto más espermatozoides presente

daño en el ADN menor será la probabilidad de llegar a un embarazo natural y de que este llegue a término de manera exitosa.

Enciso et al. (2011) evaluaron la fragmentación del ADN en espermatozoides de toro, utilizando una variante específica del test SCD Sperm-BosHalomax (ChromaCell SL, Madrid, España) trabajaron con 17 muestras de semen descongelado de toros Holstein Friesian sanos y sexualmente maduros de un centro de inseminación artificial de Buenos Aires (Argentina). Identificaron que los espermatozoides bovinos originan dos tipos de núcleos espermáticos. Algunos espermatozoides liberan los bucles de ADN formando grandes halos de cromatina dispersa, mientras que otros, se producen halos de dispersión de la cromatina muy pequeños, Obtuvieron un índice de fragmentación medio calculado mediante el test SCD ($11,35\% \pm 2,81\%$) (media \pm error estándar);

Parámetros adicionales fueron evaluados la concentración, la motilidad, la morfología, la integridad de la membrana plasmática, la viabilidad y la integridad acrosómica. Al comparar los índices de fragmentación con los resultados del espermograma, se encontró que no existían correlación significativa entre la fragmentación espermática y ninguno de los parámetros seminales evaluados. Se halló que la viabilidad se correlacionó de manera significativa (Rho de Spearman, $p < 0.05$) con la integridad acrosómica, la integridad de la membrana plasmática y la motilidad progresiva. La integridad de membrana se correlacionó de manera significativa (Rho de Spearman, $p < 0.05$) con la integridad acrosómica y la motilidad progresiva. El principal objetivo de los protocolos de criopreservación es obtener mejores resultados en relación

2.4 Criopreservación de espermatozoides.

2.4.1 Criopreservación seminal

El principal objetivo de los protocolos de criopreservación es obtener mejores resultados en relación con la supervivencia espermática y la fertilidad seminal al descongelamiento, esto permite el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas, por lo que es posible ralentizar el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo potencialmente fértil en el tiempo, durante este proceso los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, lo que puede inducir en la célula espermática, daños en su integridad que comprometan su integridad (Choez, 2010)

2.4.2 Técnicas de criopreservación seminal

Existen dos técnicas de criopreservación: congelamiento estándar o congelamiento lento y la vitrificación. Aunque estos métodos son muy diferentes ambos pueden producir resultados exitosos en la criopreservación de las células. El éxito dependerá de la elección del método y dilutores adecuados. (Mellisho et al. 2006).

La congelación por enfriamiento lento involucra el uso de soluciones con baja concentración de crioprotectores y bajas tasas de enfriamiento. Las células se deshidratan durante el proceso de enfriamiento. El daño celular durante este proceso puede ocurrir debido al shock osmótico, formación de cristales de hielo o toxicidad de los crioprotectores (Mellisho et al. 2006).

La formación de cristales de hielo en la célula, incrementarán la presión osmótica en el medio externo, con lo que se producirá el intercambio de agua, la variación de la concentración de sales intra y extracelular conforme se enfríe el agua, y el descenso de la temperatura propiciará el desequilibrio proteínico. Así, los índices de congelación demasiado rápidos causan daño estructural por la formación de hielo intracelular. Los daños en la mayoría de las células ocurren principalmente, durante el proceso de congelamiento/descongelamiento. (Crabo. 2001).

2.4.3 Daño espermático

Shock térmico

Los espermatozoides sufren una pérdida de viabilidad debido al shock térmico, evento que ocurre cuando el descenso de temperatura durante el congelamiento seminal, este produce cambios en la función y estructura de la célula, lo que ocasiona pérdida de motilidad espermática (White et al. 1993). La disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana son también otras lesiones causadas por el shock térmico (Watson, 1981).

Según White (1993) el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico durante su maduración en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto, durante el proceso de maduración el espermatozoide adquiere la motilidad, pero también la susceptibilidad al shock térmico. La susceptibilidad al shock térmico es variable con respecto a las especies,

los espermatozoides de toro, carnero y de cerdo están considerados entre los más sensibles, pues presentan marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de Ca^{2+} y pérdidas de K^{+} y Mg^{2+} al ser expuestos al choque térmico.

Lesiones de la cromatina espermática

El estado físico de la cromatina espermática es crítico a la hora de proporcionar un buen empaquetamiento, protección del ADN espermático y capacidad de descondensación tras la fecundación. Se ha demostrado que altos niveles de daño en la cromatina afecta al éxito reproductivo, en condiciones naturales y con técnicas de reproducción asistida (Larson et al., 2000). La inestabilidad cromatínica podría retrasar la formación nuclear paterna, la calidad embrionaria, la proporción de blastocistos, la implantación y el éxito en el fecundación o preñez (Evenson et al., 2002). En animales, cuando se ha inducido daño en el ADN de la línea germinal paterna, se ha encontrado una fuerte asociación entre este daño y el desarrollo embrionario incluyendo efectos sobre las nuevas generaciones nacidas y subsecuentes (Fernández-González et al., 2008). Se ha demostrado que determinados factores extrínsecos también dañan a la molécula de ADN, tales como, la abstinencia sexual durante un periodo de tiempo largo, la edad (Mandal et al., 2010), los componentes del diluyente seminal y las condiciones de almacenamiento (Waterhouse et al., 2010).

Determinadas situaciones clínicas, también pueden dañar el núcleo espermático, como el criptorquidismo, la orquitis, el varicocele, el cáncer, la fiebre elevada infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* spp. Infecciones de tipo vírico, leucocitospernia, enfermedades inflamatorias del tracto genital, hipertermia testicular presencia de bacterias en el eyaculado, como *Micoplasma* spp y elevados niveles de zinc en la dieta (Enciso et al. 2006). También se ha demostrado que provocan inestabilidad cromatínica, algunos quimioterápicos del tipo ciclofosfamidias, la exposición a organofosforados, las radiaciones ionizantes, los rayos gamma, los rayos X el uso de ciertos fármacos y drogas, la contaminación, el tabaquismo y algunos tóxicos químicos como la triethlenemelamina y el methyl methanesulfonato (Meseguer et al., 2008).

Tal como han propuesto diversos autores, probablemente existen muchos más mecanismos, actualmente desconocidos, por los que se puede fragmentar el ADN (Evenson et al., 2002).

Estrés oxidativo

Estudios recientes confirman la asociación entre el estrés oxidativo y la infertilidad. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) ejercen un papel importante en la fisiología de los espermatozoides y, por lo tanto, son imprescindibles para su correcta funcionalidad. Fisiológicamente hablando, los ROS controlan la maduración, capacitación e hiperactivación del espermatozoide, además de intervenir en la reacción acrosómica y fusión del espermatozoide al óvulo. Pero si el equilibrio entre ROS y antioxidantes se rompe, afectará tanto a las características que regula ya comentadas anteriormente, como a la concentración, morfología y motilidad, induciendo LPO, daño al DNA y apoptosis.

Se ha determinado que el estrés oxidativo es una de las mayores causas de infertilidad masculina, estando presente en niveles aumentados en el plasma seminal en un 30 % a 40 % de estos pacientes. (Saleh y Agarwal 2002).

Los espermatozoides de los mamíferos producen radicales libres de oxígeno, necesarios para modular la proliferación, diferenciación y función celular normal, como la capacitación y la reacción acrosómica, pero el aumento de la concentración del metabolito puede modificar las funciones celulares y/o poner en peligro la supervivencia celular. Los daños derivan de la depleción del ATP, lo que conduce a, una fosforilación insuficiente del axonema del espermatozoide, a la peroxidación lipídica, pérdida de motilidad, pérdida de viabilidad y daños en la molécula de ADN (Saleh y Agarwal 2002).

Morte, (2008) evidencio una correlación positiva entre los niveles de oxidación de lípidos y proteínas en los espermatozoides y en el plasma seminal, con la presencia de defectos severos en la función de los espermatozoides de equinos subfértiles, indicando que la oxidación de lípidos y proteínas podría ser útil para la identificación de machos con problemas de fertilidad. Se produce principalmente por la presencia de espermatozoides inmaduros, de células epiteliales del epidídimo, por la presencia de leucocitos y por fallos en la capacidad antioxidante, perjudicando la integridad del ADN y su capacidad de fertilización.

Watson, (1995). En su investigación corrobora la existencia de una correlación positiva entre altos porcentajes de gotas citoplasmáticas en el eyaculado y la desnaturalización

del ADN de los espermatozoides. Yoshii et al. (2005). Para contrarrestar la producción excesiva de ROS, realizo ensayos de suplementación oral con antioxidantes en el hombre, lo que genero descensos en el índice de fragmentación del ADN espermático.

Apoptosis

El proceso apoptótico daña el ADN, en el núcleo se cortan pequeños pedazos de ADN y algunos organelos de la célula, tales como el retículo endoplásmico, estos se descomponen en fragmentos que son pequeños pedazos, cada uno envuelto cuidadosamente en un paquete de membrana lo que contribuye a desencadenar una mala calidad espermática. Durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo se produce la apoptosis continuamente (Hingst y Blottner 1995). Las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. Sin embargo, las células que se escapan del proceso de apoptosis, y tienen su ADN fragmentado, pueden conservar la capacidad de diferenciarse en un espermatozoide maduro funcional, que puede alcanzar el ovocito y conseguir la fertilización (Sakkas et al., 2004). Además, estos espermatozoides generan una serie de metabolitos en el líquido seminal, que podrían acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides tras la eyaculación. Esta situación es especialmente crítica durante el proceso de criopreservación del semen. Se inducen desórdenes de membrana y muerte celular que generan un acúmulo no deseable de metabolitos altamente reactivos, como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleasas y enzimas de remodelación de la cromatina, que pueden ser activas sobre los núcleos espermáticos normales. Sin embargo, en un estudio realizado sobre células espermáticas de bovino, la criopreservación provocó cambios importantes en todos los marcadores apoptóticos de la célula excepto en aquellos concernientes al núcleo (Hingst y Blottner 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de la Molina, Lima, durante los meses de enero, febrero y marzo del 2019. Durante los tres meses el clima presentó temperaturas mínimas mensuales durante los 3 meses promedio de 21 °C y máximas de 26 °C una humedad relativa promedio del 51 por ciento (Senamhi. 2019).



Figura 1: Ubicación del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria la Molina

3.2 Animales

Se trabajó con cinco toros de la raza Brown Swiss, que comprendían edades entre 2 a 6 años, estos se encontraban sujetos a un régimen de colecciones de una vez por semana, estos fueron: Zech Thuunder Atwood “SAN MARTIN”, registro genealógico 14206, de tres años de edad; Sequion Thunder CD “ANÍBAL” registro genealógico 13998, de cinco años de edad; Bali Wonderment Collection “ELIPSE” registro genealógico 13361, de seis años de edad; Zech Cadence Atwood “RANGER” registro genealógico 14330, de dos años de edad; Molinero Cadence Dyanasty “BOLT” registro genealógico 14122, de cuatro años de edad.

Todos los toros cumplieron con el estatus zoonosanitario de acuerdo a las normas de bioseguridad sanitaria del Banco Nacional de Semen UNALM, mostrando resultados negativos para la prueba de Brucelosis bovina, Tuberculosis bovina, Leucosis Bovina, Lengua Azul y Rinotraqueitis infecciosa bovina; certificado en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y corroborado por el SENASA



Figura 2: Toros raza Brown Swiss en brete de colección previo a la colecta.

3.3 Colección de semen

La colección se realizó una vez por semana, utilizando otro toro como chantador el cual fue fijado en un brete de colección, bajo sombra y con piso antideslizante.

Se utilizó una vagina artificial (modelo IMV-francesa), esta se preparó ubicando la camisa de látex dentro del cilindro para luego fijar el cono colector con bandas elásticas, luego se llenó con agua caliente a 37 °C., al final del cono colector se colocó el tubo colector graduado de 15ml.

El personal encargado de la colección se situó al lado derecho del semental, con la mano derecha sostuvo la vagina artificial, en el momento en que el macho inició el salto, el operador con la mano izquierda desvió la dirección del pene (tocando solamente el prepucio) introduciéndolo dentro de la vagina artificial, se identificó el tubo colector con el nombre del toro, se cubrió externamente y se trasladó al laboratorio para su análisis y procesamiento.

Se efectuaron un total de 76 colecciones de semen, se obtuvieron 18 eyaculados del toro Aníbal, 18 del toro Ranger, 16 del toro San Martín, 14 del toro Bolt y 10 del toro Elipse.

3.4 Dilución seminal

Se utilizó el Dilutor Andromed® (Minitub Germany) se preparó en baño maría a una T° 32.5°C se vertió 100ml de dilutor concentrado puro en 400 ml de agua bidestilada se homogenizó y se dejó incubando por 10 minutos, previo a su utilización.

Obtenido el eyaculado, se realizó la predilución (1/1) agregando el dilutor en la misma proporción del semen en el tubo graduado y se colocó en el baño María a 32.5°C. Se determinó el número de pajillas a obtener en función a la concentración por el volumen espermática del eyaculado por la constante 0.8 que indicaría una tasa esperada del 80% de motilidad y por 0.8 que indicaría una tasa de viabilidad del 80% esto dividido por el número de espermatozoides por dosis.

Para el cálculo del dilutor total se multiplicó el valor obtenido para pajillas esperadas por 0.5 que vendría a ser la cantidad de centímetros cúbicos de capacidad de la pajilla

menos el volumen inicial, por último, se obtiene el dilutor restante, restando el dilutor total menos el volumen inicial.

El dilutor restante se agregó en un solo paso, previamente atemperado en baño María a una temperatura de 32.5°C. para evitar el choque térmico de los espermatozoides, posterior a esto se vertió el semen prediluido lentamente por las paredes del matraz, y se homogenizó suavemente, Se esperó un tiempo aproximado de 10 minutos a fin de que la solución se estabilice, posterior a esto se examinó en el microscopio para comprobar la motilidad, viabilidad y la fragmentación ADN espermática previo a la criopreservación.

Se realizó la identificación de las pajillas, codificadas con el número del macho y fecha de colección. Se utilizó peines especiales para descargar una pequeña porción del semen diluido y poder colocar el tapón sellador. Luego del envasado se selló el extremo abierto de las pajillas con polvo de alcohol polivinílico. se realizó el descenso de la temperatura colocando las pajillas en cubetas con agua a temperatura del laboratorio, y luego se colocaron en refrigeración, descendiendo la temperatura de 32.5 °C Baño maría (MEMMERT 25lt) luego a 20°C medio ambiente del laboratorio y finalmente a 5°C en refrigeración para su estabilización y posterior congelación.



Figura 3: Dilución seminal en baño maría con dilutor Andromed.

3.5 Evaluación de los parámetros seminales.

3.5.1 Volumen seminal

El volumen de semen se determinó mediante observación directa en el tubo graduado (marca Pyrex), no se tomó en consideración las burbujas de aire.

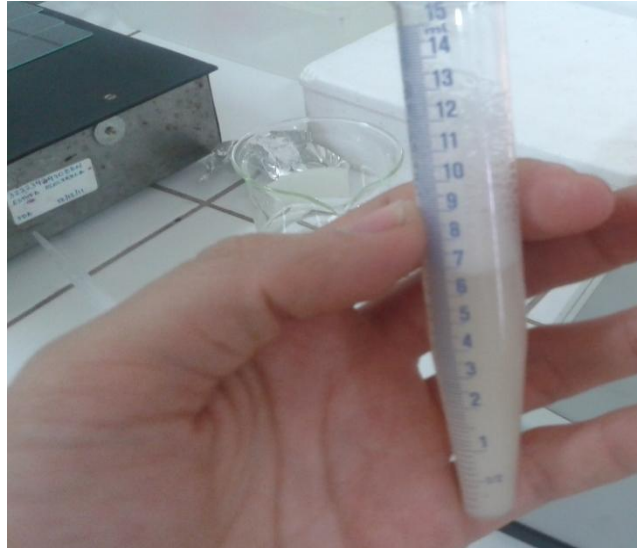


Figura 4: Tubo graduado, para evaluación volumen

3.5.2 Concentración espermática

El análisis de la concentración se utilizó el Fotómetro SD1M bovino (marca Leaflet, minitube). Se tomó una alícuota de 10ul de semen fresco y se colocó en una microcubeta la cual fue fijada en la posición correcta para su medición y lectura.

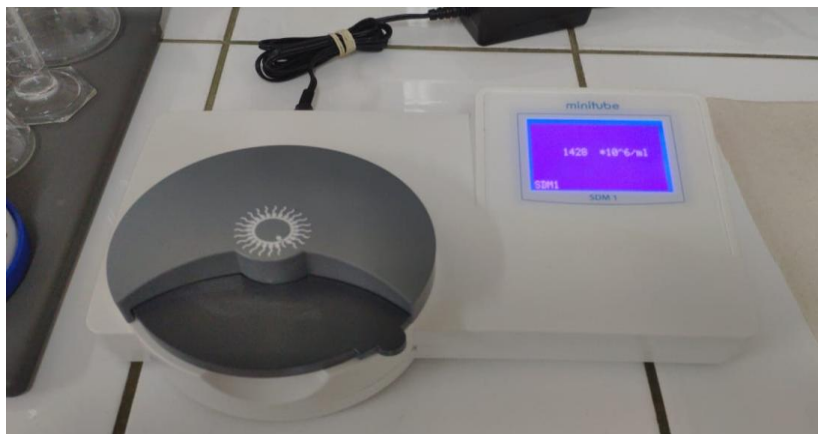


Figura 5: Evaluación concentración espermática fotómetro SD1M bovino marca Leaflet minitube.

3.5.3 Motilidad espermática

La evaluación de la motilidad espermática se realizó con el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA) software (Minitube AndroVision) versión 1.7.

El sistema está compuesto de un microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluorescence) conectado a una cámara de vídeo digital (Basler A302 fs), esta envía la imagen desde el microscopio a un monitor LED en tiempo real a través del objetivo de contraste de fases 20x, en donde un analizador digital de imagen captura varios fotogramas seguidos de cada campo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual, la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes tomando en consideración el análisis de tres campos para obtener un promedio de estos en los siguientes valores por eyaculado según Ntemka et al. (2016) los parámetros evaluados en el Sistema CASA se definen de la siguiente manera

El sistema permite evaluar la velocidad de los espermatozoides., definidos por Amann et al. (2004);

- VAP, $\mu\text{m/s}$: se obtiene por extrapolación de los puntos que determinan la VCL. Nos muestra la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.
- VSL, $\mu\text{m/s}$: se obtiene a partir de la unión entre el primer y el último punto durante el tiempo de adquisición de la imagen. Indica la distancia recorrida por el espermatozoide entre estos dos puntos de su trayectoria en función el tiempo.
- VCL, $\mu\text{m/s}$: se obtiene a partir de la unión de los puntos donde se localiza el centroide de la cabeza del espermatozoide en cada frame durante el tiempo de adquisición de la imagen. Nos aporta información sobre la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo

Con estos valores de velocidad el sistema clasifica la motilidad espermática en las siguientes categorías:

- Motilidad Progresiva (MP) de los espermatozoides porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento con un índice de rectitud (STR) $\geq 75\%$ dentro de la muestra.
- Motilidad Rápida (MR) de los espermatozoides analizados (espermatozoides móviles por mililitro velocidad (VCL) superior al $>80 \mu\text{m}/\text{sg}$)
- Motilidad Lenta (ML) de los espermatozoides analizados espermatozoides velocidad (VCL) menor a $<80 \mu\text{m}/\text{sg}$ pero superior al $>10 \mu\text{m}/\text{sg}$)
- Motilidad Circular (MC) de los espermatozoides analizados que presentan un Radio $>10.0 \mu\text{m}$ y $<80.0 \mu\text{m}$ con una rotación $>0.70 \mu\text{m}/\text{sg}$
- Motilidad Local (MLc) de los espermatozoides analizados VSL $<10.0 \mu\text{m}/\text{s}$ y VCL $<48.0 \mu\text{m}/\text{s}$
- Espermatozoides inmóviles (I): analizados el porcentaje de espermatozoides que presentan una velocidad curvilínea (VCL) $< 24.0 \mu\text{m}/\text{s}$ y ALH $< 1.0 \mu\text{m}/\text{s}$

El movimiento de cabeceo o desvío de su trayectoria se cuantificó a través de dos parámetros:

- ALH, $\mu\text{m}/\text{s}$: Es la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza mide el máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- BCF, Hz: frecuencia de corte de los movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide, expresada en Hertz (Hz)
- HAC: Actividad cabeza espermática, frecuencia de orientación promedio del cambio de movimiento de la cabeza.

La dirección de la trayectoria espermática se midió a través de tres cocientes Linealidad (LIN), la Rectilineidad (STR) y el índice de oscilación (WOB).

- La linealidad (LIN) es una expresión de la relación entre la proyección bidimensional de la trayectoria de un espermatozoide y el espacio ganado, calculado como VSL/ VCL

- La rectilineidad (STR) da la indicación de la relación entre el espacio ganado y la trayectoria general del espermatozoide, calculado como VSL/VAP .
- Índice de oscilación (WOB) Mide la oscilación de la trayectoria real con respecto a la trayectoria promedio, calculado como el cociente VAP/VCL .

3.5.4 Viabilidad

La evaluación de la viabilidad espermática se utilizó el Kit de fluorescencia Hoechst 33342/PI según las indicaciones del protocolo se tomó una alícuota de semen diluido de 35ul y se mezclaron 2ul de tinción Hoeschst 333242/PI (minitube) en un tubo eppendorf y se incubó por 5 minutos, luego se colocó 10ul de la muestra en un porta objeto para su evaluación utilizando el módulo de análisis de fluorescencia viabilidad espermática del CASA.



Figura 6: Tinción Hoeschst 333242/PI (Minitube, Germany)

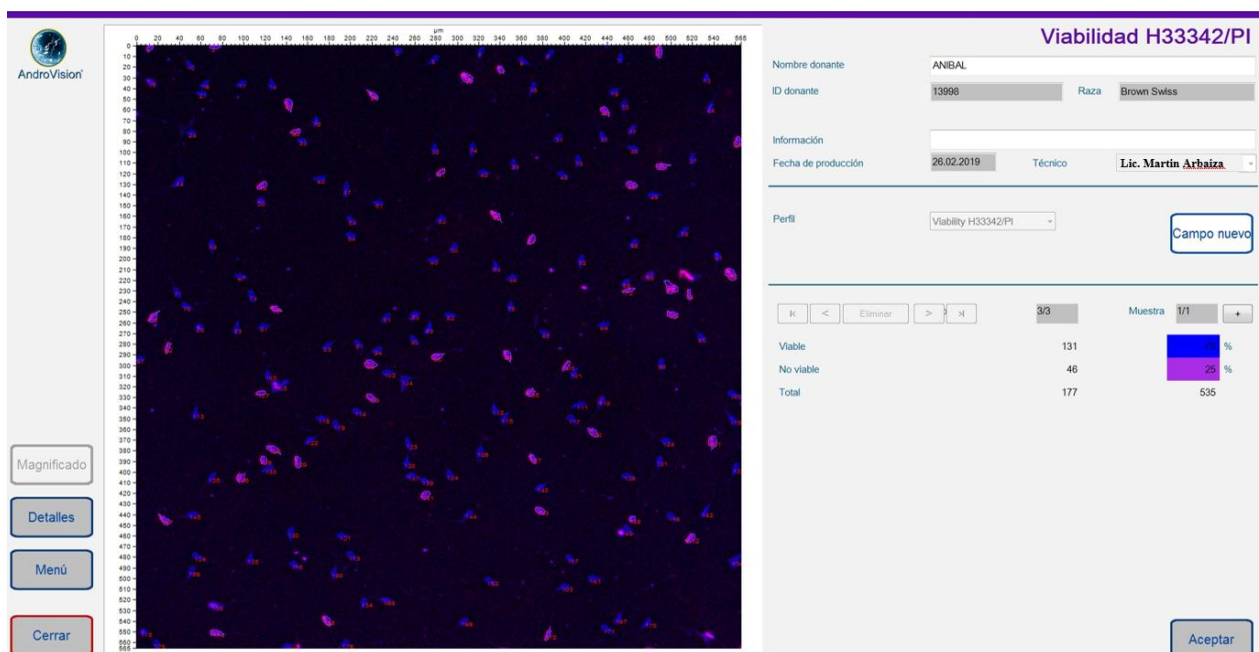


Figura 7: Evaluación módulo de viabilidad sistema CASA Espermatozoides azules = Viables / Espermatozoides violetas = No viables

3.5.5 Fragmentación del ADN espermático

La evaluación se realizó con el Kit Sperm-Halomax® (Halotech S.L., Madrid, España), se utilizaron cuatro kits de fragmentación de ADN cada uno para 40 determinaciones.

El protocolo sperm - halomax indica que cada muestra de semen se diluya a una concentración de 10 millones de espermatozoides/ml y se mezcló con agarosa líquida (0.7%) de bajo punto de fusión atemperada a 37°C. Sobre un portaobjetos previamente recubierto de una película de agarosa estándar al 0,65%, se depositó 2ul de la mezcla (agarosa y espermatozoides), se cubrió con un cubreobjetos de 20x20mm y se llevó a refrigeración para su solidificación a 4°C durante 5 minutos;

Los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente y los portaobjetos se introdujeron horizontalmente en una bandeja con solución de lisis (Sperm-Sus-Halomax, Chromacell, SL) durante 5 minutos a temperatura ambiente para extraer membranas y proteínas. Tras un lavado de 5 minutos en abundante agua destilada, las preparaciones se deshidrataron en baños de etanol al 70, 90 y 100% (v/v) de 2 minutos cada uno y se dejaron secar al aire para su posterior análisis. Las muestras preparadas se tiñeron con el kit de fluorescencia Fluored® HT-RFS100 (marca Halotech S.L., Madrid, España) colocando 2ul del colorante sobre la lámina preparada para su evaluación en el módulo de análisis de fragmentación espermática del CASA utilizando microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluorescence)



Figura 8: Kit Sperm-Halomax® y kit de fluorescencia Fluored® HT-RFS100

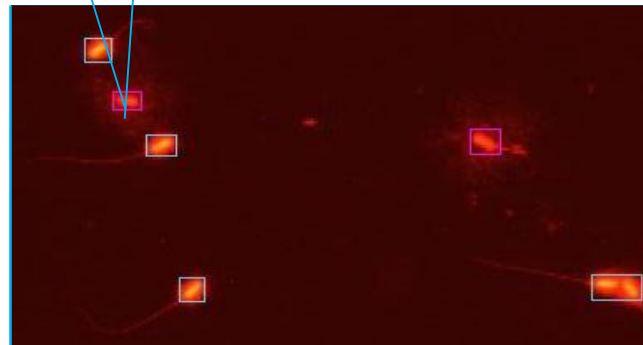
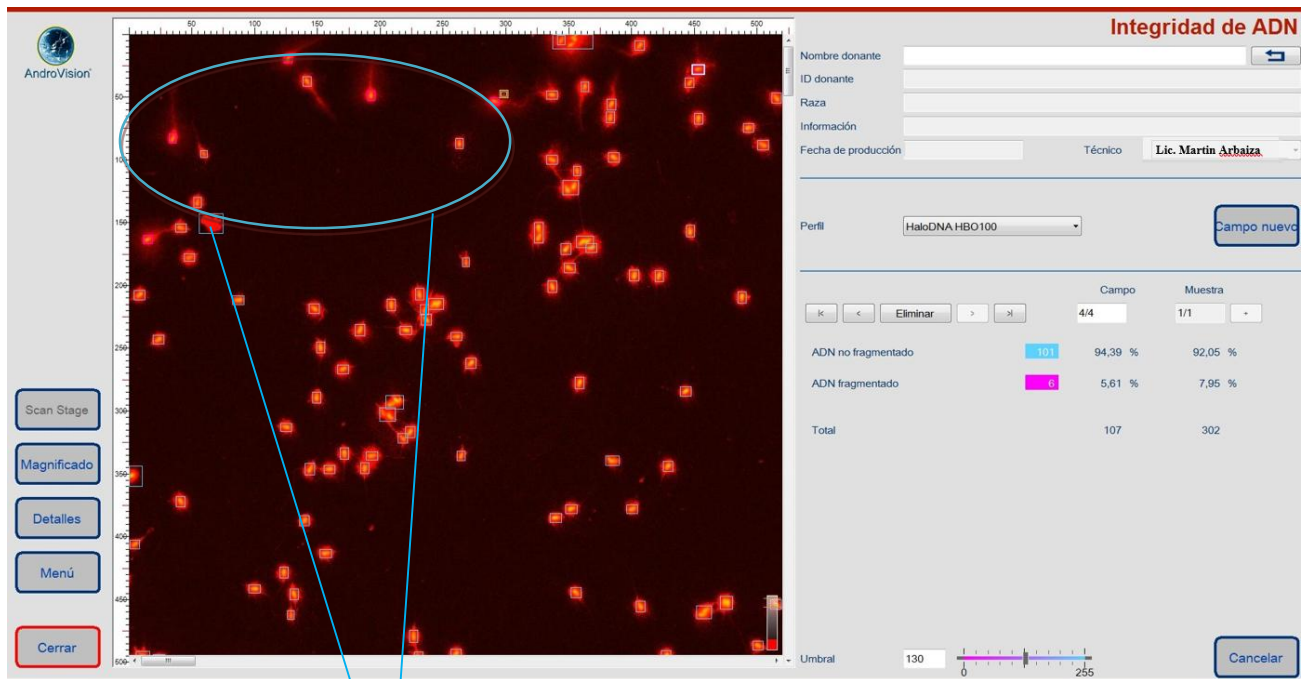


Figura 9: Evaluación módulo de fragmentación del ADN espermático sistema CASA
Espermatozoides fragmentados = Presencia de halo / Espermatozoides no fragmentados = ausencia de halo



Figura 10: Evaluación de láminas de fragmentación espermática

3.6 Criopreservación seminal

La congelación de semen se realizó utilizando un protocolo de congelación lenta progresiva. Se inició el descenso de temperatura de 5°C a 0°C. Cuando el sensor de temperatura llega a 0°C se colocó el cronometro para 7 minutos y se controló el descenso de temperatura 20°C por minuto durante 7 minutos hasta que llego a -140°C luego se abrió la caja de congelamiento y se sumergió las pajillas dentro del nitrógeno líquido a -196°C, se completara con nitrógeno líquido si fuera necesario con la ayuda de una pinza y un globet grande para que las pajillas queden completamente sumergidas.



Figura 11: Criopreservación pajillas semen.

La descongelación se realizó después de siete días de congelado la muestra, utilizando para esto una pinza de plástico, se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno y cuidadosamente se sumergió las pajillas en el termo con agua temperada a 37°C, durante 30 segundos, para luego secarlo y hacer la respectiva evaluación de las muestras descongeladas, se evaluó los parámetros cinéticos de motilidad espermática, viabilidad y fragmentación del ADN.

3.7 Análisis estadístico

Con el objetivo de evaluar el efecto de la criopreservación en la fragmentación del ADN, la viabilidad y cinética espermática, se calculó si existió un cambio significativo entre los valores antes y después de la criopreservación para cada parámetro seminal usando la prueba T de muestras relacionadas, previa verificación de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. En caso los datos no fueran normales, se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica). Se aplicó ajuste de Bonferroni para las comparaciones antes mencionadas, para todos los datos evaluados se realizaron correlaciones utilizando la prueba de Pearson. Todos los análisis se realizaron considerando 5 réplicas biológicas (5 toros) en el paquete estadístico SPSS v.23 con un 95% de confiabilidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

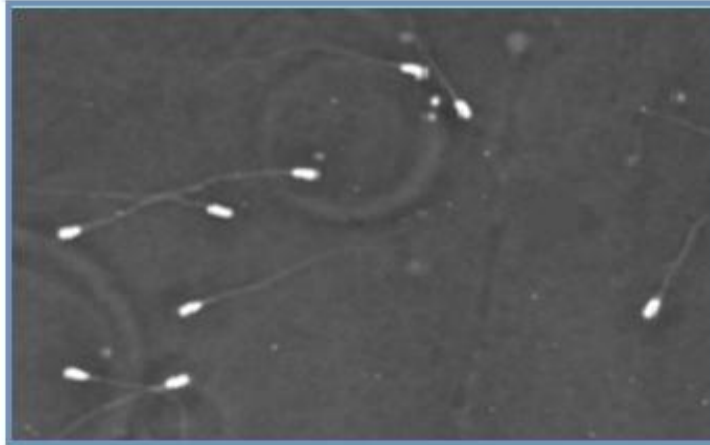
El parámetro de fragmentación de ADN espermático evidencio un aumento en los valores en un 3.19% estos resultados obtenidos han sido similares a los descritos Khalil et al (2017) en su investigación obtuvo valores de fragmentación de $4.6 \pm 2.29\%$ para la diferencia de valores antes y después del congelamiento del $3.8 \pm 1.36\%$ y $8.4 \pm 3.22\%$.

El valor de fragmentación espermático previo al congelamiento en esta investigación fue del 4.81% esto fue similar a lo encontrado por Ntemka A et al. (2016) con niveles de fragmentación del ADN del $4.7 \pm 1.3\%$ en toros Brown Swiss, estos resultados han sido también estudiados en otras razas, Orfaly et al. (2008) analizaron 46 toros de la raza Nelore, obteniendo una media de espermatozoides fragmentados del $8.8 \pm 3.8\%$ en semen fresco, Enciso et al. (2011) mediante el test SCD de $11.35\% \pm 2.81\%$ para toros de la raza Holstein. Posado et al. 2011 para semen fresco de toros de lidia obtuvo $6.86\% \pm 4.88\%$ respectivamente.

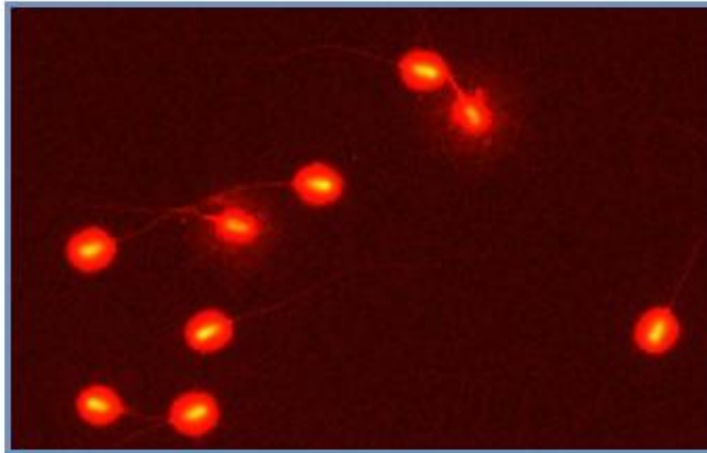
Los siguientes estudios han contribuido a proponer la existencia de un umbral de daño del ADN espermático. Duran et al. (2002) encontró asociaciones entre niveles superiores al 12% de fragmentación de ADN con bajas tasas de concepción donde no se alcanzó preñez. Al igual que Evenson et al. (1980) y Larson et al. 2000) que indican que los niveles de fragmentación del ADN superior al 30% son incompatibles con la concepción y el mantenimiento de la preñez.

De acuerdo Karabinus et al. (1990) en el caso de espermatozoides de toros, se ha visto que medidas del índice de fragmentación por encima del 20% están asociadas con bajas tasas de fertilidad. Estos datos en correlación con los valores obtenidos para semen nativo de $6.01 \pm 2.8\%$ y semen congelado de $9.21 \pm 3.0\%$. podrían indicarían que se encuentran con una buena calidad del ADN espermático y posiblemente una buena fertilidad.

A



B



C

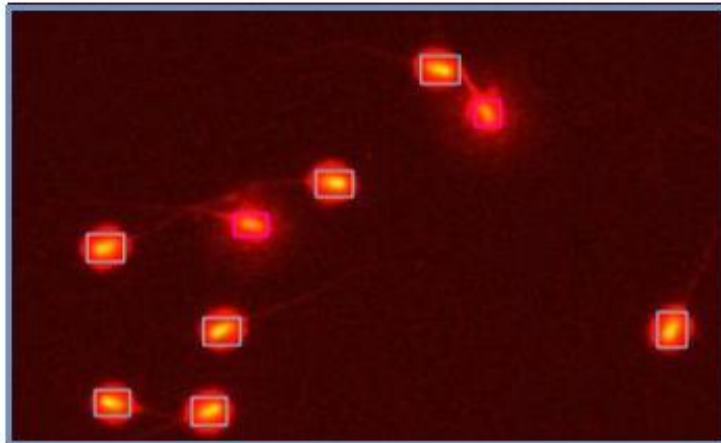


Figura 12: Análisis de Fragmentación de ADN utilizando módulo Androvision Sistema (C.A.S.A) A. Análisis de Espermatozoides vista simple contraste de fase vista 250X. B. Espermatozoides sometidos al tratamiento con el Kit Sperm-Halomax® y teñidos con el kit de fluorescencia Fluored® HT-RFS100 vista 250X C. Espermatozoides detectados con el modulo fragmentación, presencia de halo indicador de fragmentación de ADN espermática, espermatozoides sin halo normales, vista microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluorescence) objetivo fluorita vista 250X longitud de onda excitación a 300nm, emisión 595nm

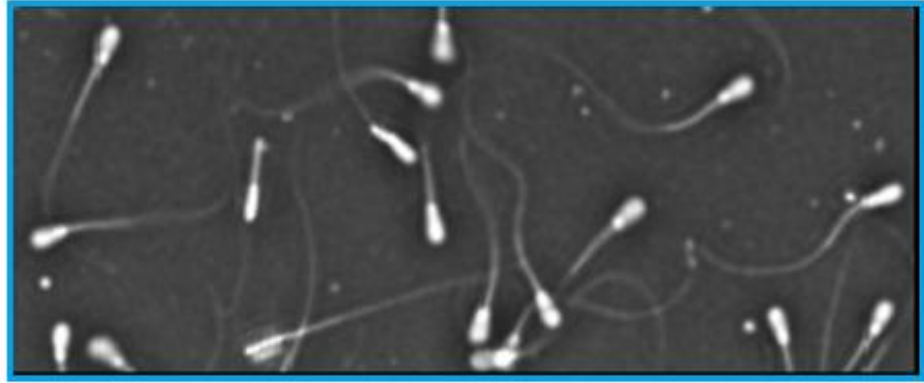
El parámetro de viabilidad espermática manifestó una disminución significativa de sus valores por el efecto del congelamiento seminal, posiblemente ocasionado por el estrés osmótico, shock térmico y la formación de hielo intracelular estos causan daños en la membrana plasmática y organelos de la célula (Johnson et al., 2000) los datos obtenidos fueron similares a los de Ntemka A et al. (2016) en su investigación evaluó pajillas de semen congelado de la raza Brown Swiss y obtuvo valores de viabilidad espermática de 69.6 ± 1.7 ;

Viñan, H. (2017) en toros de raza Holstein obtuvo valores para semen fresco de $89.01 \pm 0.91\%$ y posterior al congelamiento de 63.26 ± 0.68 , Januskauskas et al. (2001) obtuvo para semen descongelado valores de $68.1 \pm 4.9\%$, al igual que Orfaly et al. (2008) para semen congelado con valores de 68.1 ± 4.88 , este ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados debido a que juega un papel clave en la fecundación (Cabrera, 2012), gracias a que solo los espermatozoides que son viables podrán realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito y, como consecuencia, fusionarse con éste para formar un embrión (Januskauskas 2001).

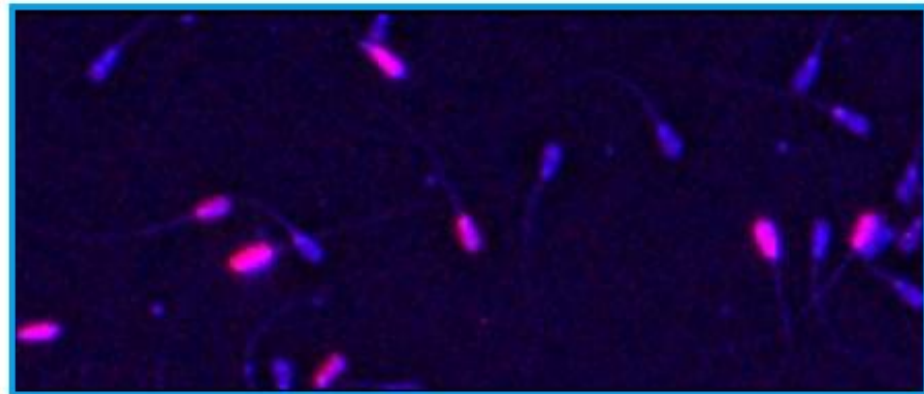
La motilidad total también se vio afectada por el congelamiento seminal, en diferentes razas otros autores han obtenido valores similares a nuestra investigación Viñan (2017) obtuvo para su tratamiento control valores de Motilidad total antes de $92.65 \pm 0.84\%$ y posterior de $67.73 \pm 0.7\%$, al igual que Veloz et al. (2017) con valores antes de $75.56 \pm 1.25\%$ y después de $59.64 \pm 1.07\%$.

Los valores de motilidad progresiva fueron semejantes a los obtenidos por Viñan (2017) $89.74 \pm 0.91\%$ y $54.73 \pm 0.72\%$ y superiores a los de Sunderaraman et al (2012) con valores antes de congelamiento de 65.9% y después 30.8% e inferiores a los de Veloz et al. (2017) antes $63.20 \pm 1.62\%$ y después $55.65 \pm 1.54\%$.

A



B



C

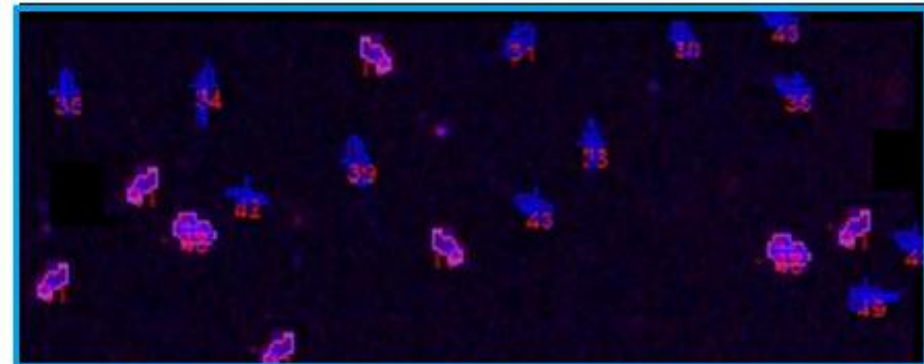


Figura 13:Análisis de viabilidad espermática utilizando módulo Androvision Sistema (C.A.S.A) A. Análisis de Espermatozoides vista simple contraste de fase. B. Espermatozoides sometidos a la tinción Kit Hoechst 33342/PI Double Stain Apoptosis Detection C. Espermatozoides detectados modulo análisis viabilidad AndroVision en microscopio de fluorescencia, espermatozoides teñidos rojo (Muertos) ya que el colorante solo es permeable en células muertas, Espermatozoides azules (Vivos) vista microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluorescence) objetivo fluorita vista 250X, longitud de onda para el colorante Hoescht 33342 fluorescencia azul longitud de onda excitación a 350nm, emisión 461nm, y Yoduro de propidio (PI) fluorescencia roja longitud de onda excitación a 535nm, emisión 617nm.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación (n=5). En negrita se resaltan los parámetros significativos.

Parámetro	Condición	Media + DE	Sig. (bilateral)
ADN fragmentado (%)	Antes	6.013 ± 2.86	<.001
	Después	9.211 ± 3.00	
Viabilidad (%)	Antes	89.083 ± 2.39	<.001
	Después	63.233 ± 5.32	
Motilidad total (%)	Antes	87.923 ± 3.86	<.001
	Después	62.048 ± 5.33	
Motilidad progresiva (%)	Antes	84.285 ± 4.53	<.001
	Después	53.768 ± 4.58	
Motilidad rápida (%)	Antes	63.433 ± 5.63	<.001
	Después	32.489 ± 5.32	
Motilidad lenta (%)	Antes	10.978 ± 1.85	.005
	Después	18.319 ± 1.30	
Motilidad circular (%)	Antes	9.916 ± 6.48	.015
	Después	2.960 ± 2.71	
Motilidad local (%)	Antes	3.627 ± 0.76	<.001
	Después	8.279 ± 1.49	
Espermatozoides inmóviles (%)	Antes	12.182 ± 3.72	<.001
	Después	37.720 ± 5.57	
Velocidad Curvilínea (VCL) (um/s)	Antes	152.070 ± 15.13	<.001
	Después	75.227 ± 7.38	
Velocidad Rectilínea (VSL) (um/s)	Antes	70.790 ± 5.68	<.001
	Después	30.134 ± 1.75	
Velocidad media (VAP) (um/s)	Antes	82.505 ± 7.65	<.001
	Después	38.639 ± 3.20	
Distancia de línea curva (DCL) (um)	Antes	68.613 ± 18.82	.004
	Después	29.843 ± 4.71	
Distancia línea recta (DSL) (um)	Antes	27.495 ± 5.90	.001
	Después	9.622 ± 1.25	
Distancia media de recorrido (DAP) (um)	Antes	35.050 ± 8.86	.002
	Después	13.631 ± 1.95	
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (um)	Antes	1.585 ± 0.18	<.001
	Después	0.940 ± 0.11	
Frecuencia de entrecruzamiento (BCF) (Hz)	Antes	15.928 ± 1.78	<.001
	Después	7.314 ± 0.38	
Actividad de la cabeza (HAC) (rad)	Antes	0.358 ± 0.04	<.001
	Después	0.159 ± 0.01	
Índice de oscilación (WOB)	Antes	0.541 ± 0.02	0.080
	Después	0.521 ± 0.01	
Índice de linearidad (LIN)	Antes	0.465 ± 0.02	0.043
	Después	0.409 ± 0.02	
Índice de Rectitud (STR)	Antes	0.854 ± 0.02	<.001
	Después	0.784 ± 0.02	

La motilidad rápida también se vio afectada por la criopreservación seminal, estos valores fueron similares a lo obtenido en la investigación de Morte et al. (2007) el cual utilizando un congelador programable obtuvo que los valores antes y después del congelamiento para este parámetro fueron significativamente diferentes $p < 0.05$. Muiño et al (2008) para toros de la raza frisona y rubia gallega obtuvo valores para semen fresco de 50.9 ± 14.3 y 53.4 ± 12.4 respectivamente.

Para los valores de motilidad lenta no se encontró un cambio significativo, estos resultados fueron similares a lo encontrado en la investigación de Morte et al. (2007), donde tampoco encontró diferencias por el efecto del congelamiento, esto quiere decir que la congelación no tuvo un efecto directo sobre este parámetro seminal y otros factores podrían estar influyendo en el aumento de la motilidad lenta.

La motilidad circular fue otro parámetro que tampoco se vio influenciado por la congelación seminal, estos resultados los corrobora Morte et al. (2007), en su investigación donde concluye que este parámetro es influenciado por factores antagónicos al congelamiento.

La motilidad local o como su nombre lo indica espermatozoides que se mueven en su mismo sitio, pero no presentan un desplazamiento, se vio influenciada por el efecto del congelamiento, obteniendo valores de significancia similares a los obtenidos en la investigación de Morte et al. (2007) en donde concluyo que el aumento de este parámetro se encuentra influenciado por el congelamiento.

Los espermatozoides inmóviles que no presentaban ningún tipo de desplazamiento ni movimiento local, aumento de manera significativa, estos valores fueron similares a los obtenidos en la investigación de Morte et al. (2007) en donde obtuvo que el congelamiento estuvo estrechamente ligado al aumento de los valores de este parámetro seminal., en distintas investigaciones se ha podido apreciar el aumento de estos valores, Viñan (2017) también observo este aumento con valores antes de $7.35 \pm 0.84\%$ y posterior de $32.27 \pm 0.7\%$ al congelamiento, al igual que Veloz et al. (2017) donde obtuvo valores antes de $29.12 \pm 1.62\%$ y posterior de $44.35 \pm 1.20\%$ respectivamente y finalmente Sundararaman et al. (2012) encontró un aumento de 5.7% al 37% de espermatozoides inmóviles.

El parámetro cinético de velocidad curvilínea (VCL) experimento una disminución significativa similar a lo obtenido en la investigación de Morte et al. (2007), este parámetro indicador de fertilidad como lo señala Hirano et al. (2001) en muestras con un $VCL > 86.2 \pm 16.5$ en semen fresco presentaron tasas de fertilización $> 50\%$, Ormachea et al. (2019) evaluó toros de la raza Brown Swiss americanos y obtuvo valores para VCL de $152.07 \pm 15.13\%$ muy similares a los obtenidos en esta investigación, Ancco et al. (2017) en pajillas de semen congelado de toros nacionales obtuvo valores de VCL de 80.97 ± 13.69 . En otras razas de toros también se ha analizado este parámetro Crespo et al. (2013) en toros limonero obtuvo valores para semen congelado de $VCL 43.5 \pm 0.11\%$, Mora et al. (2016) obtuvo valores superiores a los obtenidos en esta investigación en semen fresco $VCL 216.3 \pm 10.2\%$

La velocidad Rectilínea (VSL), disminuyó significadamente por el efecto del congelamiento, esto fue corroborado en la investigación de Morte et al. (2007) donde encontró valores similares, Hirano et al. (2001) indica que valores superiores de $VSL > 49.1 \pm 9.2$ para semen fresco presentan tasas de fertilización $> 50\%$. Ancco et al. (2017) en pajillas de semen congelado de toros nacionales obtuvo valores de VSL de 70.79 ± 5.6 , Ormachea et al. (2019) evaluó toros de la raza Brown Swiss americanos y obtuvo valores para VSL de $70.79 \pm 5.6\%$ muy similares a los obtenidos en esta investigación. En otras razas de toros también se ha analizado este parámetro, Mora et al. (2016) obtuvo valores superiores a los obtenidos en esta investigación en semen fresco $VSL 106.8 \pm 7.8\%$, Crespo et al. (2013) en toros limonero obtuvo valores para semen congelado de $VSL 17.62 \pm 0.06\%$.

La velocidad media (VAP), tuvo una disminución significativa similar a lo obtenido en la investigación de Morte et al. (2007), este parámetro indicador de fertilidad como lo señala Hirano et al. (2001) en muestras con un $VAP > 64.0 \pm 5.2$ en semen fresco presentaron tasas de fertilización $> 50\%$, Ormachea et al. (2019) evaluó toros de la raza Brown Swiss americanos y obtuvo valores para VAP de $82.50 \pm 7.6\%$ muy similares a los obtenidos en esta investigación, Ancco et al. (2017) en pajillas de semen congelado de toros nacionales obtuvo valores de VAP de 44.82 ± 7.22 . En otras razas de toros también se ha analizado este parámetro Crespo et al. (2013) en toros limonero obtuvo valores para semen congelado de $VAP 26.64 \pm 0.07\%$, Mora et al. (2016) obtuvo valores superiores a los obtenidos en esta investigación en semen fresco $VAP 106.8 \pm 7.8\%$

La amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), experimento una disminución en sus valores por el efecto del congelamiento con una clara significancia, similar a lo obtenido por Quintin et al. (2016) en toros Brown swiss para muestras de semen fresco con valores superiores a los obtenidos de ALH 3.3 ± 0.37 . La importancia de este parámetro según indica Shanis et al. (1989) este parámetro se encuentra asociado a la penetración del espermatozoide con el ovocito, ellos observaron que, en el moco cervical, el ALH disminuye para ayudar a la penetración de la célula espermática y afirman que si el ALH es abnormal quiere decir que el movimiento de la cabeza es pequeño, lo que quiere decir que la cabeza no rotara, lo que reducirá el éxito en la fertilización, esto es corroborado por Bravo, J et al (2011) lo define como una variable relacionadas a la velocidad y progresividad de la motilidad de los espermatozoides, esencial para la penetración del moco cervical, aspecto indispensable del comportamiento celular que depende casi enteramente de las fuerzas físicas generadas por el golpe del flagelo, en distintas investigación se ha analizado este parámetro Ormachea et al. (2019) en toros Brown Swiss americanos ALH de $4.12 \pm 1.2\%$, Ancco et al. (2017) en pajillas de semen congelado de toros nacionales obtuvo valores de ALH de 3.84 ± 0.11 . Crespo et al. (2013) en toros limonero para semen congelado de ALH $2.2 \pm 0.0\%$, Mora et al. (2016) valores para semen fresco ALH $1.5 \pm 0.52\%$.

La Frecuencia de entrecruzamiento (BCF), este parámetro ligado a la penetración de la célula espermática durante el desplazamiento por el moco cervical (Shanis et al. 1989 y Bravo, J et al 2011), presento una disminución significativa en sus valores, diversas investigaciones han evaluado este parámetro Ancco et al. (2017) en pajillas de semen congelado de toros nacionales obtuvo valores de BCF de 8.2 ± 0.38 , Ormachea et al. (2019) en toros Brown Swiss americanos BCF de $19.96 \pm 9.5\%$,. Crespo et al. (2013) en toros limonero para semen congelado de BCF $4.37 \pm 0.01\%$, Mora et al. (2016) valores para semen fresco BCF $3.26 \pm 2.5\%$.

El efecto que tiene la criopreservación en 16 de los 21 parámetros seminales evaluados en esta investigación es significativo. Esto es analizado por Holt (2000) que afirma que la tasa de congelación debe ser lo suficientemente lenta para permitir la salida por osmosis de agua del interior de la célula, previniendo así la formación de hielo intracelular, pero también lo suficientemente rápida para minimizar el efecto dañino de la exposición prolongada a concentraciones altas de solutos con el fin de evitar procesos

de recristalización que afectan la integridad de la membrana plasmática.

Watson (1995) en su investigación demuestra que la disminución de la calidad seminal por el proceso de congelación y descongelación, es provocado por un daño irreversible en aproximadamente el 50% de los espermatozoides de cada dosis, este estrés ocasionado por el congelamiento seminal produce una contracción celular que puede causar la pérdida irreversible de la membrana y la alteración del citoesqueleto y de los organelos, la célula puede verse afectada por las altas concentraciones de solutos en las partes no congeladas del espacio extracelular que dañan la membrana, por cambios en el pH y desnaturalización de proteínas.

V. CONCLUSIONES

1. Se encontró diferencias significativas en 16 de los 21 parámetros evaluados para los toros donadores de semen de la raza Brown Swiss evaluados en el sistema CASA,
2. Se evidencio un aumento de la fragmentación del ADN del 3% por el efecto de la criopreservación seminal, todos los valores de este parámetro se encontraron dentro de los rangos considerados normales.
3. Se demostró el efecto de la criopreservación seminal sobre el parámetro de viabilidad espermática manifestándose diferencias significativas en la disminución de los valores analizados.
4. Se observó la disminución de los valores con diferencias significativas en los siguientes parámetros seminales motilidad, motilidad progresiva, motilidad rápida, al igual que los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, STR, y un incremento en los valores de motilidad local y espermatozoides inmóviles, atribuidos al efecto de la criopreservación seminal.

VI. RECOMENDACIONES

- 1.** Se recomienda incorporar las evaluaciones desarrolladas en esta investigación a los protocolos de análisis seminal del Banco Nacional de Semen
- 2.** Evaluar si la criopreservación seminal tiene un efecto sobre la morfología espermática
- 3.** Realizar correlaciones entre los parámetros seminales para analizar la relación de las variables.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardon, F., Helms, D., Sahin, E., Bollwein, H., Topfer-Petersen, E., Waberski, D. (2008). Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes *in vivo*. *Reproduction*; 135:461-470.

Ancco Gomez, E. (2017). Efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones *in vitro* en bovinos. Universidad Nacional Agraria la Molina 1-82.

Aitken, R.J., De, Iuliis G.N., McLachlan, R.I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.*; 32: 46-56.

Amann, R.P., and D.F. Katz. (2004). Andrology Lab Corner: Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25:317-25. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x

Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M., Carrell, D. T. (2005). DNA Integrity Is Compromised in Protamine Deficient Human Sperm. *J. Androl.*; 26(6):741-748.

Alexandratos, N. y J. Bruinsma. (2012). World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 Revision. ESA Working Paper No. 12-03. Rome, FAO. www.fao.org/3/a-ap106e.pdf

Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., & Roy, T.J. (2011). Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Archivos de Zootecnia*, 60(232), 1087-1094

Barth, A.D., Oko, J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames. EEUU. 285.

Barth, A.D. (2000). Bull breeding soundness evaluation manual. 2^a Ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners.

Ballachey, B., Hohenboken, W., Evenson, D. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.*; 36:915- 925.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.*; 8:227.

Bennetts, L.E., de Iuliis, G.N., Nixon, B., Kime, M., Zelski, K., McVicar, C.M., Lewis, S.E., Aitken, R.J. (2008). Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat. Res.*; 641:1-11.

Bellve, A., Anderson, E., Hanley, Bowdoin, L. (1975). Synthesis and amino acid composition of basic proteins in mammalian sperm nuclei. *Dev. Biol.*; 47:349-365.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (1999). Protamine-Induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Sci.*; 286:120-123

Biegeleisen, K. (2006). The probable structure of the protamine-DNA Complex. *J. Theor Biol*; 241:533-40.

Blom, E. (1983). Pathological conditions in the genital organs and in the semen as grounds for rejection of breeding bulls for import and export to or from Denmark. *Nordisk Veterinaermedicin*; 35:05-130.

Buxadé, C. (1996). Producciones equinas y de ganado de lidia. Tomo XI. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 350.

Calvin, H., Bedford, J. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.*; 13 (Supl. 13): 65-75.

Cabrera, V., Próspero, A., Pantoja, A., 2012, Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev. investig. vet. Perú* vol.23, p.192-200.

Crabo, B.G. 2001. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In *depth: reproduction—the use of frozen semen*. 47: 291-297.

Cenagro. III Censo Nacional Agropecuario [en línea]. INEI, 2012.

Corzett, M, Mazrimas, J., Balhorn, R. (2002). Protamine 1: Protamine 2 Stoichiometry in the sperm of Eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.*; 61:519-527.

Colenbrander, B., Gadella, B. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.*; 38:305-311.

Crespo Padrón, Edward Enrique. 2013. Valoración de los descriptores de motilidad espermática mediante análisis computarizado en semen criopreservado de toros Criollo Limonero. La Universidad del Zulia. Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias. División de Estudios para Graduados. Programa de Maestría en Producción Animal. (Trabajo de Grado). Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. 98 pp

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W., 1986, Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* 15, 213-226.

Cuevas, A. (2013). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer, tesis doctoral, Universidad Cordoba. 1-173.

Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW. (1995). Application of multivariate discriminate function, cluster, and regression analysis to models of sperm cryodamage. *Fertil Steril*; 63:1051-1057.

Des Daas, N. (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*; 28:87-94.

Derijck, A., Van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M., de Boer, P. 2008. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum. Mol. Genet.*; 17: 1922-1937.

Duran, E. H., Morshedi, M., Taylor, S. y Oehninger, S. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 17, 3122-8.

Enciso, M., Muriel, L., Fernández, J., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M., Montejo, J.M., Ardoy, M., Pacheco, A., Gosálvez, J. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.*; 27(1):106-111.

Enciso Lorences, María & Gosálvez Berenguer, Jaime. (2011). La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Universidad Autónoma de Madrid. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/4150/28272_TESISenciso_lorences_maria.pdf?sequence=1

Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. y Melamed, M. R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-3.

Evenson, D.P., Larson, K., Jost, L. (2002). Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.*; 23:25-43.

Fatehi, A., Bevers, M., Schoevers, E., Roelen, B., Colenbrander, B., Gadella, B. (2005). DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.*; 27:176-188.

Fernández, J., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vazquez, R., y Álvarez, J. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 24. 59-66

Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M. y De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* 84, 833-42.

Fernández, J.L., Gosálvez, J., Santiso, R., Goyanes, V., López-Fernández, C. (2007). In: Valentino, R.G. (Ed.), *Adaptation of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test to Determine DNA Fragmentation from Bull Sperm*. Nova Biochemical Books, New York. 69-84.

Fernández-González, R., Moreira, P.N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramírez, M.A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Álvarez, P., Hourcade, J.D., Rodríguez de Fonseca, F., Gutiérrez Adán, A. (2008). Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol. Reprod.*; 78:761-772

Field, A. (2009). *Discovering Statistics Using SPSS*, Sage: London (Third edition), 854.

Foresta, C., De Carlo, E., Mioni, R., Zorzi, M. (1989). Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects. *Andrology*; 21:384-390.

Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. (2000). Sperm Chromatin. *Ach. Androl.*; 45:215-225.

Gadea, J.; Selles, E. y Marco, M. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:1–6.

Graham, E., Schmehl, M., Nelson, D. (1980). Problems with laboratory assays. *Proc. 8º NMB. Tech. Conf. Al. Reprod.*; 59-66.

Guitou, H. (2010). Coeficiente de consanguinidad de un individuo. *Sistemas de apareamiento. Rev Angus* 248:31-37

Gonzales, GF., Portella-Ruiz JR. (2016). Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecol Obstet Mex* ;84(7):462-473

Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, R., and Darzynkiewicz, Z. (1993). Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 7, 659-670.

Hafez ESE; Hafez B, 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th edition, Baltimore/USA. 509 pp.

Hingst, O., Blottner, S. (1995). Quantification of apoptosis (programmed cell death) in mammalian testis by DNA-fragmentation Elisa. *Theriogenology*; 44(3):313-319.

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 62:3-22.

Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Sato, I. (2001). Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 18(4), 213–218.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática), 2013. Resultados definitivos del IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima – Perú. 62p.

Januskauskas, A., Johannisson. A., Rodríguez-Martínez, H. (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*; 55: 947-961.

Jhonson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62: 143-172.

Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Jost, L., Baer, R., Kaproth, M. (1990). Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J. Dairy Sci.*; 73(9):2364-2371.

Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O.

(2017). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*.

Kierszenbaum, A. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol. Reprod. Dev.*; 58:357-358.

Madrid-Bury, N., Perez-Gutierrez, J. F., Perez-Garnelo, S., Moreira, P., Pintado Sanjuanbenito, B., Gutierrez-Adan, A. y de la Fuente Martinez, J. (2005). Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64, 232-41.

Mandal, D.K., Kumar, M., Tyagi, S. (2010). Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian x Sahiwal Crossbred bulls. *Animal*; 4: 595-603.

McKay, D.J., Renaux, B.S., Dixon, G.H. (1985). The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci. Rep.*; 5:383-391.

McClure, T.J. (1994). *Nutritional and metabolic infertility in the cow*. Ed. CAB International. Wallingford, Oxon. England. 128.

Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Fernández, J. (2008). The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*; 90(1):225-227.

Mengual, L., Ballescà, J.L., Ascaso, C., Oliva, R. (2003). Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl.*; 24:438-447.

Mellisho, E. and Rivas, V. 2006. Criopreservación de Semen Ovino. Manual de Laboratorio: Criopreservación de gametos y embriones mamíferos. Universidad Ricardo Palma 3-12.

Ming-Huei Lin, Kuo-Kuang Lee R, Sheng-Hsiang Li, Chung-Hao Lu, Fang-Ju Sun, Yuh-

Ming Hwu (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. Fertility and Sterility Vol. 90, No. 2, August pp. 352-359.

MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego), 2017. Plan nacional de desarrollo ganadero 2017 – 2017. R.M. N° 297 – 2017.

Munuce, M.J, Cardona-Maya, W, & Berta, CL. (2006). ¿Existe asociación entre la morfología normal del espermatozoide y su cinética de desplazamiento? Actas Urológicas Españolas, 30(6), 591-597.

Muiño, Otero R. (2008) Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas, Universidad de Santiago de Compostela, España, tesis de grado, 1-157.

Morte MI, Rodrigues AM, Soares D, Rodrigues AS, Gamboa S, Ramalho- Santos J. (2008). The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. Anim Reprod Sci 106: 36-47. doi: 10.1016/j. anireprosci.2007.03.020

Medina, V., Sanchez, E., Velasco, Y., Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). Orinoquia, 11(1), 75-86.

Mora, C, Mendez, N. (2016). Evaluación espermática de ganado bovino mediante un sistema de análisis computacional (C.A.S.A.). Tlamati Sabiduría, Vol 7; 1-10.

Ntemka A, Tsousis G, Brozos C, et al. (2016) Breed differences of bull frozen-thawed semen. *Reprod Domest Anim*;51: 945-52.

Núñez Calonge, R., Caballero, P., López-Fernández, C., Guijarro, J.A., Fernández, J.L., Johnston, S., Gosálvez, J. (2012). Na improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod. Sci.*; 19:1163-1168.

Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.*; 15:1717-1722.

Orfaly Addad, Rogério & Freneau, Gustavo & Cardoso Resende, Lorena & Marçal da Silva, Leonardo. (2009). Evaluación clínica andrológica de toros nelore y tests de viabilidad espermática, integridad de acrosoma y fragmentación de cromatina a lo largo de tres estaciones de monta. *Ciência Animal Brasileira*. 10. 10.5216/cab.v10i4.3395.

Ormachea Valdez, E., Calsin C., B., & Zegarra O., E. (2019). Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), 500-506.

Olegario Hidalgo, C., Tamargo Miguel, C & Diez Monforte, C., (2007). Análisis del semen bovino. *Información ganadera, boletín informativo del seriada N°2*, 42-43.

OECD/FAO. (2015). *OECD- FAO Agricultural Outlook 2015- 2024*.

Posado, R., Hernández, M., García, J.J., Bartolomé, D.J., 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.

Quintín, F.J. et al. AIDA (2013), XV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I: 392-394

Shanis bs., Check ij., Bolendorf a., (1989). Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Archiv. Androl.*, 23, 392-394.

Saacke, R.G., Nadir, S., Dalton, J., Bame, J., Dejarnette, J., Degelos, S., Nebel, R., (1994). Accessory sperm evaluation and bull fertility. N.A.A.B. 15th Tech. Conf. Art. Ins. *Reprod.*; 57-67.

Saleh, R., Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.*; 23:737-752.

Söderquist, L., Janson, L., Haard, M., Einarsson, S. (1996). Influence of age, breed and some other factors on the variation in Sperm morphological abnormalities in Swedish Dairy A.I. Bulls. *Anim. Reprod. Sci.*; 44: 91-98.

Sorensen, A. Jr. (1982). *Reproducción Animal. Principios y Prácticas*. Ed. Mc Graw - Hill. 539.

Shannon, P., Vishwanath, R. (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci.*; 39;1-10.

Shimada, A., Kikuchi, K., Noguchi, J., Akina, K., Nakano, M., Kaneko, H. (2000). Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during “*in vitro*” fertilization of pig oocytes. *J Reprod Fertil*; 120:247-56.

M. N. Sundararaman, J Kalatharan, K Thilak Pon Jawahar. (2012). Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle - *Vet World.*; 5(12): 723-726

Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.*; 73:43-50.

Senamhi, (2019). Pronóstico del Tiempo a nivel nacional. Peru
<https://www.senamhi.gob.pe/>

Tuli R., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1992). Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen—thawed semen of the bull, boar and goat *Theriogenology*; 38:487-490.

Saacke, R.G., Nadir, S., Dalton, J., Bame, J., Dejarnette, J., Degelos, S., Nebel, R., (1994). Accessory sperm evaluation and bull fertility. N.A.A.B. 15th Tech. Conf. Art. Ins. Reprod.; 57-67.

Valverde, Anthony & Madrigal, Mónica & Zambrana-Jiménez, Adones. (2018). Evaluación de la cinética y motilidad espermática de verracos en condiciones tropicales. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)*. 12. 125-132.

Vejarano, OA; Sanabria L, RD and Trujillo L, GA. (2005). Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto magdalena. *rev.mvz cordoba*, vol.10, n.2

Veloz Veloz, D. M. (2017). Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. *Cuenca Tesis maestría*. 1-77.

Watson, P.F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membranes. En: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, 432 p.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and de assessment of their postthawing function. *Repro. Fertil. Dev.*; 7:871-91

White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.

Waterhouse, K.E., Gjeldnes, A., Tverdal, A., De Angelis, P.M., Farstad, W., Håård, M., Kommisrud, E. (2010). Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 117:34-42.

Woelders, H. (1990). Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. 2th Intl. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Beltsville, MD, EEUU. 145-164.

Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, Wada, A., Yoshimura, Y. (2005). Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol. Hum. Reprod.*; 11:677-681.

VI. ANEXOS

ANEXO 1: Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para las diferencias de los parámetros seminales. En negrita se resaltan los parámetros no normales ($p > 0.05$)

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
MotilidadScore	.831	5	.141
MotilidadProgresivaScore	.893	5	.374
MotilidadRapidaScore	.917	5	.513
MotilidadLentaScore	.933	5	.614
MotilidadCircularScore	.996	5	.995
MotilidadLocalScore	.817	5	.111
EspermatozoidessInmotScore	.781	5	.056
VCLScore	.960	5	.808
VSLScore	.913	5	.483
VAPScore	.908	5	.455
DCLScore	.931	5	.600
DSLScore	.950	5	.736
DAPScore	.921	5	.533
ALHScore	.942	5	.682
BCFScore	.952	5	.752
HACScore	.866	5	.251
WOBScore	.672	5	.005
LINScore	.689	5	.007
STRScore	.945	5	.701
ViabilidadScore	.929	5	.591
ADNScore	.803	5	.086

ANEXO 2: Parámetros descriptivos del promedio de las repeticiones obtenidas de las 76 colecciones de semen (Anibal n=18), (Bolt n=14), (Elipse n=10), (Ranger n=18), (San Martín n=16),

Parámetro	Condición	Anibal	Bolt	Elipse	Ranger	San Martín
Volumen seminal (ml)	-	6.86	6.0	7.2	4.8	8.8
Concentración seminal (x10 ⁶ ezp/ml)	-	1198.9	926.2	929.7	1528.2	743.7
ADN fragmentado (%)	Antes	4.81	10.54	4.81	3.06	6.85
	Después	7.00	13.80	8.48	6.34	10.43
Viabilidad (%)	Antes	90.08	85.36	90.12	91.61	88.26
	Después	70.02	61.45	56.15	66.70	61.84
Motilidad (%)	Antes	90.06	82.01	89.5	91.8	86.3
	Después	68.26	60.53	60.53	66.1	60.8
Motilidad progresiva (%)	Antes	86.79	77.29	86.7	88.4	82.3
	Después	59.91	50.94	48.9	57.1	51.9
Motilidad rápida (%)	Antes	65.64	63.04	54.6	70.1	63.8
	Después	36.78	34.42	23.48	35.7	32.1
Motilidad lenta (%)	Antes	8.2	12.24	12.9	10.2	11.4
	Después	19.11	16.39	18.28	19.8	18.0
Motilidad circular (%)	Antes	13.0	2.01	19.2	8.2	7.2
	Después	4.02	0.13	7.14	1.7	1.9
Motilidad local (%)	Antes	3.21	4.73	2.8	3.4	4.0
	Después	8.35	9.59	5.73	8.9	8.8
Espermatozoides inmóviles (%)	Antes	8.95	17.99	10.5	9.7	13.7
	Después	31.74	39.47	45.38	32.8	39.2
Velocidad Curvilínea (VCL) (um/s)	Antes	170.06	135.6	141.5	165.8	147.4
	Después	86.42	73.66	67.55	78.1	70.4
Velocidad Rectilínea (VSL) (um/s)	Antes	73.93	67.71	62.9	77.7	71.7
	Después	31.66	31.33	27.5	31.0	29.2
Velocidad media (VAP) (um/s)	Antes	83.28	77.73	73.2	91.3	81.0
	Después	42.58	39.27	34.62	40.5	36.3
Distancia de línea curva (DCL) (um)	Antes	86.0	41.57	85.6	70.7	59.2
	Después	35.85	23.77	33.0	29.1	27.5
Distancia línea recta (DSL) (um)	Antes	30.80	18.38	34.0	28.5	25.9
	Después	10.92	7.83	10.72	9.3	9.3
Distancia media de recorrido (DAP) (um)	Antes	42.61	21.96	43.0	37.0	30.7
	Después	16.08	10.94	14.82	13.4	12.9
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (um)	Antes	1.86	1.42	1.5	1.7	1.5
	Después	1.12	0.86	0.85	1.0	0.9
Frecuencia de entrecruzamiento (BCF) (hz)	Antes	16.27	12.96	17.7	15.9	16.8
	Después	7.83	7.05	6.84	7.5	7.4
Actividad de la cabeza (HAC) (rad)	Antes	0.40	0.29	0.40	0.40	0.30
	Después	0.19	0.15	0.14	0.20	0.10
Índice de oscilación (WOB)	Antes	0.52	0.57	0.50	0.54	0.54
	Después	0.50	0.54	0.53	0.52	0.52
Índice de linearidad (LIN)	Antes	0.43	0.50	0.40	0.50	0.50
	Después	0.37	0.43	0.43	0.40	0.42
Índice de Rectitud (STR)	Antes	0.82	0.87	0.85	0.85	0.88
	Después	0.75	0.80	0.80	0.78	0.80

ANEXO 3: Prueba T para muestras relacionadas de los parámetros seminales antes y después de la criopreservación. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.002$. En negrita se resaltan los parámetros significativos. t = estadístico t. gl = grados de libertad. Sig = significancia.

Parámetro	Media de las diferencias (Antes-Después)	Desviación estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
			Inferior	Superior			
ADN fragmentado (%)	-3.198	.590	-3.930	-2.465	-12.119	4	<.001
Viabilidad (%)	25.850	5.113	19.502	32.199	11.306	4	<.001
Motilidad (%)	25.875	5.392	19.180	32.569	10.731	4	<.001
Motilidad progresiva (%)	30.517	4.581	24.829	36.204	14.897	4	<.001
Motilidad rápida (%)	30.943	2.372	27.998	33.889	29.167	4	<.001
Motilidad lenta (%)	-7.342	2.860	-10.892	-3.791	-5.741	4	.005
Motilidad circular (%)	6.955	3.826	2.205	11.706	4.065	4	.015
Motilidad local (%)	-4.652	.999	-5.892	-3.412	-10.417	4	<.001
Espermatozoides inmóviles (%)	-25.538	5.395	-32.237	-18.839	-10.584	4	<.001
VCL (um/s)	76.843	9.925	64.520	89.167	17.313	4	<.001
VSL (um/s)	40.656	4.692	34.831	46.482	19.377	4	<.001
VAP (um/s)	43.866	5.345	37.229	50.503	18.351	4	<.001
DCL (um)	38.770	14.314	20.997	56.543	6.057	4	.004
DSL (um)	17.873	4.738	11.991	23.756	8.436	4	.001
DAP (um)	21.420	7.032	12.688	30.151	6.811	4	.002
ALH (um)	0.646	.072	.556	.735	20.076	4	<.001
BCF (hz)	8.613	1.802	6.376	10.851	10.687	4	<.001
HAC (rad)	0.200	.036	.155	.245	12.410	4	<.001
STR (VSL/VAP)	0.069	.010	.057	.082	15.350	4	<.001

ANEXO 4: Prueba de rangos con signo de Wilcoxon de los parámetros seminales que no presentaron normalidad. El ajuste de Bonferroni determinó un valor de significancia de $p < 0.025$. Z = estadístico Z. Sig = significancia.

Parámetro	Rangos negativos			Rangos positivos			Estadísticos de prueba		
	N	Rango promedio	Suma de rangos	N	Rango promedio	Suma de rangos	Empates	Z	Sig. (bilateral)
WOB antes – WOB después	1	1.000	1.000	4	3.500	14.000	0	- 1.753	0.080
LIN antes – LIN después	0	0.000	0.000	5	3.000	15.000	0	- 2.023	0.043

ANEXO 5: Microscopio de fluorescencia fragmentación AND espermático 250X Kit Sperm-Halomax® C y Tinción Fluored® HT-RFS100



ANEXO 6: Imagen del Sistema Computarizado de Analisis Seminal (C.A.S.A) software AndroVision



ANEXO 7: Evaluación de láminas fluorescencia A. Láminas para con 8 pocillos para evaluación de fragmentación espermática Kit Sperm-Halomax® C B. 20 láminas evaluadas durante todo el procesamiento seminal antes y después de la congelación seminal.

A



B



ANEXO 8: Evaluación de las muestras microscopios de fluorescencia

