

## La valoración seminal en las unidades de producción animal. Porcinos.

*Vet. Arg. ? Vol. XXXIX ? N° 405 ? Enero 2022.*

Alejandro Córdova Izquierdo<sup>1</sup>, Adrian Emmanuel Iglesias Reyes<sup>2</sup>, Eulogio Guerra Liera<sup>3</sup>, Gustavo Ruiz Lang<sup>1</sup>, Jorge A. Saltijeral Oaxaca<sup>1</sup>, Pedro Sánchez Aparicio<sup>4</sup>, Abel E. Villa Mancera<sup>5</sup>, Jaime Olivares Pérez<sup>6</sup>, Armando Gómez Vázquez<sup>7</sup> y Raúl Sánchez Sánchez<sup>8</sup>

### Resumen

La valoración seminal es de gran importancia para determinar las características espermáticas del semen y de esta manera poder saber el potencial de fertilidad en los machos reproductores. En este trabajo se describe a detalle la valoración seminal macroscópica y microscópica que se debe realizar a los machos reproductores con el fin de verificar su potencial de fertilidad.

*Palabras clave: Semen, valoración, macroscópica, microscópica.*

### Seminal assessment in animal production units.

#### Summary

The seminal evaluation is of great importance to determine the sperm characteristics of the semen and in this way to be able to know the fertility potential in the reproductive males. This work describes in detail the macroscopic and microscopic seminal assessment that must be performed on reproductive males in order to verify their fertility potential.

*Key words: Semen, assessment, macroscopic, microscopic.*

*1Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Ciudad de México, México. 2FMVZ-UNAM. 3Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 4 Departamento de farmacología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 5Faculta de Veterinaria. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 6Faculta de Veterinaria. Universidad Autónoma de Guerrero, México. 7División Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 8Dpto. Reproducción Animal ? INIA Ctra. de La Coruña, Km 5,9 28040, Madrid, España.*

### Introducción

En los centros de inseminación artificial (CIA), Unidades de Producción Animal (UPA) o en los laboratorios, es necesario realizar evaluaciones de la capacidad fecundante de los machos reproductores, ya que, por lo general, los sementales asociados con una fertilidad reducida, pueden presentar algunas alteraciones que se logran detectar mediante un análisis seminal rutinario, al igual, que al momento de elegir un semental se recomienda hacer al menos 3 pruebas seminales previas con una diferencia de 7 días, con el fin de predecir la fertilidad del individuo. También, es importante mencionar que no todos los eyaculados pueden mantener niveles de fertilidad dentro de la normalidad, por lo que es indispensable que en cada ocasión que se extraiga semen, debe ser evaluado mediante un

conjunto de pruebas que pueden ser tanto macroscópicas como microscópicas (Restrepo *et al.*, 2009; Bruzzone, 2012; Almaguer *et al.*, 2015; Estupiñan y Palacio, 2016)

Dentro de las pruebas macroscópicas seminales se incluyen aquellas variables que se pueden valorar a simple vista (pH seminal, color del eyaculado, olor del eyaculado, volumen y consistencia), no debe de realizarse más de una hora después de haber obtenido el eyaculado, para evitar deshidratación y/o cambios de temperatura que alteren la calidad del semen (Gimeno, 2014). En las pruebas microscópicas se analizan las características de los espermatozoides, para su realización es imprescindible la utilización de un microscopio de contraste de fases (Gimeno, 2014; Abalde, 2015), y dentro de estas pruebas se encuentran la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal (NAR), aglutinación espermática, concentración y morfología espermáticas.

Sin embargo, existe un conjunto de pruebas microscópicas que se han ido incorporando con el fin de aumentar la certeza de la capacitación de fecundación seminal, estas pueden ser: formación de radicales libres, funcionalidad e integridad mitocondrial, fragmentación de ADN espermático, análisis de cromatina espermática, entre otras; que son realizadas por equipo asistidos por computadoras o por sus siglas en inglés Computer Assisted Semen Analysis (CASA) o también por citometría de flujo, las cuales han permitido tener una medición más objetiva y sofisticada, ofreciendo observaciones confiables, aumentando la precisión y reproducción de las mediciones, además de poder conservar por medio de video-documentación las muestras analizadas, dentro de estos sistemas CASA podemos encontrar el ISAS® (Integrated Semen Analysis System), CEROS® (Sperm Analyzer) y SCA® (Sperm Class Analyzer; Microptic S.L.); existen otros dispositivos de análisis espermático como es el SQA® (Sperm Quality Analyzer) y el IVOS® (Integrated Visual Optical System). Sin embargo, requieren equipo especializado y reactivos de alto costo, complicadas de conseguir, haciendo estas técnicas poco comunes y accesibles de realizar, principalmente en las UPP (Muiño, 2008; Restrepo *et al.*, 2013; Tejo *et al.*, 2013; García, 2014; Ariagno y Mormandi, 2016; Iglesias *et al.*, 2019)

## **Macroscópica**

### **pH**

Generalmente se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador y es necesario siempre evaluarlo inmediatamente después de la recolecta seminal, ya que el pH del semen normalmente aumenta con el tiempo, debido a la pérdida de CO<sub>2</sub> que se produce luego de la eyaculación (Caiza, 2009; Ariagno y Mormandi, 2016; Córdova *et al.*, 2019)

El pH se genera por el resultado de las secreciones acidosis provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales, el pH de semen de verraco puede ir desde 6.5 a 7.4 (Caiza, 2009; Córdova *et al.*, 2019)

El método más utilizado para medir el pH seminal es por medio de tiras reactivas de pH, y para medirlo es necesario colocar una gota de semen en la tira reactiva y esperar a que el color vire, para indicarnos el pH de la muestra seminal, cabe mencionar que el uso de tiras reactivas no es tan preciso, por lo que se usa solamente para conocer el valor inmediato de pH seminal.

Otra forma de evaluación, es mediante el uso de potenciómetro, el cual proporciona un valor preciso y confiable, sin embargo, es necesario siempre asesorarse que el potenciómetro este calibrado.

### Color

Es evaluado mediante la observación directa del eyaculado colectado, el cual debe de tener una apariencia homogénea. El color va a depender del contenido de riboflavina y la concentración espermática, pero por lo general tiene un color desde gris claro (blanquecino), hasta lechoso opaco (Toro, 2009; Córdova *et al.*, 2019).

También puede presentar otras tonalidades, que pueden indicar alteraciones patológicas del aparato reproductor como son leucocitospermia (amarillento) o hemospermia (rojizo/amarronado) (Figura 1), colores que puedan indicar la ingesta de vitaminas o contaminaciones con orina durante el eyaculado (Córdova *et al.*, 2015; Ariagno y Mormandi, 2016).



**Figura 1.** Muestras espermáticas. El contenedor de lado izquierdo tiene presencia de sangre (hemospermia), la muestra de en medio está contaminada por partículas, dándole un color gris/café y la muestra del contenedor a la derecha, representa una muestra normal con coloración blanco-lechoso.**Olor**

El olor del semen es muy particular, por lo que se describe como *sui generis* y puede estar caracterizado ligeramente por las feromonas del aparato genital del verraco (Caiza, 2009)

### Volumen

La edad es uno de los factores que pueden influir en el volumen del eyaculado, es decir, a mayor edad, el volumen del eyaculado va aumentando (Del valle, 2017).

Para cuantificarlo es necesario probetas graduadas, donde es determinado por la observación directa de la muestra luego de la colecta; también se puede evaluar en una balanza digital, en donde se considera que  $1g=1mL$ , pudiendo alcanzar volúmenes desde 150 a 400 mL por eyaculado (Figura 2) (Lorenzo, 2008; Caiza, 2009; Del valle, 2017; Córdova *et al.*, 2019). Es importante que, a la hora de la lectura en la probeta, evitar la formación de espuma para que no dificulte la lectura del volumen.



**Figura 2.** Muestra espermática en contenedor de unicel, pesada en balanza digital, para conocer el volumen eyaculado del verraco.**Consistencia**

La consistencia adecuada del semen es líquida, claro-acuosa, hasta cremosa-espesa/cremosa-lechosa, pero, al igual que el color, va a depender de la relación entre el plasma seminal y la concentración de espermatozoides por mL de eyaculado (Córdova *et al.*, 2019).

Se pueden utilizar dos métodos para medir la consistencia, el primero, recomendable y más sencillo, consiste en recoger la muestra con una pipeta Pasteur y dejar caer algunas gotas de semen, considerándose normal si la caída es gota a gota por separado; el segundo método se hace introduciendo una varilla de vidrio o agitador de vidrio en la muestra y se observa el filamento que forma al momento de retirarla, para que se considere normal, el filamento debe ser de más de 2 cm (Ariagno y Mormandi, 2016).

## **Microscópica**

### **Motilidad progresiva**

La prueba de motilidad progresiva es la técnica más utilizada para hacer una aproximación de la evaluación general de la calidad del semen obtenido.

Para la evaluación de la motilidad progresiva se sigue el protocolo de Bonet *et al.* (2006) y Del valle, (2017) de la siguiente forma:

- Atemperar el semen, porta objetos y cubre objetos a 37°C
- Colocar una gota de semen (8-12  $\mu$ L) en un porta objetos y cubrirlo con un cubre objetos
- Colocar la muestra en un microscopio óptico y enfocar a 40 aumentos (40X).
- Los espermatozoides que tengan movimiento rectilíneo uniforme se tomarán como positivos, los espermatozoides que tengan otro tipo de movimiento serán negativos, es necesario contar 100 espermatozoides, ya que el cálculo se expresa en porcentaje.

El valor mínimo aceptable de motilidad progresiva espermática para IA con semen de verraco es el 70%, sin embargo, depende del uso que se le quiera dar al semen, por ejemplo, si se quiere para fines de investigación en semen fresco, refrigerado o congelado, lo deseado es que la muestra tenga al menos un 80% de motilidad progresiva.

La valoración de motilidad progresiva con microscopio óptico es considerada subjetiva, ya que depende de la experiencia del evaluador, sin embargo, es la técnicas más utilizadas en las UPP, por lo que se sugiere que siempre sea el mismo evaluador quien la realice o

hacer la evaluación por "ojo ciego", que consiste en tres personas evaluando la muestra y hacer una media de los porcentajes obtenidos de los tres resultados.

Existen otras técnicas más sofisticadas que son apoyadas por equipo computarizado que tiene sensores eléctricos y permiten obtener indicadores del porcentaje de movimiento espermático, velocidad, tipos de movimiento, trayectoria y desplazamiento angular, entre otros. Sin embargo, este tipo de sistemas, tienen algunos inconvenientes al ser utilizados con espermatozoides de verraco, debido a su alta variabilidad en función de la temperatura, actividad inhibitoria del plasma seminal y concentración espermática (Córdova *et al.*, 2015)

### **Viabilidad**

La viabilidad o vitalidad espermática hace referencia a la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide y regularmente es evaluada por el método de exclusión de eosina-negrosina. Al morir el espermatozoide, se pierde la selectividad de su membrana plasmática, lo que ocasiona que el espermatozoide sea incapaz de mantener las concentraciones necesarias de iones y solutos, perdiéndose importantes metabolitos y coenzimas, lo que conduce a la supresión de las funciones vitales (Bonet *et al.*, 2006), por lo que, al calcular la viabilidad espermática, se observan aquellos espermatozoides que están teñidos (muertos) y los que no están teñidos (vivos) (Figura 3). El mínimo valor aceptable de la viabilidad espermática en una muestra es el 80%.

Para su evaluación, se sigue de la explicación de Montes (2012), de la siguiente forma:

- Colocar una gota de eosina-negrosina de 4  $\mu$ L en un porta objetos.
- Colocar una gota de semen de 12  $\mu$ L a lado de la gota de eosina-negrosina previamente colocada en el porta objetos.
- Realizar movimientos oscilatorios con el porta objetos hasta que se mezclen perfectamente las gotas de la tinción y del semen.
- Hacer un barrido de la muestra a lo largo del porta objetos.
- Dejar secar la laminilla a temperatura ambiente por 15 min.
- Contar 100 células espermáticas en al menos 5 cuadrantes diferentes, en un microscopio óptico a 40 aumentos (40X) y calcular el porcentaje de espermatozoides vivos en el objetivo.





**Figura 3.** Prueba de viabilidad por tinción de eosina nigrosina. A: espermatozoides muertos (se observan teñidos de color morado). B: espermatozoides vivos (se pueden observar sin tinción o un color ligeramente rosado). Tinción: Eosina-Nigrosina. También se pueden usar otras pruebas donde son utilizados fluorocromos (isocianato de fluoresceína, rodamina y ficoeritrina) que no solo permiten obtener la viabilidad espermática, si no, también información de la estructura y función de la membrana (Ávalos *et al.*, 2018)

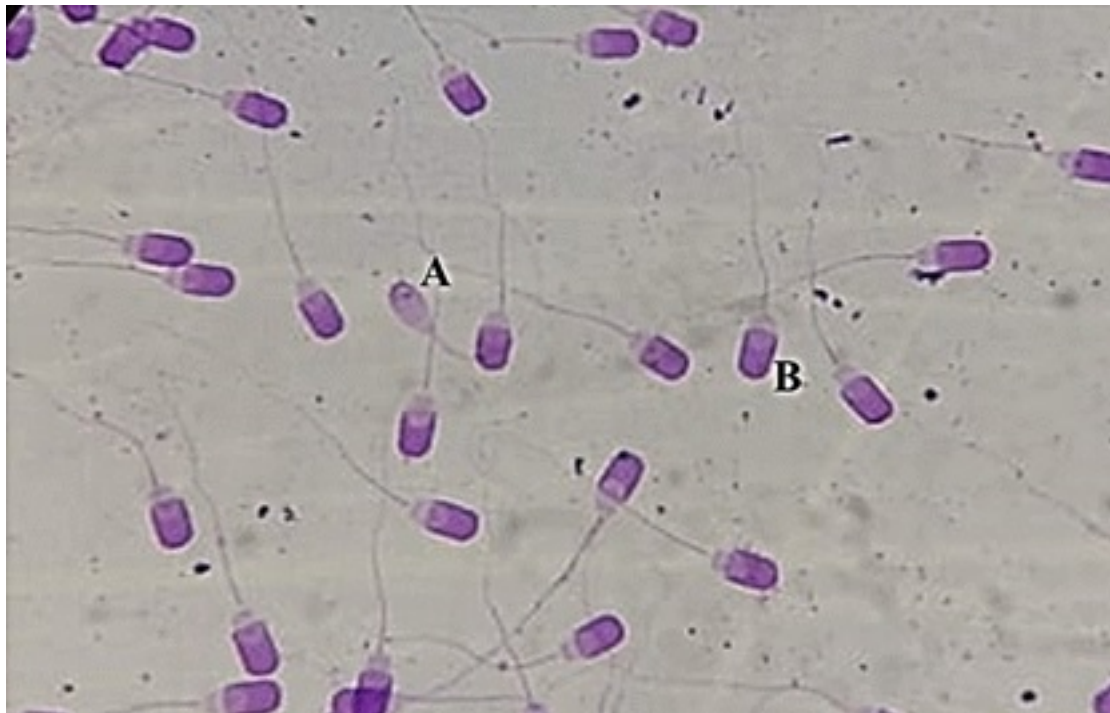
### **Borde apical normal o análisis acrosomal (NAR)**

El acrosoma es una vesícula secretora del espermatozoide ubicada en la parte apical de la cabeza espermática, contiene diferentes enzimas responsables de la digestión del *cumulus oophorus* y de la zona pelúcida; los daños en el acrosoma pueden generar pérdida de la capacitación fecundante de los espermatozoides, por lo que es importante valorar la NAR de los espermatozoides (Iglesias *et al.*, 2019). El valor mínimo aceptable de NAR en una muestra es 90% de espermatozoides con acrosoma intacto.

El porcentaje de NAR se realiza conforme a la técnica de Iglesias *et al.* (2019), de la siguiente forma:

- Colocar una gota (10µL) de semen en un porta objetos
- Realizar un barrido a lo largo del portaobjetos de la gota colocada
- Dejar secar a temperatura ambiente

- Fijar la muestra colocando el portaobjetos con una inclinación de 35°, en el que se vierte alcohol de 96° a chorro lento y continuo durante 5 segundos, procurando no tocar el barrido
- Dejar secar la muestra a tempera ambiente o en una platina a 36°C
- Teñir el portaobjetos con tinción Giemsa (Sigma-Aldrich), previamente preparado con 0.6 g de Giemsa, en 20 mL de agua destilada, durante 25 min.
- Enjuagar con agua destilada de la misma forma en la que se colocó el alcohol en el punto 4
- Dejar secar la muestra a tempera ambiente o en una platina a 36°C
- Evaluar la muestra en un microscopio óptico a 100 aumentos (100X), con ayuda de aceite de inmersión, contando 100 células, considerando con acrosoma intacto aquellas que presentan el borde apical del espermatozoide teñido intensamente (Figura 4)



**Figura 4.** Prueba de NAR, espermatozoides teñidos con tinción Giemsa. A: espermatozoide sin acrosoma intacto. B: espermatozoides con acrosoma intacto. Tinción: Giemsa. **Aglutinación espermática**

La aglutinación es el cúmulo de células más o menos grandes, algunas de las posibles causas que pueden existir para que se presente aglutinación espermática, es la presencia de restos de gel que proceden de las glándulas bulbouretrales (filtrado defectuoso durante la extracción seminal), concentraciones muy elevada de los espermatozoides del eyaculado, mala calidad espermática (espermatozoides muertos o con baja viabilidad, shock térmico por manipulación inadecuada del semen, contaminación bacteriana del



eyaculado (bacterias resistentes a la gentamicina pueden provocar aglutinación del semen), presencia de gran cantidad de células epiteliales, descamaciones y cambios en el pH del plasma seminal (asociado a procesos inflamatorios o disfunciones que afectan las glándulas accesorias del verraco) (Caiza, 2009; Córdova *et al.*, 2015).

La aglutinación se puede medir al momento de evaluar la motilidad seminal y su clasificación se evalúa utilizando la metodología de Del valle, (2017) y Ávalos *et al.* (2018) y, en una escala de (0 a +++ o 0 a 3) de la siguiente manera:

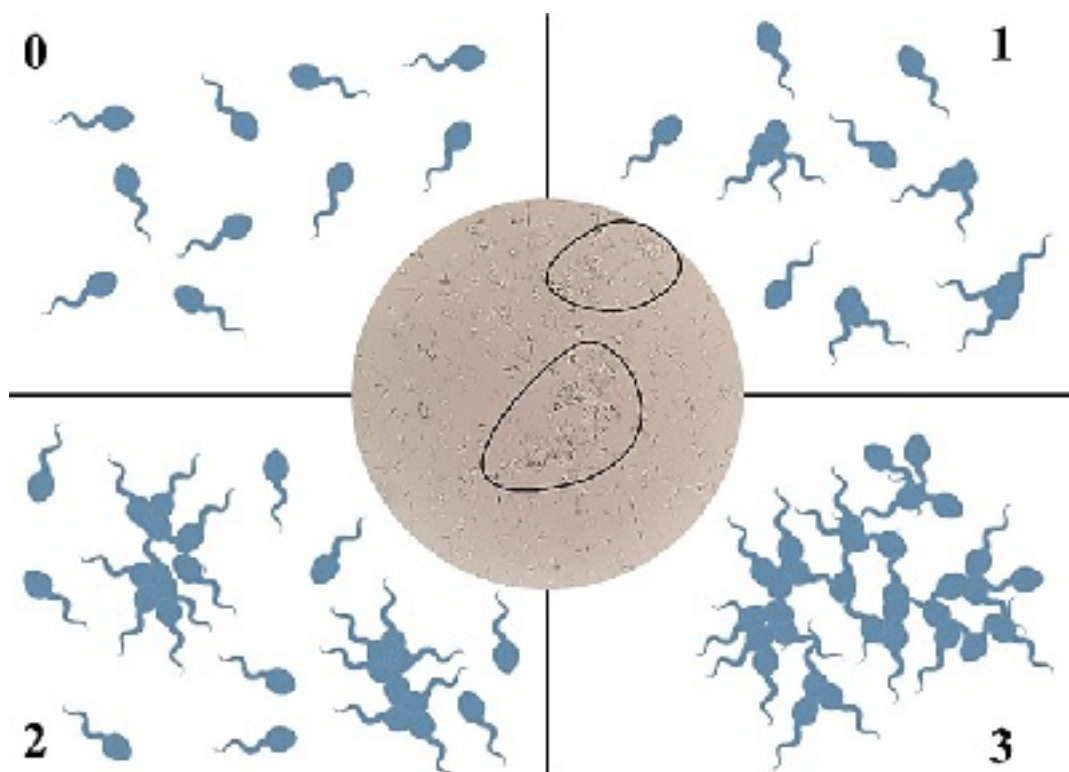
- Sin aglutinación

+ o 1: Unión entre algunos espermatozoides (solo en algunos casos / ligeramente aglutinados)

++ o 2: Unión evidente de espermatozoides (en todos los campos evaluados / aglutinados)

+++ o 3: Agrupamiento masivo de todos los espermatozoides (en todos los campos evaluados / muy aglutinados, más del 30-40% de espermatozoides aglutinados ) (Figura 5)

En algunas ocasiones, la presencia de aglutinación leve (0 a 2 ), desaparece al realizar la mezcla del eyaculado con el diluyente (Córdova *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Escalas de aglutinación espermática. En la esquina superior izquierda (0) no hay aglutinación; en la esquina superior derecha (1) se observa la unión entre algunos espermatozoides (+); en la esquina inferior izquierda (2) se puede observar la unión evidente de los espermatozoides (++); en la esquina inferior derecha (3) se muestra un agrupamiento masivo de espermatozoides (+++); la imagen del centro fue tomada con microscopio óptico, en un objetivo de 40X, donde se observa dentro de los círculos negros, el grado ++ de aglutinación espermática.

#### **Concentración espermática**

La concentración espermática es el número de espermatozoides por mL en el eyaculado y puede ser evaluada por varios métodos, desde los convencionales y más utilizados en laboratorios y UPP: el uso de la cámara de Bürker (más utilizada en Europa) y la cámara de Neubauer (más utilizada en América) principalmente en México; hasta los más objetivos: espectrofotometría, colimetría y citometría de flujo (Córdova *et al.*, 2019).

En el caso particular de la concentración espermática en el semen de verraco, presenta una gran variabilidad, que depende de la frecuencia de recolección, edad del verraco, alimentación, manejo, etc.; un verraco sano puede producir entre  $10 \times 10^9$  y  $12 \times 10^9$  de espermatozoides por día, teniendo una concentración espermática en el eyaculado de  $50 \times 10^9$  a  $85 \times 10^9$  de espermatozoides totales, teniendo un rango promedio de 200 a 300 millones de espermatozoides/mL (Lorenzo, 2008).

Para el recuento de espermatozoides se puede utilizar la cámara de Neubauer con la técnica de Gutiérrez *et al.* (2009), de la siguiente forma:

- Diluir y homogenizar 25  $\mu\text{L}$  de semen en 500  $\mu\text{L}$  de tritón (previamente preparado al 0.1% con solución Phosphate Buffered Saline (PBS)).
- Llenar ambos lados de la cámara de Neubauer.
- Colocar la cámara de Neubauer en el microscopio óptico a 40 aumentos (40X), para proceder a contar los espermatozoides
- Se cuentan 5 cuadrantes de cada lado de la cámara, si hay espermatozoides sobre la línea que divide dos cuadrados adyacentes, solo se cuentan los que están en el lado superior e izquierdo y se descartan los que estén en el lado derecho e inferior (Figura 6)
- Se cuentan ambos lados de la cámara de Neubauer y los resultados se promedian, si los recuentos de ambos lados de la cámara muestran mucha variación, se debe de preparar la cámara nuevamente, limpiarla y volverla a llenar.
- Para conocer el número de espermatozoides/mL en el eyaculado obtenido, es necesario emplear la siguiente fórmula:

$\text{N}^\circ$  de células espermáticas contadas en la cámara X 21 (Factor de dilución) X 10000 (capacidad de llenado de la cámara) X 5 ( $\text{N}^\circ$  de cuadrantes contados en la cámara).

10000 es un factor que surge de:

X 10: superficie de 1  $\text{mm}^2$

X 10: altura de la cámara de 1  $\text{mm}^3$

X 100: dilución realizada

Ejemplo:

$165 \times 21 \times 10000 \times 5 = 173,250,000$  de espermatozoides en un mL de muestra

- En caso de querer conocer la cantidad de muestra que se tiene que obtener de un eyaculado para congelar semen en cierto número de pajillas de 0.5 mL o 0.25 mL, a una concentración deseada, se emplea la siguiente fórmula:

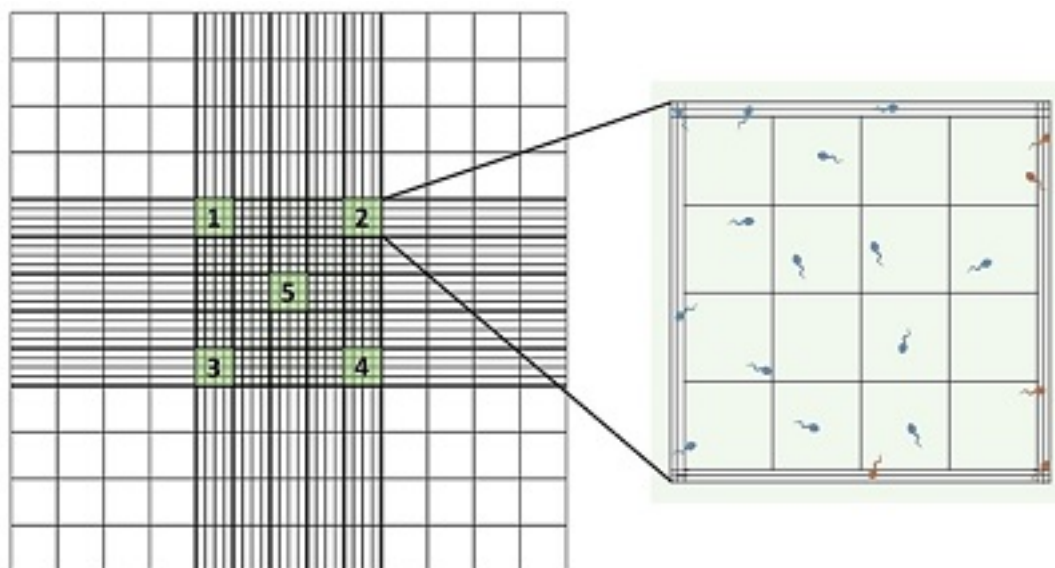
$\text{VI} = \frac{\text{VI}}{\text{VI}}$  [ ] [Concentración obtenida en un mL de muestra]

Ejemplo:

$\text{VI} = 6 \text{ cél/mL}$

173.250×106 cél.mL.

VI=20.779 mL de muestra requerida.



**Figura 6.** De lado izquierdo se señalan los cinco cuadrantes que se deben contar de la cámara de Neubauer. De lado derecho se observan uno de los cuadrantes de la cámara, de color azul son los espermatozoides que se cuentan, de color naranja son los espermatozoides que no se cuentan.**Ejercicio 1:**

Se desea congelar 20 pajillas de semen de 0.5 mL, a una concentración espermática de 300×106 por pajilla, si la concentración espermática calculada en la cámara de Neubauer es fue de 152 470 000 de espermatozoides/mL ¿Qué cantidad de diluyente para congelación necesito preparar<- ¿Qué cantidad de muestra necesito<-

**Procedimiento:**

Si se desea congelar 20 pajillas de 0.5 mL, entonces se necesita preparar un mínimo de 10 mL de diluyente, pero siempre, en la práctica se prepara 1 mL de más, para evitar la formación de burbujas durante el llenado de la pajilla, por lo tanto, se requerirá preparar 11 mL de diluyente (5.5 mL de diluyente "A" y 5.5 mL de diluyente "B").

- Una vez calculada la cantidad de diluyente a preparar, se puede aplicar la formula antes mencionada:

$$VI = \frac{VI=6 \text{ cél/mL})}{[ ]} \quad 154.470 \times 106 \text{ cél.mL.}$$

VI= 42.72 mL de muestra requerida.

### **Ejercicio 2:**

Se desea congelar 6 pajillas de semen de 0.50 mL, a una concentración espermática de  $150 \times 10^6$  por pajilla, si la concentración espermática calculada en la cámara de Neubauer es fue de 96 420 000 de espermatozoides/mL ¿Qué cantidad de muestra necesito<-

### **Procedimiento:**

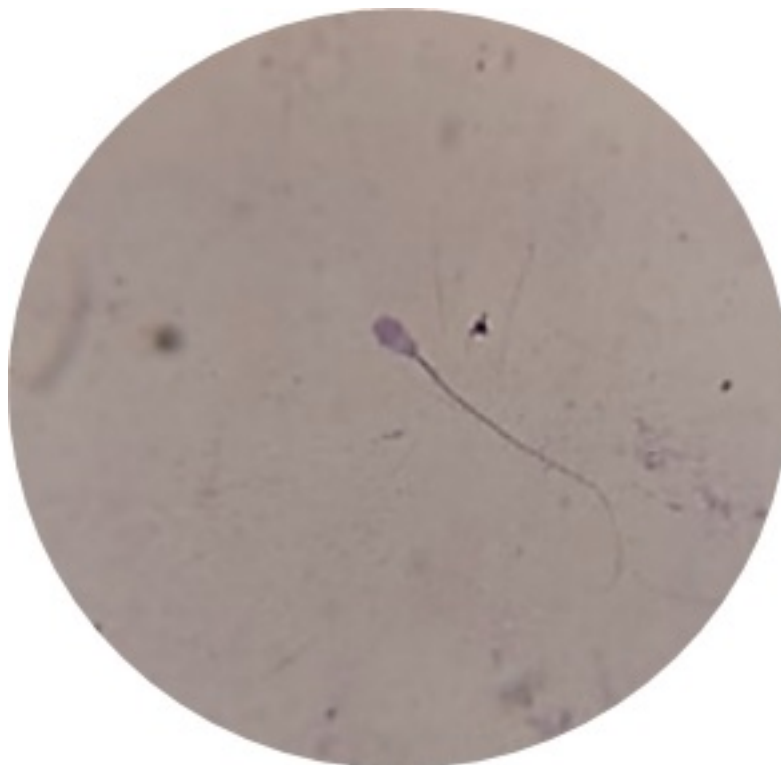
VI=6 cél/mL

$96.420 \times 10^6$  cél.mL.

VI= 12.445 mL de muestra requerida.

### **Morfología espermática**

La evaluación de la morfología espermática se realiza durante la valoración de la motilidad espermática y se deben contar 200 células por muestra, determinándose todas las anomalías que se observen en los espermatozoides. La morfología aceptable (Figura 7) en una muestra, no debe de exceder el 20% de espermatozoides con anomalías (Toro, 2009; De Mercado, 2011; Aké *et al.*, 2012; Del valle, 2017)



**Figura 7.** *Morfología normal de espermatozoide de verraco. Muestra teñida con Giemsa observada en microscopio óptico a 100 aumentos (100X). Tinción: Giemsa.***Formación de Radicales Libres por citometría de flujo**

En la evaluación de la producción de Radicales Libres por citometría de flujo se utiliza 2',7'-di-acetato de dicloro-di-hidrofluoresceína (DCFH-DA en una concentración final de 1  $\mu$ M). La suspensión de células se incuba en una concentración de  $3 \times 10^6$  espermatozoides, protegida de la luz durante 30 min a 25°C con DCFH-DA (previamente preparada) y con Ioduro de Propidio (IP) (concentración final de 12  $\mu$ M) para excluir los espermatozoides necróticos/muertos, se lava 3 veces con solución PBS centrifugándolo a 180 g, durante 5 minutos; el botón del paquete espermático se suspende en PBS antes de ser analizados en un citómetro de flujo equipado con un láser de 488nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de espermatozoides negativos para Ioduro de Propidio y positivos para 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCF) que exhiben fluorescencia en verde: espermatozoides vivos que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Esto debido a que al ingresar el DCFH-DA en la célula espermática, sufre la escisión de los grupos acetato por las esterasas intracelulares; el DCFH resultante, no fluorescente, es oxidado por las ROS y RNS (específicamente por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ )) hasta DCF el cual flúorese en verde al ser excitado por el láser azul usado en el citómetro de flujo (Vasco *et al.*, 2008; García, 2015; Gumbao, 2015; Mayorga *et al.*, 2015; Jordão, 2013; Lalinde y Cardona, 2017).

### **Fragmentación de ADN por citometría de flujo**

El análisis de la Fragmentación de ADN se valora por el método del Ensayo de la estructura de la cromatina de espermatozoides (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA por sus siglas en inglés), en el cual se desnaturaliza la molécula del ADN mediante una solución ácida, que es preparada pesando en una balanza de precisión los reactivos necesarios para conseguir una concentración final de 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100 y 80 mM HCl (los reactivos se disuelven en agua milli-Q en una probeta de vidrio del volumen deseado). Una vez disueltos todos los componentes, se enrasa con agua ultrapura milli-Q hasta conseguir el volumen final deseado, que se ajusta a un pH de 1.2 con la ayuda de un potenciómetro. Una vez desnaturalizada se tiñe con el colorante naranja de acridina (AO) que es preparada pesando en un vial de vidrio entre 3-6 mg y se le añade agua milli-Q hasta conseguir una concentración final de 1 mg/mL de AO; la solución se pasa a una botella específica para la solución de tinción y se añade el volumen adecuado de la solución stock de AO (6 mL de solución stock de AO por cada litro de solución final), la botella se cubre completamente con papel de aluminio, para evitar que la luz incida sobre ella. El fluorocromo se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una longitud de onda de 530 nm que se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN fragmentado) emite una longitud de onda de 640 nm, visualizándose de color rojo-anaranjado (Cortés *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2007; Molinero, 2014; Quintero, 2015).

El grado de desnaturalización del ADN se cuantifica por el parámetro Índice de



fragmentación del ADN (DFI, por sus siglas en inglés de ADN Fragmentation Index), que es el resultado de la fluorescencia roja, dividida entre la fluorescencia roja y verde (Fluorescencia total) (Molinero, 2014).

### **Bibliografía**

Abalde Graña Sandra. (2015). Evaluación de la motilidad espermática usando dos crioprotectores [Trabajo fin de Máster, Universidad de Coruña].  
[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14784/AbaldeGrana\\_Sandra\\_TFM\\_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14784/AbaldeGrana_Sandra_TFM_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Aké, L. J. R., Martínez, G. E. H., y Centurión, C. F. G. (2012). Efecto de los diluyentes Triladyl y Seagear sobre la congelación de semen canino. *Cuerpo Académico de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético*, 5 (1), 29-32.  
<http://www.ccba.uady.mx/bioagro/V5N1/Articulo%206.pdf>

Almaguer, P. Y., Font, P. H., Rosell, P. R., Quirino, C. R., y Montes, T. I. (2015). Evaluación de la calidad seminal en seminales porcinos en un Centro de Inseminación Artificial. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(5), 1-7.  
<https://www.redalyc.org/pdf/636/63638742006.pdf>

Ariagno, J., y Mormandi, E. (2016). Guía práctica para la evaluación del semen. *ByPC*, 80(3), 29-36.  
[revista-aba-80-3-2016-guia-practica-para-la-evaluacion-ariagno-y-col-web%20\(12\).pdf](http://www.revista-aba-80-3-2016-guia-practica-para-la-evaluacion-ariagno-y-col-web%20(12).pdf)

Ávalos, R. A., González, S. J. A., Vargas, I. A. K., y Herrera, B. J. A. (Eds). (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Universidad Autónoma Metropolitana.  
[http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion\\_manipulacion.pdf](http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf)

Bonet, S., Martínez, E., Rodríguez, E. J., y Barrera. X. (2006). *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina: 1-306.

Bruzzone, E. (2012). Un servicio exitoso. *PRAXIS*, 18 (6), 4-6.  
<https://aveaca.org.ar/segunda-edicion-de-praxis/>

Caiza Marcillo D. J. (2009). *Manejo de verracos para la obtención y procesamiento de semen porcino e inseminación artificial*. [Tesis licenciatura, Escuela Politécnica Nacional].  
<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1667/1/CD-1959.pdf>

Córdova, A., Pérez, J., Méndez, W., Villa, A., y Huerta, R. (2015). *Obtención, evaluación y*

manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Revista Mexicana*, 26 (1), 69-74. <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/253>

Córdova, I. A., Pérez, G. J. F., Méndez, H. W., Villa, M. A. E., y Huerta, C. A. E. (2015). Obtención evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Revista Veterinaria*, 26 (1), 69-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.261253>

Córdova, I. A., Torres, T. D. I., Iglesias, R. A. E., Guerra, L. J. E., Huerta, C. R., Villa, M. A. E., Ruíz, L. G., Espinosa, C. R., Juárez, M. M. L., Sánchez, A. R. (2019). Valoración reproductiva del toro. *Ganadero*, 44 (1), 78-88.

Cortés, G. E. I., Dávila, R. M. I., López, F. C., Fernández, J. L., y Gosalves, J. (2007). Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urol. Esp.*, 31(2), 120-131. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0210-48062007000200008&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062007000200008&lng=es&tlng=es).

Del-Valle, R. A. (2017). Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en la monta natural. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18 (10), 1-17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653470023>

Estupiñán Méndez, J. A., y Palacio Silva, M. J. (2016). Evaluación de la calidad de semen refrigerado bajo el efecto de dos diluyentes en la granja porcícola Villa Alejandra [Trabajo de Licenciatura, Universidad Industrial de Santander].

García, D. E. C. (2015). Efecto del estrés agudo y crónico en el estado antioxidante del testículo y en la calidad de los espermatozoides epididimarios de la rata adulta [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16969&docs=UAMI16969.pdf>

García, V. W. C. (2014). Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranosa, [Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://hdl.handle.net/10803/284242>

Gimeno Miquel Isabel. 2014. Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos. [Tesis de licenciatura, Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46241/TFG%2520Isabel%2520Gimeno.pdf?sequence=1>

Gumbao Baño, D. (2015). Efecto antioxidante del glutati6n aplicado en el medio de

descongelación seminal de tres especies con interés pecuario. [Tesis de licenciatura, Universidad de Murcia]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/362912#page=1>

Gutiérrez, P. O., Juárez, M. M. L., Uribe, C. S., y Trujillo, O. M. E. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glicerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 59, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.02.003>

Iglesias, R. A., Guevara, G. J., López, D. O., Guerra, L. J., Huerta, C. R., Sánchez, S. R., y Córdova, I. A. (2019). Evaluación de la técnica modificada de tinción Giemsa en la valoración acrosomal de espermatozoides de mamíferos. *Abanico Veterinario*, 9 (1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.927>

Jordão Affonso, F. (2013). Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado. [Tesis de Maestría, Universidade de São Paulo]. <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vtt-12449>

Lalinde, A. P. C., y Cardona, M. W. D. (2017). Selección espermática in vitro: espermatozoides con mejores características funcionales. *Revista Urología Colombiana*, 26 (1), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.uroco.2016.04.007>

Mayorga, T. J. M., Peña, B., Cadavid, A. P., y Cardona, M. W. D. (2015). La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 80(3), 265-268. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262015000300012>

Molinero García, N. (2014). Fragmentación del ADN espermático en muestras procedentes de clínicas de reproducción asistida. [Tesis de Maestría, Universidad de Oviedo]. <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/27705/6/Natalia.pdf>

Montes, M. (2012). Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en criopreservación de espermatozoides de Lenguado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner, 1867). [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/575>

Morales, R. L. B., Ortiz, J. A., Rodríguez-Arnedo, D., Fabregat, A., y Bernabeu, R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 24(5), 305-313. <http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Ferti%20Sept-oct-07trab-3.pdf>

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. [Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela].  
<http://hdl.handle.net/10347/2406>

Quintero, V. G. A., Bermúdez, C. R. M., y Castillo, C. J. (2015). Infertilidad Masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>

Restrepo, B. G., Úsuga, S. A., y Rojano, B. A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8 (1), 69-81.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1900-96072013000100010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072013000100010)

Restrepo, B. G., Vásquez, A. N., y García, E. A. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES*, 4 (2), 119-122.  
<https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102012.pdf>

Toro Montoya, A. I. (2009). Espermograma. *Medicina y Laboratorio*, 15 (3-4): 145-169.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl093-4c.pdf>

Trejo, C. A., Meza, V. V. M., Antonio, E. C., Cotera, R. J., y Antonio, C. C. M. (2013). Agua de coco (*Cocus nucifera*) como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Arch. Zootec*, 62 (238), 299-302.  
<https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922013000200017>

Vasco, M. D., Hernández, M. M., Vásquez, J. M., Martínez, E., y Roca, J. (2008). Sustancias oxígeno reactivas (ROS) en semen congelado-descongelado de porcino. *Ciencia y Tecnología*, 1, 23-29.  
[https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_articulo5.pdf](https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo5.pdf)

---