

*Tesis Doctoral*

# Estudio de la calidad seminal del toro de Lidia: Fragmentación del ADN espermático



Autor: Raquel Posado Ferreras

Línea de Investigación en Rumiantes



INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
AGRARIO

Junta de Castilla y León  
Consejería de Agricultura y Ganadería





*Tesis Doctoral*

**Estudio de la calidad seminal del toro de Lidia:  
Fragmentación del ADN espermático**

Autor: Raquel Posado Ferreras

Línea de Investigación en Rumiantes

*Edita: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.*

*© Copyright: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.*

*Fotografías: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.*



Esta publicación es una versión reducida y divulgativa de la memoria de Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA CALIDAD SEMINAL DEL TORO DE LIDIA: FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO" dirigida por el Dr. José Jaime Gosalvez Berenguer, Dra. Carmen López Fernández, Catedrático y Profesora Titular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid y Dra. Marta Hernández Pérez, investigadora del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León y defendida por Dra. Raquel Posado Ferreras el 27 de septiembre de 2014 en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, obteniendo la calificación de Sobresaliente.

Proyecto 2009/984. "Implementación de nuevas tecnologías para la mejora de la producción del ganado de lidia". Duración 2009 – 2012. Financiación autónoma y MICINN.





# Índice

<b>Introducción</b> .....	11
<b>1. La raza de Lidia</b> .....	13
1.1. Selección .....	14
1.2. Manejo de la reproducción.....	15
<b>2. La raza Blanca Cacereña</b> .....	16
2.1. Manejo de la reproducción.....	16
<b>3. Evaluación del semental</b> .....	17
3.1. Sistemas de recolección de semen .....	17
3.1.1. Vagina artificial.....	17
3.1.2. Electroeyaculación.....	18
3.1.3. Postmórtem .....	19
<b>4. Evaluación de parámetros seminales</b> .....	20
4.1. Aspecto y volumen .....	20
4.2. Concentración espermática.....	21
4.3. Movilidad espermática.....	22
4.4. Anomalías morfológicas .....	23
4.5. Viabilidad espermática .....	24
<b>5. Estructura de la cromatina espermática</b> .....	25
<b>6. Lesiones de la cromatina espermática</b> .....	27
6.1. Espermatogénesis defectuosa.....	29
6.2. Apoptosis.....	29
6.3. Estrés oxidativo.....	30

<b>7. Fragmentación del ADN espermático</b> .....	31
7.1. Metodologías para la detección del daño en el ADN espermático .....	33
7.1.1. Test de Dispersion de la Cromatina Espermática (Scd Sperm Chromatin Dispersion) .....	33
7.1.2. Ensayo Cometa .....	35
<b>Objetivos</b> .....	37
<b>Material y métodos</b> .....	39
<b>1. Material</b> .....	39
1.1. Material biológico .....	39
1.1.1. Animales .....	39
<b>2. Métodos</b> .....	40
2.1. Colecta de material seminal .....	40
2.1.1. Electroeyaculación .....	40
2.1.2. Vagina artificial .....	41
2.1.3. Recogida <i>postmórtem</i> por flujo retrógrado .....	42
2.2. Procesado y congelación de material seminal .....	44
2.3. Descongelación de dosis seminales .....	44
2.4. Evaluación de parámetros espermáticos .....	45
2.4.1. Volumen .....	45
2.4.2. Concentración espermática .....	45
2.4.3. Movilidad espermática .....	46
2.4.4. Análisis con Sistema CASA del eyaculado bovino .....	46
2.4.5. Anomalías morfológicas .....	47
2.4.6. Análisis de la fragmentación del ADN espermático .....	47
2.4.6.1. Test de Dispersion de la Cromatina Espermática .....	47
2.4.6.2. Ensayo Cometa Neutro .....	48
2.4.7. Tinción de la viabilidad espermática .....	50
<b>Resultados</b> .....	51
<b>1. Características del ADN espermático bovino</b> .....	51
1.1. Verificación del Test SCD en bovino .....	51
1.2. Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino .....	52
1.2.1. Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal .....	53

<b>2. Factores que pueden influir en la calidad seminal de las razas de Lidia y Blanca Cacereña</b> .....	55
2.1. Raza bovina.....	55
2.2. Método de extracción utilizado.....	57
2.2.1. Extracción seminal por vagina artificial frente a Electroeyaculación en la raza Blanca Cacereña.....	57
2.2.2. Extracción seminal <i>postmórtem</i> en la raza de Lidia.....	58
2.3. Edad.....	60
2.3.1. Raza de Lidia.....	60
2.3.2. Raza Blanca Cacereña.....	61
<b>3. Dinámica de Fragmentación del ADN espermático bovino</b> .....	62
3.1. Efecto de la temperatura de incubación.....	62
3.1.1. Efecto de la extracción seminal <i>postmórtem</i> en la raza de Lidia.....	64
3.2. Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia.....	65
3.2.1. Estudio comparativo en dosis seminales procedentes del mismo eyaculado.....	66
3.2.2. Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental.....	67
3.3. Estudio comparativo en dosis seminales extraídas por vagina artificial y por electroeyaculación.....	68
<b>Discusión</b> .....	71
<b>1. Características Del ADN espermático bovino</b> .....	71
1.1. Verificación del Test SCD en bovino.....	71
1.2. Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino.....	72
1.2.1. Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal.....	75
<b>2. Factores que pueden influir en la calidad seminal de las razas de Lidia y Blanca Cacereña</b> .....	78
2.1. Raza bovina.....	78
2.2. Método de extracción utilizado.....	82
2.2.1. Extracción seminal por vagina artificial frente a electroeyaculación en la raza Blanca Cacereña.....	82
2.2.2. Extracción seminal <i>postmórtem</i> en la raza de Lidia.....	84
2.3. Edad.....	88

<b>3. Dinámica de fragmentación del ADN espermático bovino .....</b>	<b>92</b>
3.1. Efecto de la temperatura de incubación .....	93
3.1.1. Efecto de la extracción seminal <i>postmórtem</i> la raza de Lidia .....	en 95
3.2. Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación ADN espermático de la raza de Lidia .....	del 97
3.2.1. Estudio comparativo de dosis seminales procedentes del mismo eyaculado .....	98
3.2.2. Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental .....	99
3.3. Estudio comparativo en dosis seminales extraídas por vagina artificial y por electroeyaculación .....	100
<b>Conclusiones .....</b>	<b>101</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>103</b>

## Introducción

Actualmente, se está fomentando la producción de ganado vacuno en régimen extensivo para recuperar los sistemas tradicionales utilizados años atrás en nuestro país. Las razas bovinas autóctonas necesitan de una tecnificación de la producción en extensivo para que la ganadería resulte competitiva frente a otros sistemas de producción más rentables. En este contexto, resulta necesario incrementar la productividad del ganado rústico con la introducción de nuevas tecnologías en todos los aspectos productivos (alimentación, manejo, sanidad, genética, reproducción, etc.).

La crianza de la raza de Lidia por su comportamiento, características maternas y rusticidad es una actividad pecuaria muy diferente de las actividades ganaderas tradicionales con un objetivo principal, la producción de comportamiento, manifestado en la aptitud para la lidia. El mérito genético buscado con la selección de los reproductores está basado en parámetros etológicos difíciles de cuantificar como la rectitud y prontitud de la embestida, y morfológicos como las hechuras, el trapío o la cornamenta.

Otra raza autóctona es la raza Blanca Cacereña, de aptitud cárnica considerada en peligro de extinción (MAGRAMA, ARCA 2014). Las nuevas políticas europeas que favorecen la protección de los espacios naturales y el fomento de una agricultura sostenible, ha supuesto un punto de inflexión favorable para su recuperación. Desde 1970, se han realizado importantes esfuerzos por incrementar los efectivos de esta raza, pero su procedencia a partir de 51 individuos ha generado una alta consanguinidad y problemas de introgresión genética que han provocado severos problemas a nivel reproductivo.

De poco sirve la selección realizada en la raza de Lidia, y los esfuerzos por mejorar los censos de la raza Blanca Cacereña, si los animales presentan

bajas tasas de concepción, resultando necesario implantar en las ganaderías las actuales técnicas reproductivas existentes en el mercado, como por ejemplo, el examen de fertilidad a futuros sementales.

El examen andrológico incluye un reconocimiento físico previo y un estudio de la integridad, normalidad anatómica y funcional de las gónadas y sus envolturas, y un buen funcionamiento del aparato reproductor del semental. Si dicho examen resulta normal, se realiza la recogida y posterior evaluación del eyaculado. Los análisis rutinarios incluyen el estudio de características seminales clásicas como el volumen seminal, la concentración, movilidad, viabilidad, morfología. Sin embargo, en la práctica se ha comprobado que eyaculados con valores semejantes en los parámetros citados presentan importantes variaciones en los resultados de fertilidad individual. Entre las posibilidades que otorgan las nuevas tecnologías se incluye una mejora de la valoración seminal tradicional, siendo posible conocer y analizar complejas funciones del esperma lo que ha incrementado el listado de defectos espermáticos diagnosticables, cuya evaluación no era factible con la tecnología disponible en el pasado más reciente.

El presente trabajo tiene como finalidad estudiar nuevos parámetros seminales con innovadoras herramientas de análisis reproductivo, como el análisis de la fragmentación del ADN espermático, que permitan poner de relieve la importancia de la valoración de la calidad de los espermatozoides en el eyaculado del semental para asegurar una buena fertilidad en la explotación ganadera.

## 1. La raza de Lidia.

La raza de Lidia es una raza autóctona española caracterizada por su rusticidad y crianza en un sistema extensivo (Figura 1). Posee las peculiaridades de ser seleccionada en base a parámetros etológicos y zootécnicos que ha generado un importante aislamiento reproductivo, del resto de las razas bovinas domésticas (UCTL, 2005; Silva y col., 2006). El aislamiento de las poblaciones ha generado que, la diversidad genética de la raza de Lidia sea superior a la observada en la mayoría de las razas bovinas europeas (Cañón y col., 2008). La raza de Lidia es también, una de las razas bovinas más antiguas del mundo, pionera en la implantación de un programa de selección relativamente complejo basado en caracteres propios de sus específicos objetivos productivos y en el que ya existían registros genealógicos desde el año 1836 (Montes, 1836).

En cuanto a su conformación presentan alto grado de variación cromática del pelaje, oscilaciones extremas del perfil frontonasal, variedad de encornaduras, proporciones, tamaños y pesos. (MAGRAMA, ARCA, 2014).



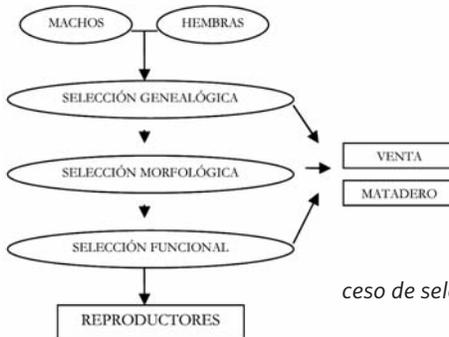
*Figura 1. Toros de lidia en la dehesa de la provincia de Salamanca.*

## 1.1 Selección.

A finales del siglo XVIII los ganaderos de bravo españoles comenzaron a aplicar un sistema de selección que en aquella época no se hacía en ninguna especie ganadera, siendo pioneros en mejora genética. A principios del siglo XX se introdujo poco a poco el cruzamiento con sementales del mismo o diferente encaste, en busca de algún carácter particular y complementario (Purroy, 2003).

Se han realizado principalmente cruzamientos dentro de líneas puras para fijar los caracteres de selección, lo que, en algunos casos, ha supuesto un aumento de los niveles de consanguinidad que han podido ocasionar la aparición de efectos favorables y desfavorables, como patrones de comportamiento indeseables durante la tiente y la lidia (Rodríguez, 1995).

Actualmente en la selección de reproductores, todavía se siguen una serie de pautas tradicionales tanto para las hembras como los machos, ejerciéndose una mayor presión de selección sobre éstos, ya que su incidencia en la procreación de la manada es mucho mayor que la de las hembras. El proceso de selección se inicia con una valoración genética de los potenciales reproductores (Figura 2). Consiste en identificar a los animales portadores de los genes más beneficiosos para los caracteres de interés deseables en la descendencia (Cañón, 2008). Para ello el ganadero realiza un filtro genealógico excluyente en base al registro histórico de puntuaciones que para determinados patrones etológicos positivos presentan las diferentes familias o reatas de su ganadería, buscando aquellos animales que a lo largo de su historia han producido las reses más destacadas. A continuación, se realiza una selección morfológica, en base a los patrones zootécnicos que definen el encaste de cada ganadería, desechando aquellas reses que se alejen del prototipo de la vacada (Rodríguez, 1997). Y por último, el ganadero realiza una valoración funcional del animal basada en la respuesta de comportamiento mostrada en las diferentes pruebas de selección (Apartado 1.4).



**Figura 2.** Esquema general del proceso de selección de reproductores en la raza de Lidia.

## 1.2 Manejo de la reproducción.

El ciclo reproductivo de la raza de Lidia (Figura 3) se encuentra perfectamente adaptado a las condiciones del sistema extensivo. Las hembras presentan buena aptitud maternal, capacidad de movilización de sus reservas corporales para producir leche, reconstituir sus reservas e ingerir forrajes groseros (Compan, 2008). El periodo de cubrición varía en función de la región en la que nos encontremos, así en las zonas de clima suave (tierras bajas de Andalucía) el semental se introduce en el lote de hembras al final del invierno (febrero-marzo) mientras que en áreas de climatología más rigurosa (Salamanca, zona centro, y tierras altas de Andalucía) suele hacerse en primavera (abril - mayo). Asimismo, el periodo de partos, es más precoz en zonas de clima benigno (diciembre-abril) que en áreas de climatología adversa (febrero-junio) para no comprometer en exceso la supervivencia de los neonatos (Gaudioso y Riol, 1996; Compan, 2008).



**Figura 3.** Diagrama del periodo reproductivo de la raza de Lidia dependiendo de su localización en la Península Ibérica.

Todos los aspectos relativos a la reproducción de la raza de Lidia tanto en lo referente a la declaración de lotes de cubrición por el sistema de monta natural o monta dirigida, como el uso de técnicas de reproducción asistida están controlados por el MAGRAMA, a través del Libro Genealógico de la raza bovina de Lidia, cuya finalidad es mantener registradas las reses en pureza. El libro está regulado por Real Decreto 2129/2008 de 26 de diciembre por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, y la gestión del control del Libro Genealógico lo ejercen las Organizaciones y Asociaciones ganaderas, que tienen concedido el título de Entidades Colaboradoras, y se encargan de enviar la información correspondiente al Ministerio.

## 2. La raza Blanca Cacereña.

La raza Blanca Cacereña es una de las razas bovinas más antiguas de España y es el único bovino autóctono español de capa blanca. Posee un perfil eumétrico, estirado y esbelto, de tendencia ortoide con capa blanca, amarillenta o albahía, con las mucosas rosadas y ocasionalmente de tonalidad pizarrosa (Sotillo y Serrano, 1985). Se explota en condiciones extensivas y está perfectamente adaptada al ecosistema adehesado extremeño. Tiene una acusada rusticidad, son animales con un fisiologismo perfectamente adaptado a condiciones ambientales extremas y una manifiesta capacidad digestiva para aprovechar alimentos groseros (MAGRAMA, ARCA, 2014).

Su aprovechamiento actual es cárnico, carne de excelente calidad, pero con un rendimiento bajo a la canal, del orden de 50-53%, inferior a otras razas autóctonas como la Retinta o la Avileña resultando de especial interés, los cruzamientos industriales. Antiguamente, su aprovechamiento principal era triple, cárnico, animal de tiro y/o cabestro para el manejo del ganado bravo (Bartolomé y García, 1998).

### 2.1 Manejo de la reproducción.

La raza Blanca Cacereña, se caracteriza por tener una madurez sexual tardía, fertilidad media, instinto maternal bueno y bajo porcentaje de partos difíciles. Las vacas suelen llegar a la pubertad entre los 14 y los 16 meses de vida, y se cubren por primera vez aproximadamente, a los 18 meses (Romero, 2009). La gestación suele ser mas corta que en el resto de la especie, entre 274 y 276 días, con intervalo entre partos de 406 días y los terneros son criados durante 6-7 meses, hasta el destete (Romero, 2009) El sistema reproductivo utilizado es la monta natural por contrato de cesión de machos (Figura 4) dirigidos desde el CENSYRA (Bartolomé y García, 1998) intentando realizar cruzamientos no consanguíneos. También se están llevando a cabo, programas de sincronización de celo e inseminación artificial, así como la colecta y transferencia de embriones, por el CENSYRA pero los resultados de fertilidad son bajos.

Los principales problemas reproductivos tienen su origen en el escaso número de animales integrantes del rebaño original, y en la introgresión genética de otras razas bovinas y presenta menores respuestas a los tratamientos superovulatorios y menores cantidades de embriones recolectados que los señalados en otras razas bovinas (Rueda y col., 2011). En un estudio genealógico de la raza realizado por Parejo y col. (2008) estimaron un incremento

de consanguinidad por generación del 2% y un valor medio de consanguinidad en la sexta generación del 12% lo que indica que en las generaciones actuales, los niveles siguen siendo altos y podrían estar influyendo negativamente en la eficacia biológica de los individuos.



**Figura 4.** Cruzamientos dirigidos en las instalaciones del CENSYRA de Badajoz.

### 3. Evaluación del semental.

Cualquier causa que altere los índices reproductivos en una explotación debe detectarse y corregirse con la mayor brevedad posible por su repercusión directa en el rendimiento económico de la explotación. Una prueba relativamente simple y de bajo coste económico es conocer la fertilidad del semental. Se basa en, un examen clínico externo de los órganos genitales por palpación escrotal, testicular y peneana, e interno por exploración rectal del músculo uretral, ampollas del conducto deferente, vesículas seminales y próstata descartando traumatismos, posibles malformaciones, hiperplasias o hipoplasias de los mismos. A continuación, se procede a la extracción seminal y al examen laboratorial que supervisará la fertilidad del eyaculado.

#### 3.1 Sistemas de recolección de semen.

Existen tres métodos de colección de semen: la vagina artificial, la electroeyaculación y la recogida *postmórtem*.

##### 3.1.1 Vagina artificial.

El uso de esta técnica es el método rutinario en los centros de inseminación de bovino por la gran similitud que tiene con la monta natural. Es un recep-

táculo imitador de la vagina de la vaca que provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir una eyaculación. Esta técnica consiste en colocar un animal que se deje montar, y en el momento del salto del semental, se efectúa una pequeña desviación del pene hacia la vagina artificial que albergará el eyaculado hasta el laboratorio donde se realizarán los exámenes pertinentes.

Según Arriola (1995) las ventajas más sobresalientes de esta técnica son:

- La obtención de eyaculados prácticamente idénticos a los producidos en monta natural.
- Buenas condiciones higiénicas.
- Gran rapidez de la técnica.
- Bajo coste económico del colector de semen.
- Bajo riesgo de lesión para el toro.

La dificultad principal de este método es el entrenamiento necesario de los machos para que se produzca la monta y la aceptación de la vagina, con la presencia de operadores.

### 3.1.2 Electroeyaculación.

La electroeyaculación es la técnica de recogida seminal más utilizada en la raza de Lidia por su sencillez, rapidez y eficacia (Figura 5). Consiste en la estimulación eléctrica de centros nerviosos cercanos a las glándulas reproductivas accesorias y base del pene, por un electrodo situado en el recto conectado a un generador de impulsos eléctricos (Acosta y col., 1991; Arriola y col., 1989).



**Figura 5.** Proceso de colecta de semen por electroeyaculación a un toro de lidia en el muelco de contención.

Para realizar este método es necesario disponer de una manga de manejo o de un muelco de contención lo suficientemente resistente y seguro para inmovilizar al animal y a ser posible con suelo estriado o antideslizante para evitar caídas durante la estimulación (De la Fuente y col., 1994; Quevedo, 2008). Una vez fijado el animal se procede a la limpieza y exploración clínica del aparato genital. Tras realizar un ligero masaje para facilitar la posterior excitación, se introduce el estimulador en el recto. Este dispositivo posee en su parte ventral tres electrodos longitudinales que emiten de forma rítmica, estimulaciones a bajo voltaje dejando entre ellas pausas de dos segundos, que se van elevando gradualmente hasta conseguir la erección y posterior eyaculación.

### 3.1.3 Postmórtem.

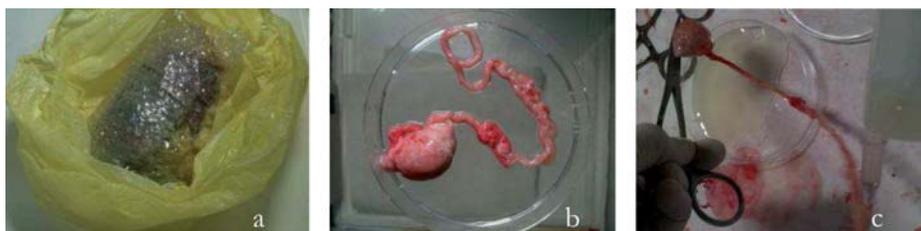
La recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo, es una técnica útil para propagar y preservar la calidad genética de toros *postmórtem*. Consiste en recuperar y criopreservar los espermatozoides, en casos donde, la colecta de semen por otros métodos es compleja (Anel y col., 2002) como en el caso de muerte natural o accidental de especímenes que estén en peligro de extinción, y en el caso concreto de la raza de Lidia, tras un excelente comportamiento durante su lidia en la plaza de toros, por muerte tras el indulto, o por muerte repentina en el campo, del semental (Gaudioso y Riol, 1996; Anel y col., 2002; Quevedo, 2008).

La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides sucede en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y es en la cola de este último donde se almacenan (Amann y Schanbacher, 1983; Chung, 1997; Reyes-Moreno y col., 2000, 2002). La técnica consiste en, extraer los testículos del escroto y separar las colas epididimarias cortando la unión entre la base del testículo con el cuerpo del epidídimo y con el conducto deferente. Posteriormente la extracción de los espermatozoides se puede realizar por tres métodos:

- Recolección por flujo retrógrado: mediante corte transversal en el *septum* del epidídimo y perfusión (Figura 6).
- Recolección por desmenuzamiento de la cola del epidídimo: se corta finamente y se filtra la cola del epidídimo, para obtener el material seminal.
- Método mixto: perfusión más desmenuzamiento.

Es fundamental para la supervivencia espermática, el manejo del epidídimo

y el tiempo transcurrido desde la muerte hasta la congelación de los gametos (Malcotti y col., 2012) pero, siempre y cuando los órganos sean refrigerados inmediatamente tras la extracción, la obtención de los espermatozoides epididimarios se puede retrasar varias horas (Gerber y col., 2002; Malcotti y col., 2012). Este material seminal puede ser utilizado en inseminación artificial o fertilización *in vitro* para conseguir descendientes de alto valor genético (Barrios, 2002).



**Figura 6.** Extracción postmórtem de semen de toro por flujo retrógrado. Testículo (a). Epidídimo (b). Extracción por flujo retrógrado (c).

## 4. Evaluación de parámetros seminales.

El espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por factores externos *in vitro* (tratamientos seguidos en el laboratorio para su conservación) o *in vivo* (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra) que requiere el análisis de diversas características físicas para poder determinar el potencial de fertilidad.

En el análisis rutinario de campo se evalúa, el aspecto, volumen, movilidad, concentración anomalías morfológicas y viabilidad espermática de forma rápida, simple (Figura 8) y con un coste moderado (Centola y Ginsburg, 1996). Pero tras el examen tradicional se pueden evaluar otros factores que permitan mejorar la capacidad de predicción de la capacidad fecundante de los espermatozoides como el estudio de características seminales no compensables, entre las que figura la fragmentación del ADN espermático.

### 4.1 Aspecto y volumen.

El eyaculado de toro, es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, que contiene una suspensión de espermatozoides en plasma seminal (Figura 7). La determinación del aspecto y del volumen se realiza justo tras la extracción y nos facilita información esencial del eyaculado. Se verifica la au-

sencia de pelo, suciedad y contaminantes externos que supondría la eliminación de la muestra. El aspecto opaco o traslúcido nos muestra de una forma grosera la alta o escasa concentración espermática del eyaculado y si el aspecto es lechoso o tiene fragmentos de material, nos muestra la posible presencia de un proceso inflamatorio en el tracto reproductivo que sería causa obligatoria de eliminación.

El volumen medio establecido para el ganado bovino es de 4-6 cm<sup>3</sup> con una variación de entre 1-15 cm<sup>3</sup>. Concretamente los toros jóvenes pueden suministrar de 1 a 3 cm<sup>3</sup> de semen, mientras que los adultos (11-13 años) pueden eyacular de 10 a 15 cm<sup>3</sup> (Hafez, 1989). Se debe tener en cuenta que pueden presentarse variaciones en función del método de recogida, estado fisiológico del macho, raza, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Derivaux, 1982).



*Figura 7. Eyaculado de toro de lidia en el tubo colector.*

#### **4.2 Concentración espermática.**

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) del eyaculado. La concentración media para el ganado bovino es de  $2 \times 10^8$  espermatozoides/ml en jóvenes y de  $1,8 \times 10^9$  espermatozoides/ml en los adultos (Hafez, 1989), pero existe una alta variabilidad entre toros, e incluso entre distintos eyaculados de un mismo toro.

La concentración puede calcularse por varios métodos, la espectrofotometría (Figura 20), la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular como la de Bürker®, Neubauer® o Makler® (Woelders, 1990). La espectrofotometría es la técnica más empleada tanto en condiciones de campo como en centros de inseminación, por su rapidez, simplicidad y coste.

Se basa en una tabla de conversión en la que se asigna a cada valor de transmitancia un valor de concentración previamente calculado mediante recuento directo o contador de partículas (Sorensen, 1982).



*Figura 8. Análisis de parámetros seminales clásicos de toro en condiciones de campo.*

### 4.3 Movilidad espermática.

La movilidad espermática es un parámetro fundamental para el transporte espermático y la capacidad de penetración del ovocito. Este parámetro no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, pero refleja una de las funciones primordiales del espermatozoide, la actividad flagelar.

Existen varias formas de evaluación de la movilidad espermática:

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

El estudio de la movilidad 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. 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 y col., 1980).

El otro método, se basa en el uso de sistemas informatizados de digitalización

de imágenes denominados CASA (Computer Assisted Motility Analysis) (Davis y Siemers, 1995). Capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto en tiempo real, como de manera diferida, aportando un gran volumen de información (Tuli y col., 1992), pero presenta inconvenientes por el coste elevado, el análisis de un número bastante limitado de espermatozoides y la posible predisposición a un cierto grado de tendencia por parte del técnico.

Para conocer qué método es más objetivo, Januskauskas y col., (2001) realizaron un análisis de la movilidad post-descongelación con la valoración subjetiva y el análisis informatizado y los resultados no difirieron significativamente. En ambos casos hubo correlaciones positivas entre movilidad y fertilidad.

#### 4.4 Anomalías morfológicas.

El análisis morfológico de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del semental. Se producen por una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Barth, 2000).

Las anormalidades del esperma 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).
- La importancia: defectos mayores y menores (Blom, 1983).
- El origen: primarias, originadas durante la espermiogénesis en el testículo y secundarias: originadas en el epidídimo o post eyaculación (Barth y Oko, 1989) (Tabla 1).

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

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 toros y se ha correlacionado significativamente (Söderquist y col., 1991).

Se pueden utilizar técnicas de valoración subjetiva (Amann, 1993) con diversas tinciones (Eosina-Nigrosina, Papanicolau, Giemsa, Diff-Quik), por fijación con glutaraldehído o formaldehído de la muestra y a continuación se realiza la valoración por microscopía de contraste de fases. Pero para adquirir datos objetivos acerca de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides se ha desarrollado el análisis automatizado de la morfología espermática, ASMA (Computer Assisted Sperm head Morphometry Analysis) que es un sistema de análisis de imágenes computerizadas que permite detectar y cuantificar las anomalías correctamente y realizar mediciones repetibles y objetivas (Amann, 1981; Gravance y col., 1998).

<b>PRIMARIAS</b>		
<b>Anomalidades de cabeza</b>	<b>Anomalidades de cuello</b>	<b>Anomalidades de la cola</b>
Cabezas gigantes	Unión del cuello fuera del eje	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 o 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 teratooides		Defecto Dag
Defectos de acrosoma		
Vacuolas nucleares		
Condensación anormal del ADN		
<b>SECUNDARIAS</b>		
<b>Anomalidades de cabeza</b>	<b>Anomalidades de la cola</b>	<b>Otras células</b>
Cabezas normales desprendidas	Pieza media distal doblada	Células epiteliales
Acrosoma roto/deforme/desprendido	Pieza principal doblada	Entrocitos
	Pieza principal doblada por shock hipotónico	Formaciones de medusa
	Gota citoplasmática proximal y distal	Células precursoras de esperma
		Células redondas
		Glóbulos blancos

**Tabla 1.** Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides adaptado y actualizado de "XX Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa". Barth AL, Oko RJ. Iowa State University Press, Iowa. 1989.

#### 4.5 Viabilidad espermática.

Este análisis se basa en la determinación de la proporción de espermatozoides vivos y muertos en función de la permeabilidad de membrana. Existe una alta correlación entre el número de células viables en una dosis de inseminación y la capacidad de fecundar a los ovocitos *in vivo* (Amann, 1993; Shannon y Vishwanath, 1995; Des Daas y col., 1998).

En el procesado de criopreservación del semen, se produce un estrés térmico para el espermatozoide que afecta a sus membranas, (membrana plasmática, membrana externa del acrosoma y membranas mitocondriales) produciendo modificaciones en la organización, fluidez, permeabilidad y composición li-

pídica causando daños irreversibles y comprometiendo su supervivencia (Watson, 1981; Thomas y col., 1998).

Hoy en día, se utilizan técnicas precisas para valorar la viabilidad espermática que consisten en el marcaje fluorescente del ADN, el estudio de determinadas enzimas intracitoplasmáticas o la medición del potencial de membrana.

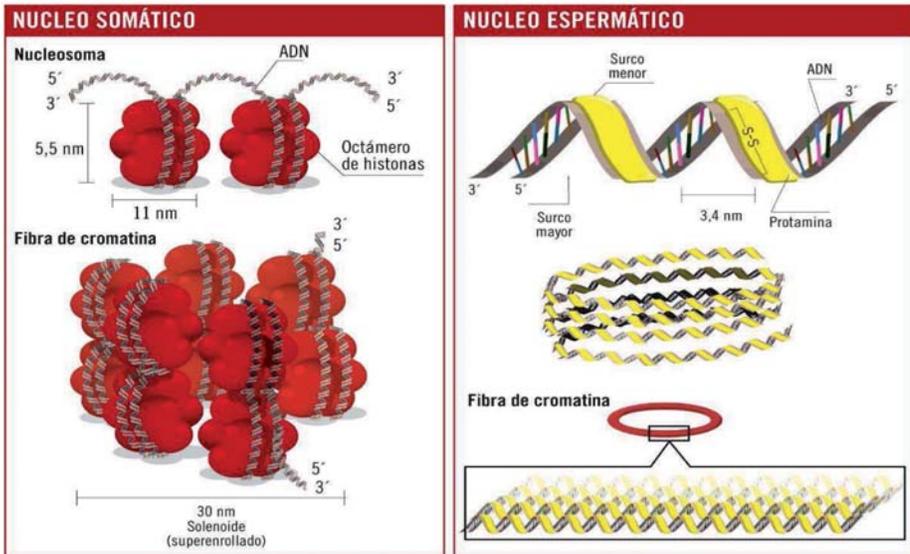
## 5. Estructura de la cromatina espermática.

La cromatina es una estructura sumamente organizada y compacta, que consiste en ADN y nucleoproteínas heterogéneas (Ward y Zalensky, 1996). Esta organización permite, la replicación del ADN de forma adecuada, para que la información genética sea transmitida a la próxima generación (Ward y Coffey, 1991).

En el núcleo de las células somáticas de los mamíferos, el ADN rodea a los octámeros de histonas, organizando los nucleosomas que a su vez forman solenoides, lo cual induce el superenrollamiento del ADN (Figura 9). Sin embargo el núcleo del espermatozoide, tiene una estructura nucleoproteínica muy específica (Wykes y Krawetz, 2003; Biegeleisen, 2006) formada por ADN y proteínas básicas, distintas a las histonas, denominadas protaminas necesarias para mantener la capacidad de fertilización (Hecht, 1998; Brewer y col., 2002). 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 (Ward, 1993; Brewer y col., 1999; Balhorn y col., 2000; Brewer y col., 2002; Corzett y col., 2002; Brewer y col., 2003; Meistrich y col., 2003). Algunas especies de mamíferos presentan sólo un tipo de protamina en sus espermatozoides mientras que en otras especies 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 y col., 1985; Mengual y col., 2003; Yoshii y col., 2005) y la familia P2 (formada por un compendio de otras protaminas) presente en los primates y roedores (Biegeleisen, 2006). El esperma de caballo, lagomorfos y proboscidos contiene la protamina P2 procesada (Balhorn y col., 1977; McKay y col., 1985; Oliva y Dixon, 1990; Yoshii y col., 2005) y en el toro y el verraco está presente el gen para la protamina P2 pero parecer ser que es disfuncional o produce una proteína aberrante (Balhorn, 2007; Gosálvez y col., 2011c). Las variaciones en la expresión de las protaminas han sido asociadas con la in-

fertilidad masculina. Normalmente las familias de protaminas P1 y P2 aparecen en una proporción P1/P2 que varía dentro de los mamíferos euterianos (Corzett y col., 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 y col., 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 (Simon y col., 2011; García- Peiró y col., 2011; Fortes y col., 2012; Aoki y col., 2013).



**Figura 9.** Estructura del ADN de una célula somática y una célula espermática.

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. Este proceso de maduración conlleva el empaquetamiento de la cromatina nuclear y la adquisición de la movilidad espermática. El núcleo de la spermátida va a sufrir alteraciones complejas, de tipo bioquímico y fisiológico, así como cambios drásticos en su morfología, tamaño y condensación.

La estabilización del núcleo espermático sucede durante las dos últimas fases de transición de la spermátida, proceso en el que las actividades de transcripción y reparación están inactivadas (Kierszenbaum, 2001; Brewer y col., 2003). 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 (Sakkas y col., 1999). 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 y col., 1975; Poccia, 1986; Fuentes-Mascorro, y col., 2000; Meistrich y col., 2003).

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 y col., 2002). Una vez que la protaminación se completa, estas "roturas biológicamente correctas" serán reparadas por tres complejos de proteínas altamente especializadas (Polo y Jackson, 2011).

Una vez que se produce la penetración del espermatozoide en el oocito, 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, y col., 2000; Nakazawa, y col., 2002; Mclay y Clarke, 2003). Finaliza una vez que las histonas vuelvan a provocar el superenrollamiento del ADN.

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 oocito, la descondensación correcta tras la fecundación (Hingst y Blottner, 1995).

## 6. 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 fertilización (Evenson, 1980). Se ha demostrado que altos niveles de daño en la cromatina afecta al éxito reproductivo, en condiciones naturales y con técnicas de reproducción asistida (Evenson, 1999; Spano y col., 2000; Larson y col., 2000). La inestabilidad cromatínica podría retrasar la formación nuclear paterna, la calidad embrionaria, la proporción de blastocistos,

la implantación y el éxito en el embarazo o preñez. (Evenson, y col., 1994; Agarwal y Allamaneni, 2004; Virro y col., 2004; Muriel y col., 2006; Núñez-Calonge y col., 2012). 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 y col., 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 (Gosálvez y col 2011d), la edad (Ji Bt y col., 1997; Mandal y col., 2010), los componentes del diluyente seminal y las condiciones de almacenamiento (Waterhouse y col., 2010).

Determinadas situaciones clínicas, también pueden dañar el núcleo espermático, como el criptorquidismo, la orquitis (Foresta y col., 1989), el varicocele (Allamaneni y col., 2004; Enciso y col., 2006a; García-Peiró y col., 2012; Gosálvez y col., 2013), el cáncer (Meseguer y col., 2008; Cortés-Gutiérrez y col., 2011, 2013), la fiebre elevada (Sergey y col., 2007) infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.* (Gallegos y col., 2008) infecciones de tipo vírico (Chang y col., 2004; Sang-Myeong y Kleiboeker, 2007), leucocitospernia (Erenpreiss y col., 2002; Rodríguez y col., 2012), enfermedades inflamatorias del tracto genital, hipertermia testicular (Acevedo, 2001; Zini y Libman, 2006; Ruiz-López y col., 2010) presencia de bacterias en el eyaculado, como *Micoplasma spp.* (González-Marín y col., 2011; Rybar y col., 2012) y elevados niveles de zinc en la dieta (García- Contreras y col., 2011).

También se ha demostrado que provocan inestabilidad cromatínica, algunos quimioterápicos del tipo ciclofosfamidias, (Coddington y col., 2004) la exposición a organofosforados (Sánchez-Pena y col., 2004), las radiaciones ionizantes (Fatehi y col., 2005) los rayos gamma, los rayos X (Sailer y col., 1995) el uso de ciertos fármacos y drogas (Ji Bt y col., 1997), la contaminación (Selevan y col., 2000; Evenson y Wixon, 2005; Rubes y col., 2005; Specht y col., 2012), el tabaquismo (Potts y col., 1999) y algunos tóxicos químicos como la triethlenemelamina y el methyl methanesulfonato (Evenson y col., 1993).

También se han descrito factores intrínsecos responsables de la fragmentación del ADN espermático:

- Espermatogénesis defectuosa: Deficiencias durante la recombinación, maduración espermática anormal y/o protaminación deficiente.
- Apoptosis celular.
- Estrés oxidativo.

Tal como han propuesto diversos autores, probablemente existen muchos más mecanismos, actualmente desconocidos, por los que se puede fragmentar el ADN y puedan tener una relación muy directa con la diagnosis clínica de un cuadro de infertilidad inespecífico.

### 6.1 Espermatogénesis defectuosa.

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 y col., 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 espermatozoides con fragmentación en su ADN (Mengual y col., 2003).
- 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 y col., 2013).

### 6.2 Apoptosis.

El proceso apoptótico daña el ADN y contribuye a una pobre calidad espermática (Aitken y Koppers 2011). Durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo se produce la apoptosis continuamente (Tomlinson y col., 2001; Erenpreiss y col., 2002). 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 (Fischer y col., 2003; Sakkas y col., 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 (Martin y col., 2004).

### 6.3 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos principales relacionado con el daño en el ADN espermático y la infertilidad (Sharma y Agarwal, 1996; Saleh y Agarwal, 2002). Se produce por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) al disminuir la capacidad antioxidante del plasma seminal.

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 (Aitken y col., 1997; Moustafa y col., 2004). 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 movilidad, pérdida de viabilidad y daños en la molécula de ADN (Aitken y Krausz, 2001; Agarwal y Allamaneni, 2004; Aitken y col., 2012).

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 (Aitken y col., 1992; Fischer y col., 2003; Moustafa y col., 2004). De hecho, existe una correlación positiva entre altos porcentajes de gotas citoplasmáticas en el eyaculado y la desnaturalización del ADN de los espermatozoides (Fischer y col., 2003; Enciso y col., 2011a). Para contrarrestar esta producción excesiva de ROS, se han realizado ensayos de suplementación oral con antioxidantes en el hombre, que han generado descensos en el índice de fragmentación del ADN espermático (Zini y col., 2009; Abad y col., 2013).

## 7. 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 (Gledhill, 1966). 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 tanto, una menor sensibilidad a la hidrólisis y viceversa.

Posteriormente, Calvin y Bedford en 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 (Ward y Coffey 1991; Ward, 1993). 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, 1983).

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 humana supera el 30%, la fertilidad de ese eyaculado está muy comprometida (Evenson, 1999; Evenson y Wixon, 2006; Bungum y col., 2007). También afecta a la fertilización del oocito, 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 (Virro y col., 2004; Muriel y col., 2006; D'Occhio y col., 2007; Núñez-Calonge y col., 2013).

Sin embargo, existen mecanismos de reparación de la célula espermática con ADN fragmentado de manera que puede ser reparado, de forma aberrante o no ser reparado. En todos los casos, puede tener capacidad para fertilizar el oocito. Los mecanismos de reparación pueden activarse durante la espermiogénesis, una vez que el oocito 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 (Ahmadi y Ng, 1999; Derijck y col., 2008; González-Marín y col., 2012a).

Si durante la espermiogénesis, las roturas en el ADN celular persisten, pueden conducir a la inestabilidad genómica y las células podrían sufrir apoptosis o senectud para prevenir la acumulación potencial de mutaciones tumorigénicas. Si la respuesta al daño falla, aparecerán de nuevo esas mutaciones (Wang y col., 2012) 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, y col., 2002; Silva y Gadela, 2006).

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 (Polo y Jackson, 2011). 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 (Dadoune, 2003).

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 (Ashwood y Edwards, 1996), pueden darse tres situaciones:

1. El oocito es capaz de reparar las roturas de la molécula de ADN del espermatozoide antes de iniciar la primera división celular y se generará un descendiente normal. 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 oocito 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, para apoyar al cigoto antes de la formación del genoma embrionario (Derijck y col., 2008).
2. La maquinaria de reparación del oocito 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 (Jurisicova y Acton, 2004).
3. El oocito realiza una reparación parcial. Esto da lugar a errores en la secuencia de ADN que pueden dar lugar 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 (Shoukir y col., 1998). 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 (Borini y col., 2006). Esto se corrobora con

los fracasos en la obtención de blastocistos al utilizar muestras espermáticas con altos niveles de daño en el ADN (Seli y col., 2004). 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 (Cooke y col., 2003) sino a las generaciones siguientes (Aitken y col., 2009).

En el mundo animal, también se correlacionan las alteraciones de la cromatina con la infertilidad en la especie bovina (Ballachey y col., 1987; Karabinus y col., 1990), caprina (Sailer y col., 1995) y porcina (Rybar y col., 2004). Valores por debajo de un 15-20% de fragmentación del ADN espermático, no experimentarían retrocesos apreciables en la fertilidad en bovino y porcino (Rybar y col., 2004). En semen fresco de verraco, Ardon y col., (2008) concluyeron que la probabilidad de que el espermatozoide con cromatina inestable alcance el huevo y lo fertilice, es baja y para los équidos, la integridad de la cromatina junto con las anomalías del espermatozoide serían los parámetros más útiles a la hora de predecir la capacidad fecundante (Morrel y col., 2008). 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 movilidad (Fatehi y col., 2005), presentaban normalidad en la unión a la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación y las tasas de oocitos fertilizados, permanecieron normales. Sin embargo, los embriones obtenidos murieron por apoptosis durante la etapa de 4 a 8 células, posiblemente debido a una expresión defectuosa del genoma (Bordignon y Smith, 1999; Ahmadi y Ng., 1999; Fatehi y col., 2005; Silva y Gadella, 2006).

## 7.1 Metodologías para la detección del daño en el ADN espermático.

### 7.1.1 Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion).

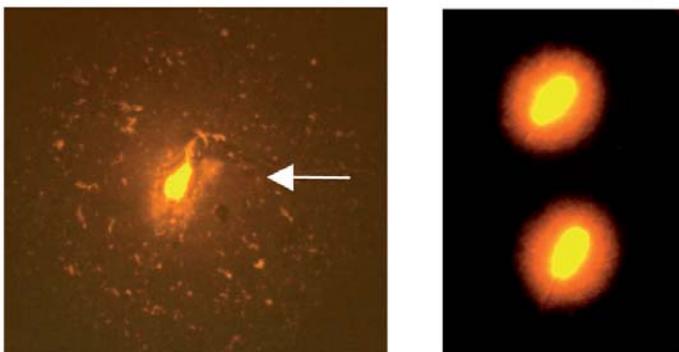
El Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) (Fernández y col., 2003; Gosálvez y col., 2006; Fernández y col., 2007) está basado en la respuesta diferencial de la fragmentación o no, del núcleo del espermatozoide a un tratamiento de desproteínización mediante una solución de lisis específica (Figura 10). 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 y col., 2003) y en otras especies como:

- Verraco (Pérez-Llano y col., 2010).
- Toro (Gosálvez, y col., 2008, 2011c; Martínez-Pastor y col., 2009).
- Tenca "Tinca Tinca" (López-Fernández y col., 2009).
- Carnero (López-Fernández y col., 2008a).
- Macho cabrío (López-Fernández y col., 2009).
- Caballo (López-Fernández y col., 2007; Cortés-Gutiérrez y col., 2014).
- Burro (Cortes-Gutiérrez y col., 2008, 2014).
- Pollo (Shanmugam y col., 2014).
- Conejo (López-Fernández y Gosálvez, 2011).

Especies salvajes: Koala (Jonhston y col., 2007, 2012), elefante (Imrat y col., 2012), llama, (Carretero y col., 2012).

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 y col., 2005; Gosálvez y col., 2006).



**Figura 10.** . *Espermatozoides de la raza de Lidia, sometidos al test SCD observados por microscopía de fluorescencia. La flecha indica un espermatozoide con el ADN del núcleo fragmentado.*

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 y col., 2005; Chohan y col., 2006).

### 7.1.2 Ensayo Cometa.

Otra técnica utilizada en el análisis del ADN del espermatozoide, es el ensayo Cometa, también conocido como electroforesis de células únicas. Fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson en 1984. Se basa en la capacidad de movilización de los fragmentos de un núcleo desproteinizado con roturas en sus cadenas de ADN hacia el polo positivo, cuando al descondensarse en el seno de un gel, es sometido a la acción de un campo eléctrico (Aravindan y col., 1997). La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola, de forma que el ADN íntegro, no genera o produce imágenes discretas de colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que contienen el ADN con roturas, los fragmentos se desplazarán generando una imagen similar a la de un cometa (Singh y col., 1988; Cortés-Gutiérrez y col., 2007). A su vez, también se pueden utilizar otros parámetros de medida, tales como el "momento cola" que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción del total del ADN de la cola) (Hellman y col., 1995).

También, se ha descrito el ensayo cometa de dos dimensiones que tras una electroforesis neutral y horizontal, distingue las roturas de cadena doble en el ADN espermático; en una segunda electroforesis alcalina detecta la fragmentación de cadena simple, ya que cada una de ellas, juega un papel en la fecundación, mientras que la fragmentación simple puede ser reparada por el ovocito, la de cadena doble no es reparable (Enciso y col., 2009, 2011b).

La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilos que se encuentran en las protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (ditiotreitól). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4, 6 diamidino-2-fenilindol), YP (yoduro de propidio) o SYBR® Green.

También se ha descrito que puede predecir el porcentaje de desarrollo embrionario tras la FIV o la ICSI (Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides), especialmente en parejas con esterilidad por causa desconocida (Morris y col., 2002). El ensayo cometa fue adaptado de forma sencilla para análisis de semen de otras especies ganaderas de mamíferos, como el verraco, el toro y el pollo (Fraser y Strzeżek 2004; Slowinska y col., 2008; Pérez-Llano y col., 2010; Enciso, y col., 2011b; Gosálvez y col., 2011b; Gliozzi y col., 2011).

El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso

no común en un laboratorio de andrología, como son las fuentes de electroforesis para el ADN, y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad.

# Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de investigación es evaluar la calidad seminal de bovino, especialmente de la raza de Lidia, en el volumen, concentración, parámetros de movilidad, anomalías morfológicas y viabilidad, como parámetros clásicos y la fragmentación del ADN espermático como nuevo parámetro en el estudio de la calidad seminal.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el índice de fragmentación basal del ADN espermático y su correlación con parámetros clásicos de calidad seminal en muestras seminales de la raza de Lidia y otras razas de vacuno extensivo.
2. Comparar la influencia del método de extracción seminal utilizado (vagina artificial, electroeyaculación, *postmórtem*), la edad y la raza del semental sobre el índice de fragmentación del ADN espermático y el resto de parámetros clásicos de calidad seminal.
3. Determinar la dinámica de fragmentación *in vitro* del ADN espermático de dosis seminales criopreservadas de la raza de Lidia y valorar el efecto de la temperatura, la variabilidad intra e interindividual y el método de extracción.



# Material y métodos

## 1. Material

### 1.1 Material biológico.

#### 1.1.1 Animales.

Se utilizaron muestras seminales procedentes de sementales sanos y elegidos al azar. La fertilidad de las dosis en estudio tras la inseminación artificial no está probada.

Se agruparon en función de la raza:

- Raza de Lidia: se analizaron 92 muestras seminales de 65 sementales de la raza de Lidia. La edad de los animales estuvo comprendida entre los 2 y los 15 años, procedentes de 30 ganaderías distribuidas por todo el territorio nacional, obtenidas entre los años 1995 y 2009 cedidas por el Instituto Español de Genética y Reproducción Animal (IEGRA) situado en Talavera de la Reina (Toledo).
- Raza Blanca Cacerña: se analizaron 40 muestras seminales de 34 sementales de la raza Blanca Cacerña. Las dosis se obtuvieron en el Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) dependiente de la Junta de Extremadura (Badajoz). La edad de los individuos está comprendida entre los 2 y 8 años de edad, obtenidas entre los años 1975 y 2009 cedidas por la Asociación Nacional de Ganado Vacuno de la Raza Blanca Cacerña.
- Razas Especializadas: se analizaron 18 dosis seminales congeladas de 18 sementales de razas de producción cárnica y lechera (Limousin, Charolais

y Holstein-Friesian) adquiridas a la empresa a M.G.A. S.L. de Benavente (Zamora).

Los animales del estudio no presentaron síntomas o lesiones de enfermedad, estaban desparasitados, bien alimentados y con buena conformación siendo sometidos a una analítica completa dando resultado negativo a las enfermedades de declaración obligatoria (Brucelosis, Tuberculosis, Leucosis enzoótica bovina y Lengua Azul) y otras enfermedades de tipo vírico y bacteriano como la Rinotraqueitis infecciosa bovina, Diarrea vírica bovina y tras un raspado prepucial, negativos a Trichomoniasis y Campylobacteriosis. En el caso concreto del CENSYRA los animales cumplieron la legislación vigente (Dir. 88/407/CEE y concordante) que incluye el diagnóstico de las enfermedades citadas y la Estomatitis Vesicular y Leptospirosis.

No se obtuvo toda la información sobre los parámetros seminales descritos en todas las dosis, por problemas en el momento del análisis, o por falta de información.

## **2. Métodos**

### **2.1 Colecta de material seminal.**

Antes de realizar la colecta se procedió a la limpieza y desinfección del material necesario así como a la zona prepucial para evitar al máximo la contaminación de la muestra.

#### **2.1.1 Electroeyaculación.**

La colecta del material seminal por electroeyaculación se realizó en las ganaderías de origen a los toros de la raza de Lidia y en las instalaciones del CENSYRA de Badajoz a los sementales de la raza Blanca Cacereña.

#### **Preparación de la muestra**

- En las ganaderías de lidia, se introdujo al semental en el muevo de contención. Se sujetó al toro por la cabeza, con un "sistema de tijera" a modo de cepo y se accedió al animal por la apertura de puertas laterales habilitadas al efecto. En el CENSYRA de Badajoz se inmovilizó al animal en una manga de manejo, con una barra de contención por la parte trasera.

- Se preparó el electroeyaculador y se metió un cono de plástico con el tubo colector graduado, en el portaconos. Para evitar el cambio de temperatura del eyaculado, se sumerge el colector en una bolsa de plástico con agua caliente a 35 °C - 38 °C unida al portaconos.

## **Protocolo**

- Se procedió al vaciado de la ampolla rectal y se realizó una palpación y posterior masaje rectal de la próstata, vesículas seminales y ampollas de Henle.
- Se introdujo el electroeyaculador en el recto con los electrodos en posición ventral, previa lubricación con vaselina esterilizada y a continuación se comenzó la estimulación con descargas de intensidad ascendente (desde 0 V hasta 15 V) de 2 V cada 2 s y paradas de 2 s de duración. No se estableció un ciclo específico porque depende de la respuesta individual de cada animal.
- Una vez que se produce la erección y protusión del pene, se acercó con cuidado el portaconos evitando recoger los fluidos presemiales.
- Tras la eyaculación, se cesó la estimulación eléctrica y se esperó unos segundos para recoger todo el contenido seminal. A continuación, se cogió el colector con el eyaculado e inmediatamente fue transportado al laboratorio para realizar el análisis seminal. En el caso de los sementales de la raza Blanca Cacerreña, en las instalaciones del CENSYRA y en el caso de los sementales de la raza de Lidia, se realizó un primer análisis en la propia ganadería, en un laboratorio portátil y se comenzó con el procesado de la muestra durante el traslado en coche (1 h-5 h) al IEGRA.

## **Lectura de resultados.**

Se realizó el análisis seminal subjetivo en las muestras de toros de lidia según establece el apartado 2.4. Y el análisis seminal informatizado con el software ISAS® a los toros de la raza Blanca Cacerreña según establece el apartado 2.4.4.

### **2.1.2 Vagina artificial.**

Se realizó la extracción por vagina artificial a los toros de la raza Blanca Cacerreña en las instalaciones del CENSYRA. Los animales han sido adiestrados a fin de que adquieran el hábito de saltar, respetando las normas sobre bienestar animal y seguridad laboral. Para cada animal se empleó una vagina artificial diferente, respetando normas sanitarias básicas para evitar la diseminación de enfermedades infecciosas.

## Preparación de la muestra

- Se preparó la vagina colocando la camisa de látex dentro del cilindro y se colocó el cono colector fijándose con ligaduras.
- Se llenó la vagina con agua caliente a 65 °C para lograr una temperatura interna de 37 °C. El agua se introduce primero con la vagina en posición horizontal hasta que rebasa y luego en forma vertical desalojando el excedente. De esta manera, la presión intravaginal será la correcta en el momento de la introducción del pene en la vagina.
- Una vez colocado el tubo colector, se lubricó la entrada de la vagina artificial con vaselina esterilizada.

## Protocolo

- Se usaron hembras sanas y de temperamento tranquilo como estímulo sexual.
- Se retiró la cola de la hembra atándose a uno de los miembros posteriores y el operador se situó al lado derecho del animal. Con la mano derecha se sostuvo la vagina artificial y cuando el macho inició el salto, con la mano izquierda desvió la dirección del pene (tocando solamente el prepucio) hacia la vagina para introducirlo en ésta.
- Una vez que el macho comenzó a eyacular se dejó la vagina el tiempo suficiente para poder recolectar todo el material seminal.
- Una vez extraída la vagina, se cerró e identificó el tubo colector graduado con el eyaculado e inmediatamente fue trasladado al laboratorio mediante un "montacargas" en un baño termostático a 37 °C hasta que se finalizó la prueba de valoración seminal.

## Lectura de resultados

Se realizó el análisis seminal informatizado utilizando el software ISAS®, según establece el apartado 5.3.2.

### 2.1.3 Recogida *postmórtem* por flujo retrógrado.

Se recolectaron los testículos de toros que han sido lidiados en plazas de toros de todo el territorio nacional. Los testículos fueron procesados en el IEGRA.

### **Preparación de la muestra.**

- Recolección de las bolsas escrotales entre 10 y 20 min después de la muerte del toro.
- Cada bolsa escrotal se colocó dentro de bolsas plásticas selladas e identificadas y éstas a su vez se colocaron en una nevera portátil a una temperatura de 5 °C.
- El tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos hasta el procesamiento de cada uno de ellos en el laboratorio varió entre 1 h y 5 h.

### **Protocolo.**

Los espermatozoides epididimarios se recolectaron según el protocolo indicado por el IEGRA.

- Para la recuperación de los espermatozoides, de cada testículo se disecionó la cola del epidídimo y el conducto deferente; se retiró la túnica vaginal y los vasos sanguíneos con bisturí y tijera recta.
- Se localizó la zona media de la cola del epidídimo y se realizó un corte transversal en el lugar anterior al comienzo de la disminución del diámetro epididimal, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
- Se situó la cola del epidídimo en una placa de Petri y se introdujo una aguja de calibre 22 con punta "roma" y una jeringa de 20 ml con aproximadamente 10 ml del diluyente Triladyl® en el lumen del conducto deferente y se perfundió lentamente. Las paredes del conducto deferente se pinzaron con una pinza "mosquito" contra la aguja para evitar la pérdida del líquido de lavado. A continuación, se obtuvo lentamente el líquido espermático epididimario por el extremo cortado de la cola del epidídimo.

### **Lectura de resultados.**

- Se determinó el volumen recuperado del lavado de la cola del epidídimo mediante un colector graduado. El valor obtenido para el volumen seminal resultó de la conjunción de dos saltos sucesivos con un intervalo de 15 min.
- Se hizo la lectura de la movilidad espermática epididimaria pasados 40 min tras la recolección del fluido.
- Se realizó la valoración de semen de forma subjetiva según el apartado 2.4.3.

## 2.2 Procesado y congelación de material seminal.

Una vez determinado los parámetros seminales de cada eyaculado, se mezcló el semen con el diluyente a 37 °C (Triladyl® en el caso del IEGRA y Andromed® en el caso del CENSYRA de Badajoz).

### Protocolo.

- El semen fue diluido con el volumen de medio necesario para rellenar el número de dosis calculadas. Posteriormente se trasladaron al lugar de envasado a temperatura ambiente en un recipiente desechable.
- Se realizó el llenado, sellado e identificación de las pajuelas en el interior de una vitrina de refrigeración a una temperatura constante de 5 °C. El llenado de las pajuelas se hizo mecánicamente mediante succión y selladas por ultrasonidos. La identificación se realizó mediante una máquina conectada a un ordenador de sobremesa controlado por el Programa EasyCoder.
- Las pajuelas fueron colocadas en rampas aptas para la congelación, donde se cuentan y comprueban que están perfectamente llenas, selladas y marcadas.
- Las rampas con las dosis se colocaron en la cámara de refrigeración para que la temperatura descienda de los 24 °C a los 5 °C, a razón de 0,2 - 0,3 °C/min. El periodo de equilibrado del semen fue aproximadamente de 4 h.
- En el IEGRA la congelación se realizó con un congelador programable, siguiendo la curva estándar para congelación de semen bovino de (+ 4 °C a -10 °C a -5 °C/min; de -10 °C a -100 °C a -40 °C/min, y de -100 °C hasta -140 °C a -20 °C/min).
- En el CENSYRA, las dosis se congelaron en vapores de nitrógeno líquido en un biocongelador. La temperatura de congelación a la que se llega suele ser de -120 °C, utilizada sobre la rampa siguiente: (+5 °C a -6 °C, 4 °C/min; de -6 °C a -25 °C a -50 °C/min; de -25 °C a -100 °C a -50 °C/min; y de -100 a -120 °C a -80 °C/min).
- Las dosis fueron sumergidas en nitrógeno líquido conservándose a -196 °C hasta su contrastación o evaluación definitiva.

## 2.3 Descongelación de dosis seminales.

Se extrajeron las muestras del tanque de nitrógeno líquido y fueron colocadas en hielo durante su transporte al laboratorio para conseguir una descongelación progresiva.

## **Protocolo.**

- Introducir la pajuela en el baño maría a 37 °C y mantener durante 45 s. si el volumen de la pajuela es de 0,5 ml o durante 30 s. si el volumen de la pajuela es de 0,25 ml.
- Cortar los extremos y depositar el semen en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

## **2.4 Evaluación de parámetros espermáticos.**

Se evaluaron los parámetros clásicos seminales: el volumen (VOL) la concentración (CC), el índice de fragmentación del ADN espermático (IF), la movilidad masal (MM), la movilidad individual (MI), la movilidad progresiva (MP), la calidad del movimiento (CLM) y las anomalías morfológicas (AM). Y tras la descongelación de las pajuelas se analizó la movilidad individual (MID), la movilidad progresiva (MPD), las anomalías morfológicas (AMD), y la viabilidad (V). El análisis subjetivo del material seminal en fresco y postdescongelado de los parámetros de movilidad y morfología, fueron realizados por una persona experimentada.

### **2.4.1 Volumen.**

Tras la obtención de los eyaculados de los toros, se evaluó el volumen por lectura directa en el tubo colector graduado de 15 ml.

### **2.4.2 Concentración espermática.**

La concentración del eyaculado, no deberá ser menor de 500 millones de espermatozoides por ml.

- En una cubeta para espectrofotometría se colocan 3,960 ml de suero fisiológico y 40 µl de semen, dilución de 1/100.
- Se homogeneiza la muestra y se coloca la cubeta con las caras transparentes en sentido del haz de luz.
- Se realiza la lectura de la absorbancia y mediante una recta de calibrado se determina la concentración, el volumen de diluyente que hay que añadir al semen para obtener la concentración deseada y el número de dosis obtenida.

En el CENSYRA el número de espermatozoides por dosis fue de media de 30 millones por ml y el volumen de las pajuelas de 0,25 ml y en el IEGRA el número de espermatozoides por dosis fue de media de 60 millones por ml y el volumen de cada pajuela fue 0,5 ml.

### **2.4.3 Movilidad espermática.**

Se colocó una gota de 5 µl de semen puro en un portaobjetos atemperado a 37 °C y se observó en el microscopio de contraste de fase con un objetivo de 10 X. Se puntuó la movilidad masal de 0 a 3, considerando 0, la ausencia de movimiento y 3, ondas con movimiento muy rápido y vigoroso.

Para conocer el porcentaje de espermatozoides móviles se diluyó 250 µl de semen en 750 µl de medio. Esta dilución se observó con el objetivo 10 X al microscopio de contraste de fases provisto de una pletina calentable a 37 °C. Se considera apto a partir de una movilidad individual  $\geq 60\%$  y se consideró bueno a partir de un 70 % de espermatozoides móviles.

La calidad del movimiento se valoró de 0 a 5 de la siguiente forma subjetiva: 0: sin movimiento, 1 o ligera ondulación o vibración de la cola, sin progresión, 2 o progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento, 3 o movimiento progresivo continuo y moderada velocidad., 4 o movimiento progresivo rápido, 5 o movimiento progresivo rápido, siendo difícil seguir visualmente el movimiento de las células.

El semen se consideró apto para el almacenamiento cuando superó una vez descongelado el 40% de movilidad individual y una calidad del movimiento de 3-4.

### **2.4.4 Análisis con Sistema CASA del eyaculado bovino.**

Para realizar este análisis se utilizó el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), marca ISAS® y todas la determinaciones se realizaron a 37 °C. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers y col., 1989; Farell y col., 1995).

- De la dilución realizada para el análisis subjetivo de MI, se tomó una alícuota de 5 µl que se depositó entre cubre y porta (Tuli y col., 1992).
- Posteriormente se colocó la preparación sobre la platina del microscopio a 37 °C y se procedió a la captura de las imágenes.
- La generación de imágenes se realizó a través de una cámara de vídeo digital con un ocular fotográfico interpuesto de 3,3 X conectado al microscopio de contraste de fases y objetivo de 100 X.
- El análisis se basó en la captura de 16 imágenes fotográficas consecutivas, tomadas a intervalos de 40 ms, de cada campo microscópico seleccionado.

Las imágenes se digitalizaron mediante el software ISAS® de Movilidad.

#### **2.4.5 Anomalías morfológicas.**

El estudio de las anomalías espermáticas de cada eyaculado, se realizó por fijación con glutaraldehído al 2 % y observación al microscopio con un objetivo de 100 X clasificándose en normales y anormales.

#### **2.4.6 Análisis de la fragmentación del ADN espermático.**

##### **2.4.6.1 Test de Dispersión de la Cromatina Espermática.**

Se ha utilizado el Kit Sperm-Halomax® *Bos taurus*, (Halotech SL. Madrid. España) test que facilita la evaluación del IF.

##### **Preparación del análisis.**

- Encender los baños de agua a las temperaturas de 37 °C y 38,6 °C.
- Fundir la agarosa para realizar el microgel en un baño a 90 °C o en el microondas.
- Una vez fundida, mantener en el baño de agua a 37 °C.
- Rotular los eppendorf: Identificación del toro, fecha y secuencia temporal.
  - Temperatura de mantenimiento. (22 °C y 38,6 °C).
  - Descongelación de la dosis seminal (Apartado 4).
- Observar al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40 X (Nikon) para conseguir la concentración espermática necesaria.
- Efectuar la dilución de la muestra en PBS o Acromax® hasta conseguir una CC de  $1 \times 10^6$  c/ml.

##### **Protocolo.**

- Dividir el contenido del tubo al 50% en dos eppendorf de 0,5 ml, identificados.
  - Introducir el eppendorf en el baño a 38,6 °C y mantener la secuencia de tiempo estimada.
  - Conservar el otro eppendorf a temperatura ambiente (22 °C) durante la misma secuencia de tiempo.
- Tomar 20 µl de la dilución. Mezclar con 50 µl de agarosa líquida.
- Pipetear 10 µl de la mezcla y depositarlo en un porta pretratado (Kit Sperm-Halomax®) y cubrir con un cubreobjetos de 22 × 22 mm.

- Depositar el porta sobre una superficie metálica fría a 4 °C durante 5 min para generar un microgel de agarosa y espermatozoides.
- Quitar el cubre suavemente, evitando romper o rasgar el gel.
- Depositar la muestra en una bandeja dentro de la campana de gases. Añadir aproximadamente 10 ml de solución de lisis (Kit Sperm-Halomax®) durante 5 min.
- Lavar la muestra en agua destilada, durante 5 min.
- Deshidratar la muestra en una serie de alcoholes creciente durante 2 min cada uno. (70%, 90%, 100%)
- Colocar el porta sobre una superficie horizontal con aire seco sobre papel de filtro, durante 20 min.
- Teñir la muestra, depositando 4 ml de Gel Red en un cubre, que a continuación colocaremos sobre el minigel.
- Observar la muestra bajo el microscopio de fluorescencia.

### **Lectura de resultados.**

Se realiza el conteo de 500 espermatozoides por muestra, diferenciando entre:

- Espermatozoides fragmentados: aquellos que presentan un halo alrededor de la cabeza del espermatozoide formada por la difusión periférica de fragmentos de cromatina.
- Espermatozoides no fragmentados: presentan pequeños halos de relajación de los bucles de ADN unidos al core central.

Una vez realizado el conteo se realizará el  $P: \% \text{ espermatozoides (basales)} = (\text{Valor obtenido} \times 100)/500$ .

Este proceso se realizará hasta conseguir una fragmentación completa, en una secuencia de tiempo establecida para el análisis: momento de la descongelación o 0 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, y 240 h.

#### **2.4.6.2 Ensayo Cometa Neutro.**

El ensayo Cometa neutro analiza la naturaleza del daño en la molécula del ADN, concretamente las roturas de cadena doble del ADN del núcleo del espermatozoide.

## **Preparación de la muestra.**

La preparación del ensayo Cometa y la descongelación de la dosis se realizan del mismo modo que para el análisis de fragmentación del ADN de espermatozoides de toro con una variante en el último paso: Diluir la muestra hasta conseguir una CC de  $1 \times 10^5$  esp/ml.

## **Protocolo.**

- Fundir la agarosa y mantener a 37° C en un baño durante 20 min.
- Mezclar las células con la alícuota de agarosa a 37° C a una proporción de 2:10 (v/v) y realizar el el microgel a 4 °C durante 5 min.
- Incubar la preparación una primera solución de lisis durante 30 min.
- Incubar la preparación en una segunda solución de lisis durante 30 min.
- Colocar la muestra en Tris-Borato-EDTA (TBE 1X) solución buffer (0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico y 0,002 M EDTA) durante 10 min.
- Someter el microgel a una electroforesis con TBE 1X durante 8 min a 20 V.
- Introducir la muestra en una solución de NaCl al 0,9%, durante 2 min.
- Inmersión del microgel en una solución neutra (0,4 M Tris-hidrocloridio buffer (pH 7,5) durante 5 min.
- Volver a incluir al microgel en TBE 1X durante 2 min.
- Desecar la muestra en una sucesión de etanoles al 70%, 90% y 100% durante 2 min cada una.
- Transferir la muestra a una unidad de electroforesis horizontal con TBE 1X hasta un nivel de aproximadamente 2-3 mm sobre el microgel situado en posición horizontal, y tapar. Utilizar una corriente de 20 V continua durante 8 min.
- Extraer la muestra cuidadosamente e incluirla en una solución de NaCl al 0,9 % durante 2 min.
- Inmersión del microgel en una solución neutra durante 5 min.
- Sumergir en etanol a 70%, 90% y 100% sucesivamente durante 2 min y secar.
- Teñir la muestra con 4 µl de Gelred sobre el microgel.

## **Lectura de resultados.**

Observar al microscopio de fluorescencia la presencia de espermatozoides con dispersión de fragmentos de ADN en forma de cola, lo que corrobora la existencia de fragmentación del núcleo de los espermatozoides. Los fragmentos de ADN migraron fuera del núcleo celular hacia el ánodo y formaron una cauda o cola debido a las roturas de cadena doble en la hebra de ADN (Ostling y Johanson, 1984) dando lugar a la apariencia de cometas uniformes

en la muestra. La magnitud del daño se evaluó de acuerdo al número de células afectadas, la longitud de la cola y a la intensidad de la fluorescencia de los fragmentos (Dhawan, y col., 2009).

#### **2.4.7 Tinción de viabilidad espermática.**

El análisis de la viabilidad espermática determina el número de espermatozoides vivos y muertos que presenta cada muestra. Para la realización de este análisis se ha utilizado el Kit comercial Duo-Vital® (Halotech S.L., Madrid, España)

##### **Protocolo.**

- Diluir la muestra de esperma a una concentración final de 10-15 M por ml en PBS.
- Disponer 15 µl de la dilución obtenida en un portaobjetos limpio.
- Añadir 1 µl de fluorocromo verde y 1 µl de fluorocromo rojo (individualizados en el kit) sobre la muestra que se quiere estudiar, mezclar y colocar un cubreobjetos.

##### **Lectura de resultados.**

- Observar bajo el microscopio de fluorescencia. Efectuar el contaje de al menos 500 espermatozoides por muestra.
- Calcular el porcentaje: % espermatozoides (vivos...) =  $(\text{Valor obtenido} \times 100) / 500$ .

Este proceso se realizará para cada muestra seminal tras la descongelación de la misma.

# Resultados

## 1. Características del ADN espermático bovino.

### 1.1 Verificación del Test SCD en bovino.

El análisis de la fragmentación del ADN espermático fue realizado con el Test SCD. Con este método, es fácil identificar los espermatozoides que están fragmentados de los que no lo están. Como se muestra en la Figura 24a, tras realizar el test, los espermatozoides que aparecen con un halo de cromatina compacto, corresponden a los que presentan su ADN intacto, mientras que aquellos que están fragmentados aparecen con un gran halo de dispersión de los fragmentos de ADN.

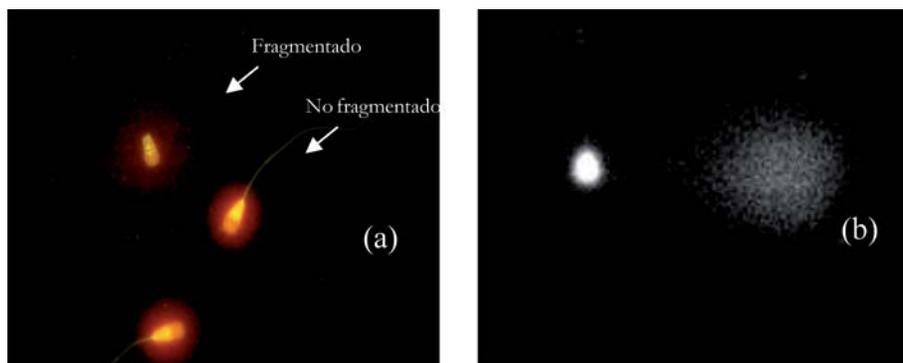
Con el fin de comprobar la eficacia técnica que va a ser utilizada, analizamos una muestra seminal de un toro, con el Test SCD y otra técnica utilizada en el análisis de la fragmentación del ADN, el ensayo Cometa neutro, que provoca la migración de los fragmentos de ADN fuera del núcleo celular, dando lugar a una cauda o cola, debido a las roturas de cadena doble en la hebra de ADN.

El ensayo Cometa neutro presenta una gran sensibilidad, pues los fragmentos producidos por las roturas que se originan en el ADN nuclear, van a ser forzados a salir de la célula al pasar la corriente eléctrica durante la electroforesis. Para realizar este experimento, utilizamos una dosis seminal criopreservada, para aplicar el Test SCD y el ensayo Cometa y los resultados obtenidos fueron del 85 y 87% respectivamente. Como se puede apreciar, los niveles de fragmentación fueron prácticamente los mismos.

La Figura 11, muestra como se observa el espermatozoide tras el ensayo Co-

meta neutro. Se muestra un espermatozoide con su ADN fragmentado, lo que provoca la migración de los fragmentos de ADN de izquierda a derecha. La nube de puntos corresponde al conjunto de fragmentos que escapan de la cabeza del espermatozoide al realizar la electroforesis.

Este resultado corroboró que no hay diferencias en función de la técnica utilizada, lo cual determinó que el Test SCD permite conocer con exactitud el IF de una dosis seminal criopreservada de toro.

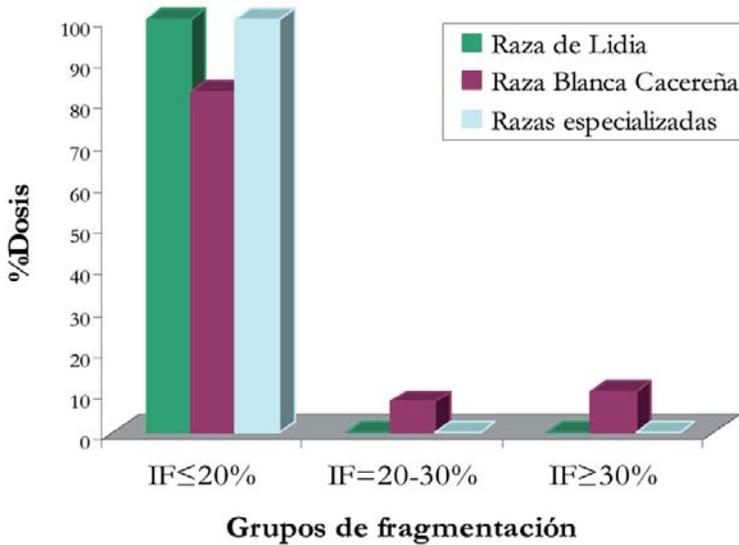


**Figura 11.** Espermatozoides fragmentados y sin fragmentar de toro de Lidia analizados por la técnica SCD (a) y por ensayo Cometa neutro (b).

## 1.2 Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino.

Para evaluar el índice de fragmentación (IF) del ADN espermático, se analizaron 150 dosis seminales criopreservadas correspondientes a 118 sementales de varias razas de la especie bovina con el Test SCD. La media obtenida fue de  $8,08\% \pm 6,48\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) con un rango de variación de 0,67%-36,33%. Ya que los índices de fragmentación muestran un rango muy amplio, se clasificaron las dosis en tres grupos en función del porcentaje de fragmentación que podría afectar a su potencial fertilidad, siguiendo las consideraciones de Rybar y col., (2004). Se establecieron tres grupos según el IF: inferior al 20%, entre el 20-30% y superior al 30%.

Al observar que 7 dosis seminales superaron el 20% de fragmentación, se realizó de nuevo otra clasificación en función de la raza: Lidia, Blanca Cacereña y razas especializadas (Charolais, Limousin, Holstein-Friesian) y los resultados indicaron que las 7 muestras pertenecieron a toros de la raza Blanca Cacereña (Figura 12).



**Figura 12.** Grupos de fragmentación del ADN espermático bovino en función de la raza

### 1.2.1 Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal.

En conjunto con el análisis de la fragmentación del ADN espermático, se realizó el seminograma en fresco (volumen, concentración, movilidad, y anomalías morfológicas) y postdescongelación (movilidad, anomalías morfológicas, y viabilidad) de los eyaculados de sementales de la raza de Lidia (N=92) y Blanca Cacerña, (N=40) y se realizó un estudio estadístico de correlación.

El análisis de calidad seminal de los eyaculados de la raza de Lidia se efectuó de forma subjetiva y los de la raza Blanca Cacerña con el sistema CASA. No se consideraron diferencias en los resultados en función del tipo de valoración, porque la evaluación subjetiva fue realizada por un técnico con experiencia.

Tras el análisis estadístico, los resultados indicaron que el IF se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho,  $P < 0,05$ ) con la movilidad masal y de forma negativa con las anomalías morfológicas y la viabilidad postdescongelación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Correlaciones de los parámetros espermáticos analizados en fresco y postdescongelación<sup>1</sup>.

	IF	VOL	CC	MM	MI	MP	CLM	AM	MID	MPD	AMD
<b>VOL</b>	0,101										
<b>CC</b>	-0,085	-0,310**									
<b>MM</b>	0,211*	0,048	0,269**								
<b>MI</b>	-0,039	0,153	0,265**	0,464**							
<b>MP</b>	-0,176	0,088	0,341**	0,339**	0,672**						
<b>CLM</b>	0,028	-0,143	0,113	0,234	0,743**						
<b>AM</b>	-0,287**	-0,116	0,295**	0,102	0,283**	0,398**					
<b>MID</b>	-0,16	0,113	0,038	0,292**	0,346**	0,335**	0,302	0,052			
<b>MPD</b>	-0,15	0,451**	0,09	0,342**	0,759**	0,631**		0,145	0,503**		
<b>AMD</b>	-0,101	0,094	0,093	0,091	0,149	0,433**		0,980**	0,149	0,166	
<b>V</b>	-0,602**	-0,098	0,261	-0,085	0,087	0,268		0,29	0,374*	0,206	0,247

La correlación Rho de Spearman es significativa \* al nivel 0,05 (bilateral) \*\* al nivel 0,01(bilateral).

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF,%) volumen (VOL, ml), concentración (CC,×10<sup>6</sup> esp/ml), anomalías morfológicas (AM, %), movilidad progresiva (MP, %), movilidad individual (MI, %), movilidad masal (MM, 0-3), movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %), movilidad individual postdescongelación (MID,%), calidad de movimiento espermático (CLM, 0-5), anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %).

El volumen del eyaculado, se correlacionó significativamente de forma negativa (Rho, P<0,01) con la concentración y de forma positiva con la movilidad progresiva postdescongelación. La concentración, se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, P<0,01) con la movilidad masal, individual, progresiva y las anomalías morfológicas. Los parámetros de movilidad espermática se relacionaron entre sí de la siguiente forma: la movilidad masal se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, P<0,01) con las

movilidades individual y progresiva en fresco e individual y progresiva postdescongelación, la movilidad individual también se correlacionó significativamente de forma positiva ( $Rho, P < 0,05$ ) con la movilidad progresiva, la calidad de movimiento, las anomalías morfológicas y con las movilidades individual y progresiva postdescongelación, la movilidad progresiva se correlacionó significativamente de forma positiva ( $Rho, P < 0,01$ ) con las anomalías morfológicas. Y el parámetro de movilidad individual espermática, analizado tras la descongelación, se correlacionó significativamente de forma positiva ( $Rho, P < 0,01$ ) con la movilidad progresiva postdescongelación y con la viabilidad postdescongelación ( $Rho, P < 0,05$ ). Por último, la presencia de anomalías morfológicas en las dosis seminales se correlacionaron significativamente de manera positiva ( $Rho, P < 0,01$ ) con las anomalías morfológicas postdescongelación.

## 2. Factores que pueden influir en la calidad seminal de las razas de Lidia y Blanca Cacereña.

### 2.1 Raza bovina.

Tras los resultados descritos en el apartado 1.2 se comprobó que existen diferencias significativas entre la raza bovina y el conjunto de parámetros seminales analizados.

Para el IF hubo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) siendo superior en la raza Blanca Cacereña ( $N=40$ ) con un  $13,97\% \pm 9,03\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) dentro del rango del 2,00%-36,33%. En la raza de Lidia ( $N=92$ ) se obtuvo un  $6,05\% \pm 3,10\%$ , con un rango del 0,67%-14,33%, y para el grupo de tres razas especializadas ( $N=18$ ) del  $5,42\% \pm 4,20\%$  con un rango del 1,00%-18,00%. También la raza tuvo efectos significativos ( $P < 0,001$ ) en el volumen del eyaculado y las anomalías morfológicas postdescongelación. Los toros de las razas especializadas produjeron un mayor volumen de semen (17 ml;  $N=4$ ) que los de la raza de Lidia (8,37 ml;  $N=82$ ) y los de la raza Blanca Cacereña (8,89 ml;  $N=40$ ). Con respecto a, las anomalías morfológicas postdescongelación, destacó la raza Blanca Cacereña (23,39%;  $N=9$ ) sobre la raza de Lidia (10,65%;  $N=82$ ) y las razas especializadas (9,00%;  $N=4$ ).

El resto de parámetros espermáticos (la movilidad masal, individual, progresiva, las anomalías morfológicas en fresco, y la movilidad individual y progresiva postdescongelación) no presentaron diferencias significativas entre razas ( $P > 0,05$ ), mostrando poca variabilidad entre sementales (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros espermáticos<sup>1</sup> de eyaculados en fresco y postdescongelación de toros de la raza de Lidia, Blanca Cacereña y razas especializadas.

PARÁMETROS	Lidia	Blanca Cacereña	Razas especializadas
IF	6,05±3,10 <sup>a</sup>	13,97±9,03 <sup>b</sup>	5,42±4,20 <sup>a</sup>
VOL	8,37±3,97 <sup>a</sup>	8,89±3,83 <sup>a</sup>	17,00±2,94 <sup>b</sup>
CC	977,70± 368,33	941,96± 366,72	615,00± 199,08
MM	1,68±0,93		1,75±,50
MI	73,31±11,75	76,60±6,73	77,50±8,66
MP	68,41±11,36	-	70,00±8,17
CLM	-	3,74±0,39	-
AM	10,55±2,85	-	9,00±0,82
MID	34,17±11,49	37,13±7,50	32,50±15,55
MPD	64,69±16,39	-	57,50±32,02
AMD	10,65±3,07 <sup>a</sup>	23,39±7,72 <sup>b</sup>	9,00±0,82 <sup>a</sup>

Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas, Student-Newman-Keuls  
<sup>a, b</sup> P<0,001; Los valores son la media ± SD.

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml), concentración (CC, ×10<sup>6</sup> esp/ml) anomalías morfológicas (AM, %), movilidad progresiva (MP, %) movilidad individual (MI, %) movilidad masal (MM, 0-3) movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %) movilidad individual postdescongelación (MID, %) calidad del movimiento espermático (CLM, 0-5), y anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %).

Tras el análisis del conjunto de parámetros seminales en función de la raza, se observaron diferencias con respecto al volumen seminal, el IF y las anomalías morfológicas postdescongelación, destacando los toros de la raza Blanca Cacereña con los niveles más elevados en los dos últimos parámetros descritos.

## 2.2 Método de extracción utilizado.

### 2.2.1 Extracción seminal por vagina artificial frente a electroeyaculación en la raza Blanca Cacerña.

Otro de los factores que pueden influir en la calidad seminal de un eyaculado, es el método de extracción seminal utilizado. Para su análisis, se realizó una extracción con vagina artificial y otra por electroeyaculación al mismo toro (N=6) de la raza Blanca Cacerña con un intervalo de tiempo entre cada extracción de 7 días. Los resultados mostraron que los eyaculados obtenidos no presentaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) con respecto al IF y el resto de parámetros espermáticos analizados: el volumen, la concentración, la movilidad masal e individual en fresco y postdescongelación, la movilidad individual, las anomalías morfológicas y el movimiento de los espermatozoides: estáticos, lentos, medios y rápidos progresivos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparativa de los parámetros espermáticos<sup>1</sup> de eyaculados en fresco y postdescongelación analizados tras la extracción con vagina artificial y por electroeyaculación.

PARÁMETROS	Método de extracción	
	Electroeyaculación	Vagina Artificial
IF	8,50±3,23	9,39±5,39
VOL	11,42±3,77	12,75±2,82
CC	561,67±193,81	692,75±290,07
MM	1,88±0,21	1,71±0,46
MI	76,67±4,08	73,00±5,09
MID	37,50±8,80	41,67±4,08
E	12,45±4,01	15,72±6,67
L	2,25±1,85	1,15±0,55
M	10,28±7,42	4,03±3,00
RP	73,30±5,94	75,25±6,59
AMD	28,17±11,09	21,00±5,06

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF, %), volumen (VOL, ml), concentración (CC,  $\times 10^6$  esp/ml), movilidad individual (MI, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %), espermatozoides estáticos (E, %), lentos (L, %), medios (M, %) y rápidos progresivos (RP, %), anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %). Los valores son la media  $\pm$  SD.

Los resultados obtenidos indican que el método de extracción (vagina artificial y electroeyaculación) no influye en la fragmentación del ADN espermático ni en el resto de parámetros de calidad seminal analizados.

### **2.2.2 Extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.**

Este método de obtención espermática, se utiliza en situaciones concretas, como es el caso de la raza de Lidia, cuando el toro demuestra buenas características etológicas durante su lidia en la plaza. Para valorar su efecto, se analizaron las características seminales tras realizar la extracción *postmórtem* (N=10) y por electroeyaculación (N=74) a diferentes toros de Lidia, encontrándose diferencias significativas ( $P<0,001$ ) para el IF, el volumen, la concentración, las movilidades masal, individual, progresiva y ( $P<0,05$ ) progresiva postdescongelación y una tendencia positiva ( $P<0,07$ ) con la viabilidad postdescongelación (Tabla 5).

Al observar los datos obtenidos de los eyaculados extraídos *postmórtem*, los valores fueron más bajos para el IF (2,90% vs. 6,46 %), el volumen (4,00 ml vs. 14,05 ml), la movilidad masal (0,00 vs. 1,89), la movilidad individual (60,50% vs. 75,07%), la movilidad progresiva (58,33% vs. 69,66%) y también, la movilidad progresiva postdescongelación (52,86% vs. 66,12%) y más elevados para la concentración espermática ( $1385,88 \times 10^6$  esp/ml vs.  $932,97 \times 10^6$  esp/ml) y la viabilidad postdescongelación (34,71% vs. 23,09%).

El resto de parámetros no presentaron significación ( $P>0,05$ ).

De los resultados se desprende que los espermatozoides obtenidos directamente de la cola del epidídimo o *postmórtem* presentan mejores características espermáticas frente al IF, la concentración y la viabilidad postdescongelación, y peores frente al volumen y los parámetros de movilidad.

**Tabla 5.** Comparativa de los parámetros espermáticos<sup>1</sup> de eyaculados en fresco y postdescongelación obtenidos por extracción postmórtem y por electroeyaculación<sup>2</sup>.

PARÁMETROS	Método de extracción	
	Postmórtem	Electroeyaculación
IF	2,90±1,506 <sup>a</sup>	6,46±2,963 <sup>b</sup>
VOL	4,00±4,637 <sup>a</sup>	14,05±6,902 <sup>b</sup>
CC	1385,88±732,691 <sup>a</sup>	932,97±279,299 <sup>b</sup>
MM	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,89±0,756 <sup>b</sup>
MI	60,50±24,994 <sup>a</sup>	75,07±7,288 <sup>b</sup>
MP	58,33±26,926 <sup>a</sup>	69,66±7,087 <sup>b</sup>
AM	11,33±5,339	10,45±2,421
MID	32,44±13,324	34,38±11,333
MPD	52,86±29,980 <sup>c</sup>	66,12±13,702 <sup>d</sup>
AMD	11,33±5,339	10,56±2,718
V	34,71±14,102	23,09±15,234

<sup>a,b</sup> Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas, Student-Newman-Keuls <sup>a,b</sup> P<0,001; <sup>c,d</sup> P<0,05. Los valores son la media ± SD.

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml), concentración (CC, ×10<sup>6</sup> esp/ml), movilidad masal (MM, 0-3), movilidad individual (MI, %), movilidad progresiva (MP, %), anomalías morfológicas (AM, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %), movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %), anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %).

<sup>2</sup>Electroeyaculación: (N=74 en IF; N=58 en MP; N=35 en V; N=73 en VOL, CC, MM, MI, MID, MPD, AM, AMD). Postmórtem: (N=10 en IF y en MI; N=9 en VOL, MM, MP, AM, MID, AMD; N=8 en CC; N=7 en MPD y V).

## 2.3 Edad.

Otro de los factores analizados fue la influencia de la edad en la calidad seminal. Se subdivide en función de la raza, por la particularidad que presentan en el manejo, los toros de la raza de Lidia al alcanzar habitualmente la sementud como sementales.

### 2.3.1 Raza de Lidia.

Con respecto a la edad de los toros de Lidia analizados, se diferenciaron 3 grupos: jóvenes ( $\leq 3$  años, N=9) adultos ( $>3$  y  $\leq 8$  años, N=32) y viejos ( $>9$  años, N=37).

**Tabla 6.** Comparativa de los parámetros espermáticos<sup>1</sup> en función de los grupos de edad en la raza de Lidia.

PARÁMETROS	Joven: $\leq 3$ años	Adulto: $>3$ y $\leq 8$ años	Viejo: $>9$ años
IF	4,41 $\pm$ 2,76 <sup>a</sup>	5,27 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	8,04 $\pm$ 2,97 <sup>b</sup>
VOL	6,56 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>	8,09 $\pm$ 3,11 <sup>ab</sup>	10,34 $\pm$ 3,64 <sup>b</sup>
CC	978,89 $\pm$ 378,04	946,97 $\pm$ 235,80	895,15 $\pm$ 282,04
MM	2,11 $\pm$ 0,72	1,83 $\pm$ 0,89	1,88 $\pm$ 0,64
MI	75,56 $\pm$ 6,82	75,64 $\pm$ 7,12	74,56 $\pm$ 7,72
MP	72,78 $\pm$ 9,05	69,83 $\pm$ 6,75	68,68 $\pm$ 6,89
AM	10,22 $\pm$ 2,22	10,62 $\pm$ 2,78	10 32 $\pm$ 2,28
MID	40,56 $\pm$ 11,02	36,21 $\pm$ 12,30	31,76 $\pm$ 9,53
MPD	72,50 $\pm$ 8,22	65,91 $\pm$ 13,06	66,21 $\pm$ 13,67
AMD	10,22 $\pm$ 2,22	10,76 $\pm$ 2,76	10,44 $\pm$ 2,88
V	33,92 $\pm$ 24,44	23,51 $\pm$ 14,03	21,74 $\pm$ 15,52

<sup>a, b</sup>Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas (Student-Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ). Los valores son la media  $\pm$ SD.

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml), concentración (CC,  $\times 10^6$  esp/ml), movilidad masal (MM, 0-3), movilidad individual (MI, %), movilidad progresiva (MP, %), anomalías morfológicas (AM, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %), movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %), anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %).

Tras el análisis estadístico se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) para el IF y ( $P < 0,003$ ) para el volumen seminal. Los resultados indicaron que los toros jóvenes y adultos presentaron un IF inferior a los toros viejos (4,41% y 5,27% vs. 8,04%). El volumen seminal también presentó diferencias pero en este caso, entre los toros jóvenes y viejos (6,56 ml vs. 10,34 ml) sin diferencias entre jóvenes y adultos (Tabla 6). Con el resto de parámetros seminales analizados no hubo significación estadística ( $P > 0,05$ ).

Estos resultados indicarían que a partir de los 9 años de edad se produciría un aumento del IF y el volumen seminal.

### 2.3.2 Raza Blanca Cacerreña.

Los toros de la raza Blanca Cacerreña se subdividieron en dos grupos de edad: jóvenes ( $\leq 3$  años;  $N=32$ ) y adultos ( $>3$  y  $\leq 8$  años;  $N=8$ ), no observándose diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en ningún parámetro espermático analizado (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparativa de los parámetros espermáticos<sup>1</sup> en función de los grupos de edad en la raza Blanca Cacerreña.

PARÁMETROS	Joven $\leq 3$ años	Adulto $>3$ y $\leq 8$ años
IF	14,80 $\pm$ 9,78	10,62 $\pm$ 3,80
VOL	8,80 $\pm$ 3,95	9,25 $\pm$ 3,56
CC	946,95 $\pm$ 381,19	921,96 $\pm$ 324,34
CLM	3,77 $\pm$ 0,37	3,63 $\pm$ 0,48
MI	76,46 $\pm$ 5,61	77,50 $\pm$ 13,23
MID	37,97 $\pm$ 7,92	33,75 $\pm$ 4,43

<sup>1</sup>Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml), concentración (CC,  $\times 10^6$  esp/ml, calidad del movimiento espermático (CLM, 0-5) movilidad individual (MI, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %). Los valores son la media  $\pm$  SD.

Los resultados descritos muestran que hasta los 8 años de edad no existe influencia en los parámetros espermáticos analizados en los toros de esta raza.

### 3. Dinámica de la fragmentación del ADN espermático bovino

El estudio del índice de fragmentación del ADN espermático de un eyaculado es un parámetro importante para ver los niveles de fragmentación de una muestra seminal. Pero también lo es conocer la integridad de la cromatina espermática con el paso del tiempo.

Para ello se analizó la dinámica de fragmentación del ADN espermático de muestras seminales de ganado bovino durante su incubación a diferentes temperaturas (a 22 °C considerado como T<sup>a</sup> ambiente y a 38,6 °C como T<sup>a</sup> corporal de la hembra).

Para analizar el efecto temporal en el IF, se definieron doce intervalos de tiempo: desde el momento de la descongelación o 0 h, hasta las 240 h. (0 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h y 240 h). Desde el punto de vista reproductivo no tiene mucho interés alcanzar las 240 h de incubación pues según Thomas, y col., (1998) los espermatozoides no sobreviven más de 72 h en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo, conocer el número de horas que el espermatozoide de bovino necesita para alcanzar un índice de fragmentación del 100% es de suma importancia a la hora de comparar los diferentes eyaculados.

Para el análisis estadístico de la función de supervivencia del ADN espermático se utilizó la información extraída hasta las 96 h de incubación.

#### 3.1 Efecto de la temperatura de incubación.

Se incubaron *in vitro* 92 dosis de la raza de Lidia desde el momento de la descongelación hasta las 240 h de incubación a dos temperaturas diferentes (22 °C y 38,6 °C) para conocer el límite temporal del eyaculado con una fragmentación del ADN completa o cercana al 100% (Tabla 8).

**Tabla 8.** Dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia a 38,6 °C y a 22 °C durante 240 h de incubación.

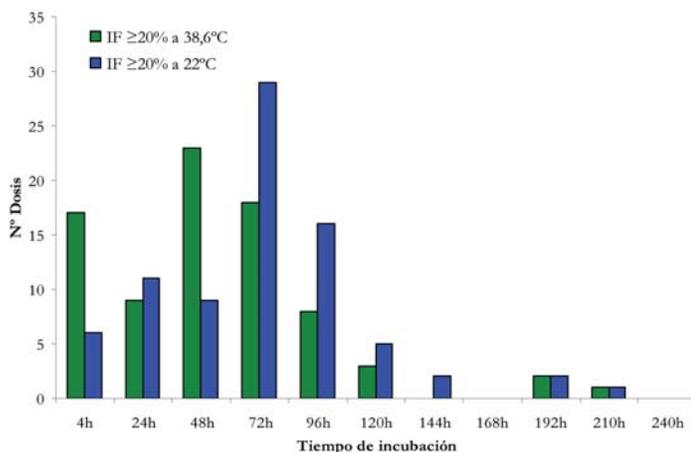
T <sup>a</sup>	0 h	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<b>IF 38,6 °C</b>	6,05±3,10	15,31±18,98	24,30±26,54	38,26±31,16	55,81±34,10	72,85±31,13
<b>IF 22 °C</b>	6,05±3,10	10,11±11,19	15,39±17,27	21,90±22,60	40,71±30,17	60,92±30,15
T <sup>a</sup>	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
<b>IF 38,6 °C</b>	79,47±29,66	84,06±28,83	87,64±26,97	92,46±21,68	96,28±15,40	97,31±13,90
<b>IF 22 °C</b>	71,10±28,74	77,57±27,07	81,92±26,75	88,02±23,07	90,59±20,81	93,52±17,39

Los valores son la media ± SD.

Al realizar las medias de los porcentajes de fragmentación del ADN espermático se observó, que el IF se incrementó desde el inicio de la incubación *in vitro* a las dos temperaturas. El IF inicial fue del  $6,05\% \pm 3,10\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) y tras 240 h de incubación, prácticamente se habían degradado en su totalidad con un IF del  $97,31\% \pm 13,90\%$  a  $38,6\text{ }^\circ\text{C}$  y del  $93,52\% \pm 17,39\%$  a  $22\text{ }^\circ\text{C}$ . También se observó que tras 48 h de incubación a las dos temperaturas los espermatozoides habían alcanzado una fragmentación del ADN superior al 20% ( $T^a\ 38,6\text{ }^\circ\text{C}$ :  $38,26 \pm 31,16\%$ ;  $T^a\ 22\text{ }^\circ\text{C}$ :  $21,90 \pm 22,60\%$ ).

Conocidas las dinámicas en función de la temperatura de incubación, se calculó la velocidad de degradación del ADN de los espermatozoides *in vitro*. El progreso de la fragmentación del ADN fue más rápido entre las 0 h-48 h de incubación a  $38,6\text{ }^\circ\text{C}$  mientras que a  $22\text{ }^\circ\text{C}$  la velocidad se incrementó súbitamente a partir de las 48 h-72 h. En ambos casos a partir de las 96 h de incubación la velocidad se ralentizó y, prácticamente, los resultados fueron similares, en las dos temperaturas, hasta el final del estudio. Una vez determinada la velocidad de degradación del ADN, de las dosis incubadas, los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la clasificación realizada por Rybar y col., (2004) que estableció que las dosis con un  $\text{IF} \geq 20\%$  podrían presentar problemas de infertilidad (Figura 13).

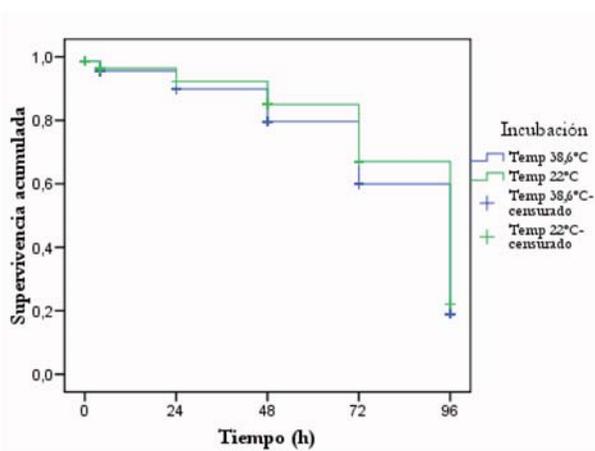
A la temperatura del tracto genital de la hembra ( $38,6\text{ }^\circ\text{C}$ ) se observó que hasta las 48 h de incubación el  $53,26\%$  ( $N=49$ ) de las dosis ya habrían alcanzado el valor de  $\text{IF} \geq 20\%$ .



**Figura 13.** Número de dosis que alcanzan un  $\text{IF} \geq 20\%$  en función del tiempo y la temperatura de incubación.

Sin embargo, a temperatura ambiente (22 °C) la degradación mayoritaria del ADN espermático se produjo desde el inicio hasta las 72 h, con el 59,78% (N=55) de las dosis incubadas con un valor de  $IF \geq 20\%$ . Por tanto, podríamos considerar que las 48 h a 38,6 °C y las 72 h a 22 °C es el límite temporal de estabilidad del núcleo espermático en los toros de la raza de Lidia (Figura 13).

Se utilizó la función de supervivencia de Kaplan Meier para estudiar las diferencias en la velocidad de degradación espermática del ADN en función de la temperatura de incubación *in vitro* (Figura 14). Los resultados obtenidos indicaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ), siendo la velocidad de degradación del ADN espermático más elevada a temperatura corporal de la hembra (38,6 °C).



**Figura 14.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático del toro de Lidia hasta las 96 h e incubación a 38,6 °C y a 22 °C.

### 3.1.1 Efecto de la extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.

Se realizó la dinámica de fragmentación del ADN espermático *in vitro* en 10 dosis seminales obtenidas tras realizar la extracción *postmórtem* por flujo retrógrado de la cola del epidídimo, de este modo, podemos conocer la posible influencia de este método de obtención en el ADN de los espermatozoides. Los resultados de los porcentajes medios de los espermatozoides fragmentados una vez incubados a 22 °C y a 38,6 °C, a las 0, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, se indican en la Tabla 9.

Se observó que desde el momento de la descongelación de las dosis (2,90%±1,50%), la fragmentación del ADN espermático aumentó progresiva-

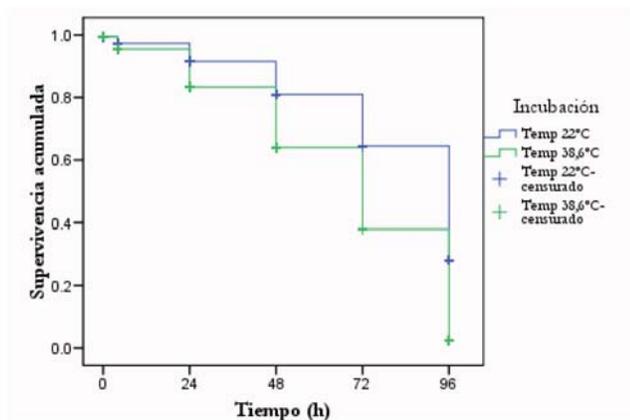
mente a las dos temperaturas, hasta degradarse prácticamente por completo a 38,6 °C (93,47%±6,54%) y presentando una estabilidad cromatínica mayor a 22 °C (55,04%±22,46%).

**Tabla 9.** Dinámica de fragmentación postmórtem a 38,6 °C y 22 °C hasta 96 h de incubación.

Tª	0 h	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<b>IF 38,6 °C</b>	2,9±1,50	20,43±18,30	50,97±26,75	69,73±26,09	81,33±24,27	93,47±6,54
<b>IF 22 °C</b>	2,9±1,50	10,23±8,07	22,23±12,82	31,93±21,25	38,00±21,88	55,04±22,46

Los valores son la media±SD

A continuación, se utilizó la función de supervivencia de Kaplan Meier, para comparar las dinámicas de fragmentación del ADN espermático tras la extracción *postmórtem*, en función de la temperatura (Figura 15). El resultado indicó la existencia de diferencias significativas ( $P<0,001$ ), con una degradación más rápida a 38,6 °C.



**Figura 15.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia por extracción *postmórtem* en función de la temperatura de incubación a 38,6 °C y a 22 °C.

### 3.2 Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia.

Realizar las dinámicas de fragmentación el ADN espermático en diferentes muestras seminales pertenecientes al mismo y a diferentes individuos, nos permite dar a conocer la posible variabilidad intra e inter-individual de la raza de Lidia a nivel de este parámetro.

Se ha observado que existe variabilidad inter-individual en los resultados de

las dinámicas del IF. Algunas dosis mostraron un incremento más rápido de la inestabilidad del ADN espermático alcanzando niveles muy elevados de fragmentación del ADN en tan sólo 4 h de incubación (N=7) y otras, por el contrario, fueron más estables en el tiempo al degradarse con posterioridad en diferentes momentos durante la incubación hasta las 240 h.

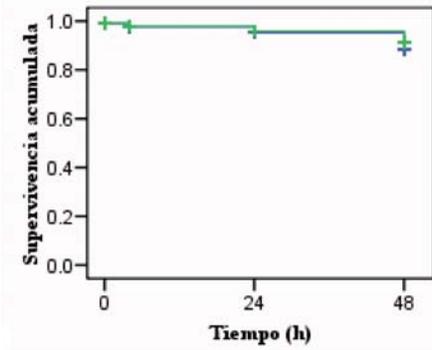
Una vez observado que hay variabilidad inter-individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático, se analizó la posible existencia de variabilidad intra-individual. Para ello, se compararon las dinámicas de dosis seminales obtenidas a partir de varios eyaculados de un mismo individuo (extraídos en épocas diferentes) y por otra parte, se analizaron dos dosis pertenecientes al mismo eyaculado de un semental.

### **3.2.1 Estudio comparativo de dosis seminales procedentes del mismo eyaculado.**

Se han analizado las dinámicas de fragmentación del ADN espermático durante 96 h de incubación *in vitro* a 38,6 °C de 2 dosis criopreservadas, obtenidas del mismo eyaculado de sementales (N=5) de la raza de Lidia.

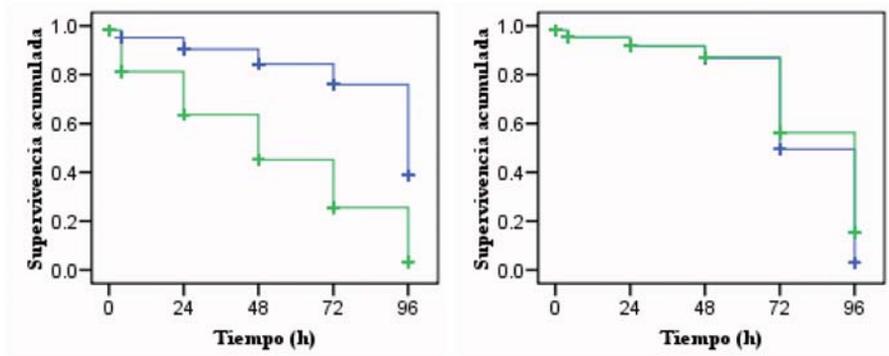
Tras el análisis se observó que, ( $P > 0,05$ ) no hubo diferencias significativas (Figura 16) a excepción de las dosis pertenecientes al eyaculado del toro identificado como nº 5 ( $P < 0,001$ ). Para verificar este resultado, se realizó la dinámica de fragmentación de las dos dosis, a temperatura ambiente (22 °C) no encontrándose diferencias ( $P > 0,05$ ) lo que indica que, pudo deberse a un fallo en el procesado de las muestras. (Figura 17).

De los resultados se desprende que no hay variabilidad intra-individual en la dinámica del IF, en las dosis seminales que se obtienen a partir de un eyaculado.



**Toro n° 1**

**Figura 16.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de 2 dosis seminales del mismo eyaculado del toro n° 1).



**Toro n° 4 a)**

**Toro n° 4 b)**

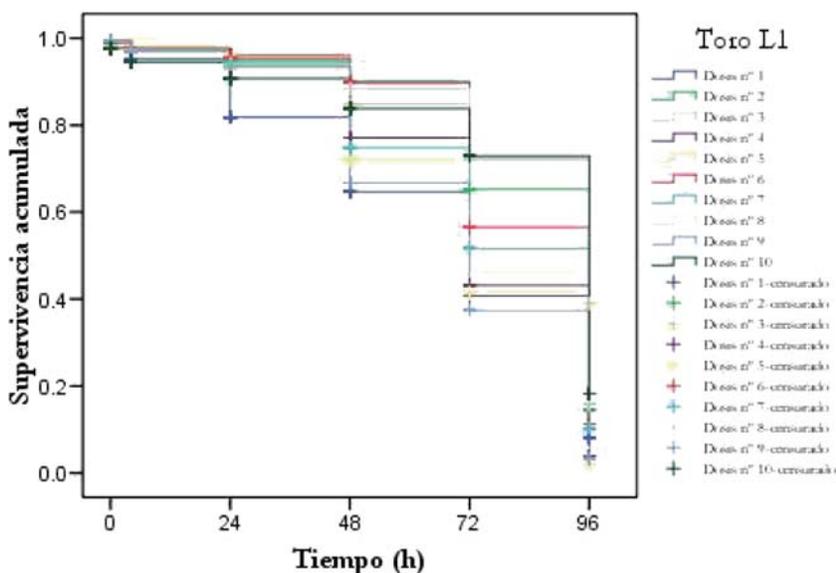
**Figura 17.** Dinámica de fragmentación del ADN espermático de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro n° 4: a) a 38,6 °C y b) a 22 °C..

### 3.2.2 Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental.

Tras los resultados del apartado anterior, se han analizado las dinámicas del IF durante 96 h de incubación *in vitro* a 38,6 °C de dosis criopreservadas pertenecientes a eyaculados extraídos en épocas diferentes (mínimo 3 meses entre cada extracción) de 7 toros de la raza de Lidia: 10 dosis del toro L1 (Figura 18); 8 dosis del toro L2; 5 dosis del toro L3; 2 dosis del toro L4; 2 dosis

del toro L5; 5 dosis del toro L6 y 3 dosis del toro L7. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en todos los casos.

Estos resultados indican que, existe variabilidad intra-individual sobre la dinámica del IF entre eyaculados diferentes de un mismo semental (extraídos en épocas diferentes).



**Figura 18.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático del toro L1 (10 dosis).

### 3.3 Estudio comparativo en dosis seminales extraídas por vagina artificial y por electroeyaculación.

Tras los resultados del apartado 2.2.1, se analizó la influencia del método de extracción utilizado, en la dinámica de fragmentación del ADN espermático a partir de dosis seminales de eyaculados extraídos por vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE) al mismo toro ( $N=6$ ) de la raza Blanca Cacerña, con un intervalo de tiempo entre cada extracción de 7 días (Tabla 10).

Se realizó la incubación *in vitro* a  $38,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde el momento de la descongelación hasta las 96 h de incubación y se observó que para las 6 dosis obtenidas por vagina artificial el IF inicial de  $9,39\% \pm 5,39\%$  aumentó hasta el  $31,83\% \pm 12,13\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) y para las 6 dosis extraídas por electroeyaculación se obtuvo un IF inicial del  $8,50\% \pm 3,23\%$  que aumentó hasta  $34,83\% \pm 16,21\%$  (media  $\pm$  desviación estándar).

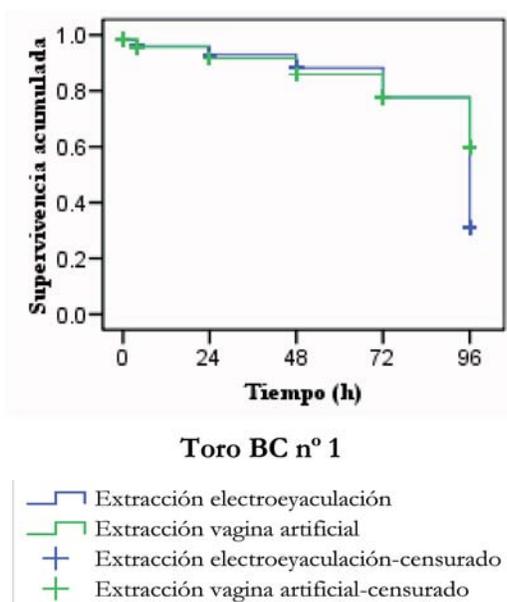
**Tabla 10.** Dinámica de fragmentación del ADN espermático de dosis pertenecientes a 6 toros de la raza Blanca Cacerña por vagina artificial (N=6) y por electroeyaculación (N=6) a 38,6 °C.

Tª	0 h	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
VA	9,39±5,39	14,22±5,17	18,17±6,64	20,61±8,19	25,39±10,04	31,83±12,13
EE	8,50±3,23	9,67±2,60	11,50±2,32	16,11±3,71	24,28±9,86	34,83±16,21

Los valores son la media±SD.

Se realizó la función de supervivencia Kaplan Meier para determinar el efecto del método de extracción, no encontrándose diferencias significativas ( $P>0,05$ ) en la dinámica de fragmentación entre las dosis de cada toro (Figura 19).

Los resultados muestran que el método de extracción seminal (vagina artificial vs. electroeyaculación) no influye en la dinámica de fragmentación del ADN espermático.



**Figura 19.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de 2 dosis seminales criopreservadas de eyaculados extraídos por VA (N=1) y EE (N=1) de los toros BC nº 1.



# Discusión

## 1. Características del ADN espermático bovino.

### 1.1 Verificación del Test SCD en bovino.

En este trabajo, se comprobó la eficacia de dos técnicas diferentes: el Test SCD (Fernández y col., 2007) y el ensayo Cometa neutro (Singh, y col., 1988; Slowinska y col., 2008; Speit y col., 2009; Enciso y col., 2009) para analizar la fragmentación del ADN espermático de ganado bovino. Ambas técnicas detectan la presencia o no, de roturas en el ADN nuclear a través de los residuos cromatínicos que surgen de la extracción de las proteínas, tras completarse el proceso de lisis (Fernández y col., 2007; Gosálvez y col., 2013). Las dos técnicas revelan esta alteración, ya sea variando la morfología de los cometas o el tamaño de los halos en función del número de roturas existentes en el ADN.

Los resultados indican la existencia de una asociación directa entre los espermatozoides con el ADN fragmentado y la presencia de halos grandes de dispersión de cromatina alrededor del núcleo (Test SCD) como de cometas de longitud variable (ensayo Cometa neutro).

La interpretación de los resultados tras realizar el Test SCD fue sencilla, se observaron imágenes donde los núcleos y distribución del ADN de cada célula, presentaron un aspecto similar a las obtenidas en otras especies como el verraco, el ratón o la oveja (Rodríguez y col., 2005; Enciso y col., 2006b; López-Fernández y col., 2007). Los morfotipos nucleares con fragmentación del ADN fueron muy evidentes en aquellos donde la cromatina estaba muy degradada y por tanto, muy dispersa. El morfotipo de esta dispersión fue similar a la diversidad de morfologías en forma de cola de cometa, que presentó la muestra tras realizar el ensayo Cometa neutro.

El 85% y 87% de los espermatozoides presentaron núcleos con el ADN muy disperso alrededor de la cabeza del espermatozoide tras realizar, el Test SCD y el ensayo Cometa neutro, respectivamente, relacionándose ambos resultados con la fragmentación del ADN espermático presente en la muestra analizada. Estos mismos resultados ya se han encontrado en otras especies de mamíferos (Cortés-Gutiérrez y col., 2008; Zee, y col., 2009; Pérez Llano y col., 2010; Gosálvez y col., 2011a).

Además, se comprobó que el Test SCD identifica una clase de espermatozoides caracterizados por roturas simples y/o dobles en la cadena de ADN de dosis seminales de toro de Lidia en concordancia con otros autores (Gosálvez y col., 2007; Martínez-Pastor y col., 2009). Se reveló como una técnica rápida, económica y de sencilla interpretación, que sin un equipamiento laboratorial especial y aplicando la metodología especificada en este trabajo, es una herramienta muy útil para complementar la evaluación rutinaria de la calidad seminal en bovino (Gosálvez y col., 2011c).

## **1.2 Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino.**

El objetivo fundamental de esta tesis, es conocer mejor la calidad espermática del semen de ganado vacuno de Lidia. El seminograma clásico de la especie bovina debe recoger, al menos, los siguientes parámetros: volumen, concentración, movilidad masal y progresiva, morfología y viabilidad (Christensen y col., 1999). Sin embargo, en los últimos años, un nuevo parámetro, la fragmentación del ADN espermático, se está teniendo en cuenta cuando hablamos de calidad seminal. Por ello, en primer lugar, se determinó el nivel basal de IF medio del eyaculado de los toros muestreados.

Se utilizaron muestras criopreservadas de toros de la raza de Lidia, Blanca Cacereña y de razas especializadas (Charolais, Limousin, Holstein) y los resultados mostraron un IF del 8,08% coincidente con Januskauskas y col., (2001) que utilizando la técnica SCSA y Addad y col., (2009) usando el TUNEL, señalaron un IF del 8,00% y 8,80%, respectivamente; y Dobrinski y col., (1994) y Malama y col., (2012) que estimaron como satisfactoria una media del 7% con SCSA.

Trabajos anteriores demostraron que existe una fuerte asociación negativa entre el nivel de IF y la fertilidad del toro (Ballachey y col., 1987; Bochenek y col., 2001; Januskauskas y col., 2003; Fraser, 2004; Fatehi y col., 2005; Waterhouse y col., 2006; Rybar y col., 2010; Karoui y col., 2012), y que valores elevados de IF en el eyaculado del toro provocan un descenso en la fecundación,

la calidad embrionaria (Waterhouse y col., 2006; Rybar y col., 2010) y la capacidad de desarrollo de embriones bovinos *in vitro* (Evenson y Wixon, 2006; Kasimanickam y col., 2006; D'Occhio y col., 2007; Khalifa y col., 2008). Esta correlación también ha sido establecida en condiciones experimentales. Fernández-González y col., (2008) tras inducir daño en el ADN del genoma paterno de ratón, demostraron una fuerte relación entre la fragmentación del ADN espermático y el desarrollo embrionario y la existencia de malformaciones en los recién nacidos e incluso en las generaciones siguientes.

Dado que en nuestro estudio no se pudo relacionar el nivel de IF de las dosis analizadas con datos de fertilidad de hembras inseminadas, fue imposible determinar el umbral a partir del cual la fragmentación del ADN espermático podría llegar a jugar un papel importante en la infertilidad bovina. Rybar y col., (2004) han propuesto un valor aproximado del 4% para toros fértiles (N=31) y un 14,20% para toros subfértiles (N= 6), defendiendo que valores de IF inferiores al 15-20% no supondrían retrocesos apreciables en la fertilidad, pero sí los superiores al 20% que causarían un impacto negativo del 10% sobre la tasa de preñez. Asimismo, Rybar y col., (2004) estimó que una dosis tendría comprometida su fertilidad con un  $IF \geq 20\%$ , mientras que Dobrinski y col., (1994) bajan ese valor al 13% y Bochenek y col., (2001) lo elevan hasta un 25% de anomalías en la cromatina bovina.

En nuestro caso, aplicando las consideraciones de Rybar y col., (2004) de las 150 dosis seminales analizadas, un 95,34% (N=143) presentaron valores aceptables de IF (<20%) y un 4,70% (N=7) superaron ese umbral, siendo consideradas como dosis con una integridad del ADN espermático pobre. Destacar el hecho de que este último grupo de dosis, pertenecen a sementales de la raza Blanca Cacereña, lo que indica que del total de dosis analizadas de esta raza (N=40) un 17,50% son susceptibles de poseer un bajo potencial de fertilidad, lo que podría explicarse por la escasez de sementales disponibles y los altos niveles de consanguinidad de la raza (Bartolomé y García, 1998; Calero y col., 2007) que obliga a aceptar como reproductores animales de calidad seminal dudosa (Apartado Introducción 2.4).

Comparando los niveles de fragmentación basal obtenidos en ganado bovino, con otras especies ganaderas, podemos comprobar la existencia de diferencias inter-específicas. Así, con respecto al morueco, otra especie rumiante, se observó que éste presenta un IF basal similar al obtenido en este estudio. Los resultados de Gosálvez y col., (2008) mostraron una media de IF del  $6,40 \pm 7,90\%$  (N=113); Enciso y col., (2009) obtuvo un IF de  $5,94 \pm 0,77\%$  (N=70), similar a López-Fernández y col., (2008a) que indicaron un IF inferior al 5%

en la mayoría de los individuos analizados (N=25) y Enciso (2010) utilizando dos técnicas diferentes en 20 individuos obtuvieron un  $7,26\pm 2,19\%$  con el Test SCD y un  $8,06\pm 2,01\%$  con el ensayo ISNT (N=20). Sin embargo, García-Macías y col., (2006) encontraron un IF basal más bajo para el morueco ( $1,80\pm 0,40\%$ ; N=17).

Por otro lado, los valores basales descritos de IF en el verraco son inferiores al toro, del 5% (Martínez, 2005; Boe-Hansen y col., 2005; Pérez-Llano y col., 2006; López-Fernández y col., 2008b) o del 6%, como máximo (Didion y col., 2009). Otros autores incluso han bajado esa cifra al 2,1% (Enciso y col., 2006b, 2009), situando el umbral de riesgo para la fertilidad del verraco en un IF máximo del 8% (Rybar y col., 2004; López-Fernández y col., 2008a; López-Fernández y col., 2008b), bastante inferior al del toro.

En la bibliografía existente sobre sementales equinos, se observó que poseen una tasa basal de IF más alta que el resto. Morrel y col., (2008) establecieron un rango del 4,80%-19,00% (N=37) y Enciso (2010), utilizando las técnicas SCD y el ISNT, obtuvo un  $10,35\pm 1,95\%$  y un  $11,11\pm 2,27\%$ , respectivamente, sobre una muestra de 19 ejemplares. Estos valores son similares a los obtenidos por López-Fernández y col., (2007), que obtuvieron un IF del  $14,20\pm 8,80\%$  (N=23) y Cortés-Gutiérrez y col. (2007) que obtuvieron un  $13,00\pm 6,05\%$  (N=4) en caballo y un  $12,25\pm 7,41\%$  (N=4) en burros de raza Zamorano-Leonesa. Al año siguiente, estos mismos autores encontraron resultados más elevados en 20 burros de la misma raza: un IF del  $18,20\pm 14,77\%$  aplicando la técnica SCD y un  $22,00\pm 19,34\%$  con el Ensayo Cometa (Cortés-Gutiérrez y col., 2008). Con respecto al umbral fértil en esta especie, Love y Kennedy (2005) asociaron un 25% de anomalías en la cromatina espermática con una baja fertilidad.

Desde el punto de vista de la fragmentación del ADN nuclear, las diferencias inter-especie podrían asociarse a las variaciones específicas existentes en las condiciones de desprotección del ADN espermático, ya que cada especie posee diferentes tipos y proporciones de protaminas en su cromatina espermática (Ausió y col., 2007). Además, en cada especie, el proceso de maduración de los espermatozoides a través del epidídimo tiene unas características propias que incluye, el lugar del epidídimo donde sucede la condensación principal de la cromatina (Golan y col., 1996).

Por otro lado, desde un punto de vista zootécnico, la selección de los sementales es diferente en cada especie. En el verraco se viene realizando sistemáticamente tanto por calidad seminal como fertilidad. Así, antes de ser

aprobado como futuro reproductor, debe cumplir con unos requerimientos sanitarios y además tener una buena aptitud para la extracción de semen, una buena calidad seminal y presentar valores óptimos de los índices de fertilidad. En el caso del morueco, debe ser mejorante del rebaño que se desea inseminar, por lo que es necesario conocer el nivel genético del individuo y su proporción en los descendientes. Frente a estos procedimientos, la selección de semental en los equinos se realiza por aptitud y conformación, nunca por fertilidad, situación similar a lo que ocurre en las razas bovinas de extensivo analizadas en este estudio, donde las características morfológicas y genéticas se anteponen al potencial fértil del animal.

A pesar de ello, la eficiencia reproductiva o fertilidad del toro es uno de los principales factores a tener en cuenta en las ganaderías de extensivo, pues la reproducción es un factor clave que condiciona sobremanera la producción final del rebaño y la rentabilidad económica de toda la explotación. La tasa de preñez por monta natural en estos rebaños oscila entre un 50%-65% y depende, casi exclusivamente, de la calidad y capacidad funcional del espermatozoide del macho. Teniendo en cuenta esta influencia y que el 4,70% de las dosis analizadas en este trabajo presentaron un IF más elevado de lo normal ( $IF \geq 20\%$ ), se recomienda la incorporación del IF como un parámetro complementario a incorporar al panel de pruebas rutinarias de calidad seminal que se analizan en toros con un propósito reproductivo.

### **1.2.1 Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal.**

Según lo descrito en el apartado anterior, no cabe duda de que la fragmentación del ADN espermático guarda relación con la capacidad de fertilización de los machos. Sin embargo, un aspecto interesante es comprobar si este parámetro presenta algún tipo de correlación con los analizados en el espermiograma clásico.

Algunos estudios previos consideran la fragmentación del ADN como un marcador independiente de los valores estándar incluidos en un espermiograma (Zini y col., 2001; Evenson y col., 2002; Pérez-Llano y col., 2006). Otros, sin embargo, establecen distintos niveles de correlación entre algunos parámetros de calidad seminal (volumen, movilidad, velocidad, morfología, viabilidad) y el IF (Ballachey y col., 1988; Giwercman y col., 2003; Januskauskas y col., 2003; Kasimanickam y col., 2006; Khalifa y col., 2008; Addad, 2009; Nava-Trujillo y col., 2011; Nagy y col., 2013).

No debe sorprender esta variabilidad, pues existen muchos factores que in-

fluyen sobre los resultados. Por ejemplo, el alto grado de variación biológica existente en el análisis seminal, tanto inter como intra laboratorial (Álvarez y col., 2003), por la aplicación de diferentes técnicas de análisis, sobre poblaciones de individuos no homogéneos y porque a nivel individual el daño en el ADN puede originarse tanto por factores testiculares como extratesticulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican correlaciones entre el IF ( $P < 0,05$ ) y tres parámetros espermáticos: movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad espermática postdescongelación.

De todos los parámetros de movilidad analizados, únicamente se encontró correlación positiva muy baja ( $Rho$ ,  $P < 0,05$ ) entre el IF y la movilidad masal, coincidiendo con Addad (2009) y difiriendo de otros autores que sí la encontraron (Ballachey y col., 1988; Peris y col., 2004; Nava-trujillo y col., 2011; Nagy y col., 2013). Algunos, incluso, describen una correlación única entre el daño del ADN espermático y la movilidad (Gandini y col., 2000, Giwerman y col., 2003).

Entre las anomalías morfológicas de los espermatozoides y el IF existe una correlación baja de signo negativo ( $Rho$ ,  $P < 0,05$ ), y, como en el caso anterior, existen estudios que revelan una fuerte asociación entre la morfología y la integridad de la cromatina espermática en el toro (Ballachey y col., 1987; Dobrinski y col., 1994; Karabinus y col., 1997; Ostermaier 2001; Rybar y col., 2010; Enciso y col., 2011a; Nagy y col., 2013). En concreto, fueron asociadas las formas dobles, cabezas de base estrecha, cabezas pequeñas, cola corta y gota citoplasmática proximal, a espermatozoides con el ADN fragmentado (Enciso y col., 2011a). Otros opinan lo contrario, sugiriendo que dicha relación no es consistente y atribuyendo sus resultados al hecho de que las alteraciones en la cromatina no tienen que ir necesariamente asociadas a las alteraciones morfológicas (Giwercman y col., 2003; Beletti y col., 2005; Addad, 2009).

Tanto las anomalías morfológicas como el daño en el ADN pueden desencadenarse en la espermatogénesis, cuando se produce el cambio de histonas por protaminas mediante enzimas que cortan y ligan el ADN para que se produzca su torsión. Fallos en la reparación de esas roturas pueden causar una maduración incompleta de la cromatina dando lugar a anomalías morfológicas (Marcon y Boissonneault, 2004). El exceso de ROS generado por una infección, una respuesta inflamatoria o la presencia de espermatozoides inmaduros con una excesiva retención citoplasmática provocan anomalías morfológicas (Agarwall y col., 2003). Y con respecto a la apoptosis celular, se

ha comprobado que, las cadenas rotas presentes en los espermatozoides con anomalías morfológicas fueron análogas a las existentes en las células somáticas con este fenómeno (Gorcyca y col., 1993).

El IF también se correlaciona de forma moderada y negativa ( $Rho, P < 0,05$ ) con los espermatozoides viables postdescongelación. Esta relación ha sido descrita con frecuencia en la bibliografía (Ballachey y col., 1988; Januskauskas y col., 2003; Beletti y Mello, 2004; Peris y col., 2004; Nava-Trujillo y col., 2011). En contraposición, otros autores no encontraron esa correlación (Karabinus y col., 1991; Addad, 2009; Enciso, 2010), sugiriendo como posible explicación que ni todos los espermatozoides inviables contenían ADN fragmentado ni todos los espermatozoides viables estarían libres de daño en el ADN. Esta hipótesis fue corroborada en un estudio realizado con esperma sexado de toro (Gosálvez y col., 2011c), concluyendo, por tanto, que ambos parámetros tendrían comportamientos independientes (Gosálvez y col., 2009).

Independientemente de las relaciones fisiológicas, esta diversidad de resultados podría guardar relación con, la inexistencia de un sistema de clasificación homogéneo (Barth y Oko, 1989; Saacke, 1990), el tipo de valoración realizada por los técnicos (García-Macías y col., 2007) e incluso por el propio análisis de las anomalías morfológicas y del IF, que, como indicaron Enciso y col., (2011a), se realiza en la misma muestra de semen pero no en la misma célula espermática (al no encontrarse esta relación en el eyaculado del toro, pero si, en el subgrupo de espermatozoides que contenían un elevado porcentaje de IF).

Se sugiere que, la movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad postdescongelación podrían estar relacionadas con el IF, pero no ser concomitantes, esto es, se consideraría al IF como un parámetro independiente de la evaluación espermática y, por tanto, un espermatozoide aparentemente normal podría tener el ADN fragmentado y presentar problemas en la fertilización. Queda claro que, a excepción de la viabilidad espermática postdescongelación, nuestros resultados indican una baja correlación con los parámetros estudiados en el seminograma clásico, de ahí que sea de suma importancia incluir el estudio de los niveles de fragmentación espermáticos como información complementaria a la obtenida en el resto de parámetros. El análisis de semen y la evaluación de la fragmentación del ADN miden aspectos diferentes pero complementarios de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, con lo cual no debería obviarse su evaluación pues concede mayor fiabilidad a la decisión final sobre la utilidad o no de los eyaculados.

## 2. Factores que pueden influir en la calidad seminal de las razas de Lidia y Blanca Cacereña.

### 2.1 Raza bovina.

Al analizar los resultados de los espermiogramas en función de la raza de procedencia -raza de Lidia (RL), Blanca Cacereña (RB) y razas especializadas (RE)-, encontramos diferencias significativas entre los 3 grupos de razas para el volumen, IF y anomalías morfológicas post descongelación.

Con respecto al IF, la RB ( $13,97\% \pm 9,03\%$ ) se diferenció significativamente ( $P < 0,001$ ) de la RL ( $6,05\% \pm 3,10\%$ ) y RE ( $5,42\% \pm 4,20\%$ ). Sin embargo, Rybar y col., (2010) estudiaron los niveles de IF entre las razas lecheras Czech Spotted y Holstein, no encontrando diferencias significativas ( $5,30\% \pm 3,70\%$ ). Este resultado puede explicarse porque el método de selección de los sementales suministradores de dosis seminales de alto valor comercial de las razas lecheras citadas, es totalmente diferente al de las razas vacunas extensivas de este estudio, que, además, presentan singularidades de selección del semental muy concretas en el caso de la RL y la RB (Introducción: 1.4 y 2.4). De hecho, a la RB pertenecen los ejemplares con los valores de IF más elevados de todo el estudio.

Sin embargo, los resultados obtenidos para la RB no difirieron demasiado de los obtenidos por Enciso y col., (2011a) en dosis congeladas de la raza Holstein-Friesian (N=17) usando dos técnicas de análisis diferentes:  $11,35\% \pm 2,81\%$  (SCD) y  $12,18\% \pm 2,90\%$  (ISNT); ni del indicado por Fernández-Santos (2009) que estimó un IF basal del  $11,70\% \pm 0,50\%$  (N=3) en la misma raza.

Esta similitud en el IF entre los resultados obtenidos por otros autores en Hosltein y la RB podrían estar relacionados con problemas derivados de la endogamia, que provoca un impacto negativo en la fertilidad y mayor incidencia de fallos reproductivos, descritos ambos tanto en la RB como en Holstein (Bartolomé y García, 1992; Calera y col., 2007; Parland y col., 2007).

Otros autores, han descrito valores similares a la RL y RE como Rybar y col., (2004, 2010), que obtuvieron un IF del  $5,70 \pm 4,40\%$  (1,50%-20,80%) en la raza Simmental (N=37) y 5 años después en dos razas lecheras (Czech Spotted y Holstein) un  $5,30\% \pm 3,70\%$  (1,60%-20,8%) (N=47).

También Waterhouse y col., (2010) obtuvieron en las razas Holstein (N=20) y Norwegian Red (N=20) una media de IF del  $5,10\% \pm 2,30\%$  y  $5,70\% \pm 4,00\%$ ,

respectivamente. Similares a los descritos por Nava-Trujillo y col., (2011) en toros de la raza Brahman que encontraron un  $4,17\pm 2,96\%$  (N=6); mientras que, Addad (2009) en toros de la raza Nelore halló valores algo más elevados:  $8,80\pm 3,80\%$  (N=46), al igual que Januskauskas y col., (2001), con un  $8,00\pm 1,60\%$  (N=20) en la raza Swedish Red and White. Sin embargo, dos años más tarde, estos últimos autores obtuvieron en la misma raza un IF inferior:  $2,60\pm 1,55\%$  (1,17%-7,50%, N=18), sin ofrecer una explicación concluyente de la diferencia de resultados.

Para la RL también se han publicado valores medios del IF inferiores al 2% (Martínez-Pastor y col., 2009), posiblemente debidos al bajo número de muestras analizadas (N=3), ya que en nuestros resultados, un porcentaje de las dosis de esta raza también mostraron esos niveles.

Otros autores encontraron también bajos niveles basales de IF en otras razas bovinas como la Swedish Red and White con un rango de IF del 0,50%-3,60% (N=6), la Estonian-Holstein con un 0,40%-1,80% (N=6) (Hallap y col., 2004); la Nelore con un  $1,60\pm 1,70\%$ , (Silva y col., 2002) y la "Swamp buffalo" o búfalo del pantano con un  $IF < 3\%$  en un rango del 0,19%-7,92% (N=18) (Koonjaenak y col., 2007).

De todo lo anterior se infiere que la influencia del factor raza sobre el IF es indudable, presentando además una alta variabilidad que oscila entre el 1,06% de la raza Nelore (Silva y col., 2002) y el 13,97% de la RB de este estudio. Esta variabilidad puede guardar relación con la gran amplitud porcentual de gametos con cromatina fragmentada que presentan los individuos incluso dentro de una misma raza, hipótesis ya planteada por otros autores (Gillan y col., 2008; Khalifa y col., 2008; Waterhouse y col., 2010).

En nuestro estudio la RB presentó el rango más amplio (2,00%-36,33%), similar al descrito en 8 toros de razas diferentes (1,20%-23,80%) por Bochenek y col., (2001) y en la raza Simmental (1,60%-20,80%) por Rybar y col., (2010).

Respecto al resto de parámetros seminales, señalar que se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) tanto en el volumen seminal como en la presencia de anomalías morfológicas postdescongelación entre las tres razas estudiadas, estableciéndose paralelismos y diferencias con otras razas autóctonas españolas criadas en condiciones extensivas similares.

Al valorar el volumen seminal, se observaron diferencias entre los toros de la RE (17 ml) y el resto, ya que prácticamente duplicaron el volumen obtenido

de los toros RL (8,37 ml) y RB (8,89 ml). Este resultado podría deberse a las diferencias raciales morfológicas existentes entre ellos, ya que los toros RE, debido a la fuerte presión de selección a la que son sometidos son de mayor envergadura, poseen una circunferencia y un volumen escrotal mucho mayor y ello conlleva una mayor secreción de fluidos del epidídimo, glándulas accesorias y parénquima testicular.

Nuestros resultados fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en otras razas autóctonas (Alistana-Sanabresa, Vianesa, Cachena, Caldelana, Sayaguesa y Marismeña) en las que se han descrito volúmenes comprendidos entre 9,37 ml y 11,26 ml (Sánchez-García y col., 1992; Vallecillo, 2011) pero, fueron superiores a los indicados para las razas Asturiana de los Valles (5,00 ml) y Rubia Gallega, con un rango de 5,69-6,29 ml (Muiño y col., 2006 y 2009).

La concentración espermática obtenida en la RL, RB y RE ( $0,98 \times 10^9$ ,  $0,94 \times 10^9$  y  $0,62 \times 10^9$  respectivamente) fue inferior a la de otras razas autóctonas: Vianesa:  $1,15-1,37 \times 10^9$ , Sayaguesa:  $1,37 \times 10^9$ , Caldelana:  $1,41 \times 10^9$ , Cachena:  $1,44 \times 10^9$  (Sánchez-García y col., 1992), Marismeña:  $1,23 \times 10^9$  (Vallecillo, 2011), Asturiana de los Valles:  $1,17 \times 10^9$  y Rubia Gallega:  $1,30 \times 10^9$  (Muiño y col., 2006, 2009).

Los resultados de movilidad masal en la RL y RE fueron prácticamente idénticos (1,68 y 1,75, respectivamente) pero no se pudieron realizar comparaciones porque la medición se realizó de forma diferente (escala 0-3) a la utilizada en otros estudios. Sin embargo, la valoración realizada en la RB (3,74) fue con escala de 0-5, obteniéndose resultados similares a la raza Marismeña (3,64) y un mejor comportamiento que en otras razas (Vianesa: 2,52; Sayaguesa: 2,59; Caldelana: 2,45; Cachena: 2,25).

Para el resto de parámetros que implican movimiento (MI y MP), tanto la RL como la RB estuvieron por debajo de los señalados por Muiño y col., (2009) para la Asturiana de los Valles (MP =94,70%) pero de forma subjetiva, presentaron una densidad seminal similar a la Frisona (78%) y Rubia Gallega (83%) (Muiño y col., 2006). Sin embargo, los resultados de MP tras la descongelación de las dosis, fueron inferiores, del 57,28% en Frisona y del 58,35% en Rubia Gallega (Muiño y col., 2006), comportándose del mismo modo que en la RE pero inferiores a la RL.

Sí hubo diferencias ( $P < 0,001$ ) para las anomalías morfológicas postdescongelación encontradas en los tres grupos de razas estudiadas, en concreto, el valor para la RB (23,39%) fue muy superior al de RL (10,55%) y RE (9%),

cercano al límite máximo del 30% de anomalías en un eyaculado normal con buena capacidad fertilizante. Sin embargo, la RL y RE tuvieron valores similares a los indicados para las razas Asturiana de los Valles con un 9,7% (Muiño y col., 2009) y Marismeña con el 9% (Vallecillo, 2011), ambas razas autóctonas explotadas también en régimen extensivo.

Si observamos con detalle el patrón de viabilidad obtenida tras la descongelación, en las dosis de RL, apreciamos que los resultados fueron aceptables, corroborando de nuevo, la criorresistencia de las dosis seminales de toro señalada por Slowinska y col. (2008), ya que, se obtuvo una viabilidad del 15,88%-23,77% (rango: 2,33%-61%), con una amplitud mayor pero similar a la descrita por Addad (2009) con un rango del 25%-50%.

De acuerdo con nuestros resultados, se podría afirmar que las características seminales, la calidad y la producción espermática de los toros RL, RB y RE se encuentran dentro de los rangos publicados por otros autores, para el resto de razas autóctonas españolas citadas. Tan sólo se aprecian diferencias al alza, en algunos parámetros cuantitativos para las RE como el volumen de eyaculado, y para la RB en los parámetros de calidad seminal, IF y anomalías morfológicas postdescongelación, que podrían explicarse por los escasos efectivos con los que cuenta esta raza y, consecuentemente, por el alto nivel de consanguinidad que soporta (Bartolomé y García, 1998).

A pesar de la escasa bibliografía disponible al respecto, algunos autores opinan que la consanguinidad está altamente correlacionada con algunos defectos genéticos espermáticos, como la movilidad, la morfología y la condensación de la cromatina (Baccetti y col., 2001; Latini y col., 2004; Van Eldik y col., 2006). En el caso concreto de la RB, podría asociarse con un componente genético (Salisbury y Baker, 1966; Barth y Oko, 1989; Chandler y Adkiston 1990; Chenoweth, 2005) o por la asociación establecida entre la presencia de anomalías morfológicas en el eyaculado del toro y diferentes grados de consanguinidad (Baccetti y col., 2001; Van Eldik y col., 2006). Esto podría explicar el elevado porcentaje de IF y anomalías morfológicas tras la descongelación que se ha detectado en los sementales de esta raza, y que sobradamente justificaría la necesidad de practicar un espermiograma completo a todas las muestras seminales almacenadas en el banco de germoplasma de la RB y conservar solamente aquellas pertenecientes a toros con características espermáticas aceptables.

En definitiva, la identificación y selección de toros sanos, con unas características reproductivas óptimas, incluido el mantenimiento de la integridad

de su ADN espermático, se considera un factor clave para el desarrollo futuro de la ganadería bovina extensiva y de vital importancia para el mantenimiento y conservación de la diversidad ganadera. Para lograr este objetivo, incorporar el análisis del IF a las pruebas tradicionales de calidad seminal supondría crear un instrumento muy valioso para ejecutar con éxito el plan de IA que poco a poco se va instaurando en las explotaciones, ya que se perfeccionaría la selección de reproductores, descartando aquellas dosis seminales con altos niveles de defectos en el esperma, y se conseguiría una mayor eficacia en la aplicación de esta técnica de reproducción asistida, a la vez que se potencian todas sus ventajas en la explotación (mejora genética rápida, incremento rentabilidad, etc.).

## 2.2 Método de extracción utilizado.

### 2.2.1 Extracción seminal por vagina artificial frente a la electroeyaculación en la raza Blanca Cacerreña.

No se encontraron diferencias en el análisis de calidad seminal en fresco y postdescongelación, tras realizar dos colectas seminales, una por vagina artificial (VA), y otra por electroeyaculación (EE) a los mismos toros de la raza Blanca Cacerreña.

No hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el IF, el volumen, la concentración y en los parámetros de movilidad espermática, dato que concuerda con Palmer (2005), que no halló diferencias ni en el volumen (VA: 11,42 ml vs. EE: 12,75 ml), ni en la concentración espermática (VA:  $561,67 \times 10^6$  esp/ml vs. EE:  $692,75 \times 10^6$  esp/ml) y Jiménez-Rabadán (2013) en la raza ovina Manchega, tampoco halló diferencias en el volumen, en función del método.

Sin embargo este mismo autor, (Jiménez Rabadán, 2013) en otra especie, la cabra Blanca Celtibérica, si encontró diferencias en el volumen y concentración espermática (VOL: VA 1,10 ml vs. EE 2,00 ml y CC: VA  $2487,20 \times 10^6$  esp/ml vs. EE  $1163,00 \times 10^6$  esp/ml). En concordancia, con otros autores que en bovino, también las hallaron, tales como Austin y col., (1961) (VOL: VA 2,80 ml vs EE 6,30 ml y CC:  $625 \times 10^6$  esp/ml vs.  $299 \times 10^6$  esp/ml), Parpanov (2000) (VOL: VA: 3,10 ml vs EE: 6,40 ml y una CC de VA:  $121 \times 10^6$  esp/ml vs. EE:  $71,60 \times 10^6$  esp/ml), Brogliatti y col., (2004) (CC: VA  $1067,10 \times 10^6$  esp/ml vs.  $789,20 \times 10^6$  esp/ml).

Las diferencias descritas, podrían explicarse porque la estimulación eléctrica provocada por la EE incrementa la secreción de plasma seminal por las glán-

dulas sexuales accesorias, aumentando el volumen y por ende, disminuyendo la concentración espermática. Estos fluidos no deben recogerse al realizar esta práctica. Es también importante recordar que muchos factores pueden afectar la concentración y el volumen de las muestras seminales haciendo poco fiables estas características para la evaluación de calidad seminal (Barth, 2000).

Tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles (VA: 76,67% vs. EE: 73,00%) en concordancia con lo descrito por Austin y col., (1961) (VA: 64,00% vs. EE: 67,00%), Jiménez Rabadán (2013) en la raza caprina Celtibérica (VA: 88,20% vs. EE 89,60%) y Parpanov (2000) que no encontró diferencias significativas, pero sí describió que los eyaculados extraídos por VA presentaron un 2,10% más de movilidad. Respecto a los parámetros cinéticos de movilidad analizados por el sistema CASA (estáticos, medios, lentos y rápidos) tampoco hubo diferencias ( $P>0,05$ ), en concordancia con Brogliatti y col., (2004) y Jiménez Rabadán (2013).

Una vez descongeladas las muestras, tampoco se encontraron diferencias en la movilidad ( $P>0,05$ ), de acuerdo con Jiménez-Rabadán (2013) en la raza ovina Manchega. Sin embargo, Parpanov (2000) obtuvo más movilidad en los eyaculados extraídos por VA, en concreto un 5,10% más, tal y como indicaron Jiménez Rabadán (2013) en la cabra Blanca Celtibérica, que sí encontraron diferencias significativas (VA: 43,40% vs. EE: 24,50%) achacándolo a que la EE podría influir en la cantidad secretada por las glándulas sexuales accesorias y la composición química del plasma seminal, pudiendo modificar la tolerancia del espermatozoide al proceso de criopreservación.

Con respecto al IF del esperma obtenido por ambos métodos de extracción seminal no se encontraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) (VA: 9,39 vs. EE: 8,50) en concordancia con lo descrito por Dobrinski y col., (1994), Januskas y col., (2001), Addad, (2009), Malama y col., (2012) que al utilizar la vagina artificial en toro señalaron valores para el IF del 7,00%, 8,00%, 8,80% y 7,08%, respectivamente.

De acuerdo con nuestro resultado, pero en ganado ovino, Jiménez-Rabadán (2013) tampoco encontró diferencias en la raza Manchega. Sin embargo, este mismo autor, si las halló diferencias, en la raza caprina Blanca Celtibérica (N=7) debidas al método de extracción (VA:  $3,20\pm 0,50$  vs. EE:  $6,10\pm 0,60$ ), describiendo un IF inferior en los eyaculados obtenidos por VA que lo atribuye a que la EE modificaría la composición proteica y enzimática del plasma seminal encargado de proteger al espermatozoide del estrés oxidativo, aunque

también plantea que la congelabilidad podría afectar más al espermatozoide de la raza caprina Blanca Celtibérica que a otras razas y especies de pequeños ruminantes. De hecho, Marco-Jiménez y col., (2008) describieron diferencias en la composición proteica y en la concentración de iones del plasma seminal en muestras obtenidas por VA y EE en la raza ovina Guirra, en contraposición con Jiménez-Rabadán (2013) que no las encontró para el IF en la misma especie, pero en otra raza, la Manchega.

La razón por la cual nuestros resultados no muestran diferencias significativas atribuibles al método de extracción seminal, podría estar relacionada con el hecho de que el ensayo se realizó en unas condiciones muy óptimas, comparadas con las extracciones habitualmente realizadas en campo, manteniendo siempre la temperatura interior en el tubo colector durante el proceso de extracción y realizando con rapidez el análisis posterior. Por otra parte, también podría deberse a que ambos métodos comparten la misma velocidad de flujo de salida del semen por los conductos seminales y que éste se expone durante el mismo período de tiempo a las condiciones ambientales. Por tanto, en lo sustancial ambos métodos no son tan diferentes como parece.

### **2.2.2 Extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.**

Sobre muestras seminales obtenidas tras la refrigeración *postmórtem* a 5 °C de los testículos sin flujo sanguíneo de toros de la raza de Lidia, durante un máximo de 12 h hasta la recolección por flujo retrógrado de los espermatozoides de las colas epididimarias, se analizó el IF junto al resto de parámetros seminales. Posteriormente, se compararon esos resultados con los obtenidos por electroeyaculación *antemórtem* encontrándose diferencias significativas para los parámetros IF, volumen concentración, movilidad masal, individual, progresiva y progresiva postdescongelación.

La cola del epidídimo proporciona un medio óptimo para la supervivencia espermática durante un periodo de tiempo, si éste se alarga sin realizar la extracción, la refrigeración se considera necesaria para minimizar el daño a la integridad del espermatozoide en el toro y otras especies (Yu y Leibo, 2002 en perro; Martínez-Pastor y col., 2005 y Fernández-Santos y col., 2006 en ciervo; Martins y col., 2009 y Malcotti y col., 2012 en toro). Se ha demostrado que el descenso progresivo de la temperatura de conservación de los testículos hasta los 5 °C, inmediatamente después de la muerte del toro, disminuye el metabolismo espermático, la pérdida de energía y aumenta la viabilidad de los espermatozoides (Martins y col., 2009). Algunos autores han almacenado los testículos de toro para saber cómo afecta a los pará-

metros espermáticos el paso del tiempo. En concreto, Malcotti y col., (2012) comprobaron que el almacenamiento durante 78 h a una temperatura de 5 °C, no afectó al IF ni a la viabilidad espermática, pero si a la movilidad total y Martins y col., (2009) describieron que tras 48 h a 5 °C la variable más afectada fue la movilidad progresiva de los espermatozoides en bovino. Mientras que Stout (2012), concluyó que los espermatozoides de toro epididimarios fueron más resistentes a la criopreservación que los eyaculados y presentaron mejores características seminales tales como, concentración espermática y parámetros de movilidad antes y después de la criopreservación.

Encontramos diferencias significativas entre el IF de los espermatozoides epididimarios (EP) y los procedentes de eyaculados (EY), siendo más elevado en estos últimos (2,90% vs. 6,46%) en concordancia con Malcotti y col. (2012) que tras mantener 30 h, las colas epididimarias sin flujo sanguíneo a 5 °C obtuvieron un IF del 4%, indicando que los EY podrían haber acusado más este problema. Del mismo modo, Fernández-Santos y col., (2006) observaron en ciervo, que el nivel de fragmentación más elevado en EY, podría derivarse de una producción elevada ROS por los propios espermatozoides junto con una reducción de la capacidad antioxidante del plasma seminal. Sin embargo, otros autores opinan que en los humanos, los EP fueron más vulnerables a la tensión oxidativa al no haber estado expuestos al plasma seminal (Chen y col., 2003; Wat-Sum y col., 2006; Aitken y de Lullis, 2010). Esta diferencias entre especies, podrían estar relacionadas con la propia estructura de la cromatina espermática, en concreto con el contenido de protaminas en el núcleo espermático, siendo el bovino una de las especies con el ADN espermático más resistente (Fortes y col., 2012).

El epidídimo secreta un conjunto de factores protectores y enzimas extracelulares antioxidantes (Wat-sum y col., 2006) y por su parte los espermatozoides poseen su propia capacidad antioxidante (Tremellen, 2008). Sin embargo, en el eyaculado, se generan ROS, que, provocarían una bajada en su nivel de protección, y además si le sumamos que la concentración proteica del plasma seminal, pueda estar alterada, podría ser otra causa adicional del incremento del IF (Aitken y Koppers, 2011; Jiménez Rabadán, 2013).

Frente al resto de parámetros seminales se observaron diferencias significativas, excepto con las anomalías morfológicas.

El volumen obtenido del epidídimo fue significativamente inferior ( $P < 0,001$ ) (EP: 4 ml vs. EY: 14 ml) en concordancia con los 3,9 ml que Amann y Almquist, (1961) obtuvieron del epidídimo, en 8 toros Hosltein, y con Hafez (1989) que

describió un volumen de 10-15 ml de esperma eyaculado, en toro adulto. Esta diferencia era esperable dado que al eyaculado se le añade el plasma seminal.

Si nos fijamos en la concentración espermática, su resultado fue significativamente superior ( $P < 0,001$ ) en el epidídimo (EP:  $1385,88 \times 10^6$  esp/ml vs. EY:  $923,97 \times 10^6$  esp/ml) estando los resultados dentro del rango establecido de acuerdo con Amann y Almquist (1961) ( $1360 \times 10^6$  esp/ml) y Stout (2012) (EP:  $1240 \times 10^6$  esp/ml vs. EY:  $760 \times 10^6$  esp/ml,  $N=6$ ) que realizaron sus estudios en los mismos toros. La concentración epididimaria obtenida fue más elevada que la señalada por Martins y col., (2009) y por Albers y Barrios (2011) ( $532 \times 10^6$  esp/ml) por el mismo método de obtención. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio por electroeyaculación, fueron inferiores al descrito por Hafez (1989) para toro adulto ( $1,800 \times 10^6$  esp/ml). Esta diferencia podría explicarse porque son necesarias varias eyaculaciones para vaciar las reservas espermáticas del epidídimo y por otra parte, podría haber influido que el toro haya eyaculado 72 h antes de la extracción del epidídimo (Amann y Almquist, 1961, 1976), además de otras características morfológicas como el tamaño y la circunferencia escrotal que a su vez, varían con la edad.

Los parámetros de movilidad también presentaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) *postmórtem* vs. *antemórtem* en la movilidad masal (EP: 0 vs. EY: 1,89), movilidad individual (EP: 60,50%, vs. EY: 75,05%) y movilidad progresiva (EP: 58,33% vs. EY: 69,66%). Concuerdan con los obtenidos en toro y otras especies (Yu y Leibo 2002 en perro; Kaabi y col., 2003 en ovino; Silva y col., 2003 en toro; Martínez-Pastor y col., 2005 en ciervo; Malcoltti y col., 2012 en toro).

Los espermatozoides de este estudio recién extraídos de las colas no tienen movilidad masal debido a que los EP se producen en el testículo y posteriormente se mezclan con los fluidos epididimarios. En esta situación permanecen inmóviles, con un metabolismo muy bajo que preserva sus reservas energéticas y disminuye los efectos perjudiciales de los agentes oxidantes endógenos derivados de la actividad mitocondrial sobre la membrana y las estructuras internas (Robaire y Viger, 1995). Pero una vez que se diluyen durante 5-10 min a 37 °C se producen los cambios necesarios para que los espermatozoides alcancen su máximo movimiento (Johnson y Everitt, 1984; Martínez-Pastor y col., 2005).

Al comparar la movilidad individual en fresco, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ), siendo inferior en el esperma de epidídimo (EP: 60,50% vs. EY: 75,07%), resultado de acuerdo con Martins y col., (2007) en los mismos toros (EP: 71% vs. EY 65%) pero no con Graham

(1994) que no encontró diferencias significativas (EP: 82% vs EE: 79%). El valor obtenido para los EP está dentro de la normalidad, pues otros autores (Amann y Almquist, 1961; Way y col., 2000; Reyes-Moreno y col., 2000) utilizando la misma técnica de obtención, reportaron valores de 70%, 67-75% y 96%, respectivamente.

Con respecto a la movilidad progresiva, también existieron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en fresco (EP: 58,33% vs. EE: 69,66%), siendo inferior la movilidad de los EP. Los resultados estuvieron dentro de la normalidad de acuerdo con Hafez (1989) (MP promedio en fresco: 67%). Sin embargo, otros estudios realizados en los mismos toros, no las hallaron, como Stout, (2012) en 4 toros de la raza Holstein (EP: 70,60% vs. EY; 64,40%) y Amann y Griel (1974) en 7 toros de la raza Holstein (EP: 65% vs. EE: 68%).

Tras la criopreservación, la movilidad individual también presentó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (EP: 32% vs. EY: 34%) y se observó un descenso del 28% y 41% en ambos eyaculados, afectando más a los EY. De modo coincidente, Martins y col., (2007) describieron un descenso del 10% en los EY de un toro, con respecto a la movilidad de los EP de 3 toros de matadero.

Al analizar la movilidad progresiva postdescongelación, los EY presentaron un valor superior ( $P < 0,001$ ) (EP: 52,86% vs. EY: 66,12%) de acuerdo con Stout (2012) que también obtuvo diferencias significativas (EP: 58,80% vs. EE: 50,90%) pero describió una movilidad mayor en los EP. Por otra parte, los resultados postdescongelación estuvieron dentro de la normalidad, coincidiendo con Cupps y Briggs (1998), para los EY (MPD: 50%-80%), y según lo reportado por Igboeli y Foote (1968), para los EP con un 41% en 5 toros. En cambio, fue superior al dato descrito por Amann y Almquist (1961) que obtuvieron un 26% (N=35). Se observó que la criopreservación afectó por igual y en baja medida a la movilidad progresiva de ambos tipos de espermatozoides.

En las anomalías morfológicas no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) probablemente porque la extracción por electroeyaculación conlleva más formas inmaduras, del mismo modo que algunos EP podrían no haber finalizado su maduración (Briz, 1996). Los porcentajes obtenidos en fresco (EP: 11,33% vs. EY: 10,45%) y postdescongelación (EP: 11,33% vs. EY; 10,56%) apenas variaron, y en ambos casos estuvieron dentro de la normalidad, al no superar el 30% de anomalías morfológicas señalado por Cupps y Brigg (1998) y Barth (2000), ni el 20% descrito por Henault y col., (1995) en esperma de la cola del epidídimo por la posible influencia en la fertilización. Estos datos contrastan con los obtenidos por Silva y col., (2003) y Martins y col., (2009)

que encontraron diferencias significativas en el porcentaje de gota citoplasmática distal. Esta discrepancia podría explicarse porque la maduración espermática se produce en el epidídimo y podría no haber finalizado todavía, obteniéndose más formas inmaduras.

Con respecto a la viabilidad espermática, teniendo en cuenta que tras la descongelación sufre una disminución aproximada del 50% por desestabilización de la membrana espermática (Thomas y col., 1998, Watson, 2000), los resultados obtenidos se encontraron dentro de la normalidad y no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), aunque si se apreció una tendencia positiva en el espermato epididimario (EP: 34,71% vs. EY: 23,00%) como Scout (2012), que tampoco encontró diferencias significativas (EP: 74,20% vs. EY: 63,10%) en los mismos 4 toros Holstein.

Ha quedado demostrado en este trabajo que el espermato epididimario representa una fuente viable de espermato que se puede criopreservar, conservándose la genética de toros élite y siendo factible su diseminación. Por otra parte, representa la última posibilidad para conservar material genético si no ha podido recogerse *in vivo*, adquiriendo gran importancia en el caso particular de la raza de Lidia, ya que puede ser la única forma de conservar células fecundantes de aquellos individuos que han mostrado unas cualidades etológicas superiores durante la lidia.

### 2.3 Edad.

El objetivo de este apartado fue determinar a partir de qué edad del animal se comienzan a ver los efectos del envejecimiento en la integridad del ADN espermático y en el resto de parámetros seminales. Todos los toros analizados de la raza de Lidia y de Blanca Cacerense superaron los 2 años de edad y se agruparon en 3 grupos: jóvenes ( $\leq 3$  años), adultos ( $>3$  y  $\leq 8$  años) y viejos ( $>9$  años). Para realizar esta clasificación se tuvo en cuenta que según Almquist (1982) los toros alcanzan la madurez sexual a partir de los 3-4 años de edad y que Valecillo (2011) concluyó que la mejor edad para determinar la calidad espermática de los toros, es a partir de los 3 años. López y col. (2007) describieron que la calidad y cantidad espermática se incrementa desde la pubertad hasta los 3 ó 4 años, momento en que alcanzan sus máximos valores, manteniéndose hasta los 7 u 8 años y luego decaer. Según otros autores (Almquist y Amann, 1976; Fuerst-Waltl y col., 2006; López y col., 2007; Mandal y col., 2010) la edad ejercería un efecto significativo sobre las características seminales.

En concordancia con estos autores, encontramos diferencias que reafirman

que la edad del toro afectaría significativamente a la calidad seminal, aunque, en nuestro caso, tan solo sucedió con dos parámetros: el IF ( $P \leq 0,001$ ) y el volumen seminal ( $P \leq 0,003$ ) en toros de la RL a partir de los 9 años de edad. Sin embargo, el valor medio del resto de parámetros seminales subjetivos (CC, MM, MI, MP AM, MID, MPD, AMD, V) fue similar en los 3 grupos de edad considerados.

Asimismo, en los análisis efectuados en toros BC no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en ninguno de los parámetros seminales (IF, VOL, CC, CLM, MI, MID) de dos grupos de edad (jóvenes  $\leq 3$  años; adultos 3-8 años).

En primer lugar, no hubo diferencias entre los toros jóvenes y adultos de la RL y BC respecto al IF, pero si hubo un incremento significativo ( $P \leq 0,001$ ) en los toros viejos de la RL, con respecto jóvenes y adultos (J: 4,41% y A: 5,27% vs. V: 8,04%), en concordancia con otros autores (Karabinus y col., 1990; Spano y col., 2000; Wyrobek y col., 2006; Moskovtsev y col., 2009; Karoui y col., 2012). El mismo resultado se ha observado también en otras especies ganaderas como la cabra (López-Fernández y col., 2011) y el verraco (Tsakmakidis y col., 2012). En contraposición, Addad (2009) no encontró relación entre la edad y la fragmentación de la cromatina nuclear en semen fresco de toros de la raza Nelore (2,5 años vs. 10 años).

Esta relación podría deberse a que los genes implicados en la función apoptótica, disminuyen su eficacia en la reparación del ADN (Moskovtsev y col., 2009), lo que indicaría que la edad deteriora el proceso de selección de las células espermáticas sanas. También podría ser debido a que con el envejecimiento se produzcan más defectos en el control de la espermatogénesis, tal como sucede en los espermatozoides humanos (Vagini y col., 2007; Schmid y col., 2007).

Por tanto, esta relación indicaría que los toros viejos podrían incrementar el riesgo de fallo reproductivo y preñeces anormales, como consecuencia de la fertilización con espermatozoides con el ADN dañado.

En segundo lugar, en la RL y en la BC también se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,001$ ) entre los toros jóvenes ( $< 3$  años) y viejos ( $> 9$  años) (6,56 ml vs. 10,34 ml) pero no con los adultos ( $\leq 8$  años) (8,09 ml) para el volumen seminal. En la BC sólo se analizaron jóvenes y adultos (8,80 ml vs. 9,25 ml). Las diferencias en el volumen debidas a la edad han sido confirmadas por varios autores en distintas razas (Söderquist y col, 1996, en raza Swedish; Brito y col., 2002ab, en varias razas bovinas; Mandal y col., 2010, en

los toros de semen congelable de la raza Frieswall). De acuerdo con nuestros resultados pero analizando diferentes intervalos de edad, encontramos a Fuerts-Walt y col., (2006) que también obtuvieron en la raza Simmental un volumen mayor en toros de >9 años y tampoco encontraron diferencias en los toros de entre 5 y 9 años; a Karoui (2009) que observó un aumento logarítmico hasta los 9 años de edad en la raza Holstein, y a Taylor y col., (1985) que en esa misma raza observaron un aumento del volumen hasta los 7,5 años para luego permanecer constante hasta los 9-10 años. De forma similar, Vallecillo (2011) encontró diferencias superiores en los adultos (6-8 m vs. 3-4 años) de la raza Marismeña, y Muiño y col., (2006) describieron en Holstein volúmenes más elevados en toros de >3 años pero no encontraron diferencias en la raza Rubia Gallega ( $\pm 3$  años). Únicamente Mathevon y col., (1998) observaron un incremento hasta los 4-5 años y luego una disminución conforme aumenta la edad en la raza Holstein.

Es lógico pensar que a mayor edad, más volumen seminal, ya que la circunferencia escrotal está altamente correlacionada con el volumen testicular (Latif y col., 2009) y los toros con la circunferencia escrotal más grande suelen ser los más viejos y, por tanto, los que mayor volumen seminal podrían tener.

Por otro lado, la concentración espermática no presentó variaciones debidas a la edad ( $P > 0,05$ ) en ninguna de las dos razas. Esto concuerda con lo señalado por Brito y col., (2002a) en varias razas bovinas (2,5 años vs. 6 años vs. 15 años), Muiño y col., (2006) en la raza Rubia Gallega y Holstein (<3 años vs. >3 años) y Mandal y col., (2010) en semen congelable de la raza Frieswall (<30 m vs. 30-77 m.). No hay acuerdo en la bibliografía, algunos autores han descrito un incremento y otros una disminución de la concentración espermática con el envejecimiento.

Entre los autores que hallaron concentraciones más elevadas con la edad destacan Vallecillo (2011) en la raza Marismeña, (6-8 m. vs. 18-23 m), Soderquist y col., (1996) en la raza Swedish a partir de los 1-3 años de edad y, finalmente, varios autores observaron ese aumento hasta los 2 años de edad en la raza Holstein (Taylor y col., 1995; Mathevon y col., 1998, Karoui 2009).

Sin embargo, se describió una disminución a partir de los 6,3 años (Taylor y col., 1995) o un efecto *plateau* hasta los 8 años de edad (Karoui, 2009). Fuerst-Waltl y col., (2006) obtuvieron resultados diferentes en dos Centros de Inseminación Artificial (CIA) para la raza Simmental. Mientras que en el CIA 1 la concentración del esperma disminuyó con la edad, con un nivel óptimo a los 1,5-1,7 años; en el CIA 2, la concentración más alta fue a los 4-6

años y más baja a los 1,8 años de edad, considerando este último resultado como incoherente.

Estas diferencias son esperables por el intervalo de edad analizado, dado que aquellos toros que no han completado su crecimiento corporal ni alcanzado la madurez sexual, no presentan maduración de sus órganos genitales. Y el tamaño y peso del parénquima testicular están altamente correlacionados con el número total de células de Sertoli (Berndtson y col., 1987) y con la producción espermática (Coulter y col., 1976; Madrid y col., 1988).

Con respecto a la movilidad espermática no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) en semen fresco ni postdescongelación, con el envejecimiento en las dos razas. Resultado de acuerdo con otros autores que, indicaron que el efecto de la edad sobre la movilidad no fue significativa (Mathevon y col., 1998; Brito y col., 2002b; Fuerts-Walt y col., 2006; Mandal y col., 2010). Muiño y col., (2006) tampoco encontraron significación en la movilidad progresiva postdescongelación en las razas Rubia Gallega y Holstein-Friesian, pero si encontraron una mejoría en la movilidad individual en fresco en toros con  $>3$  años de Rubia Gallega. Así mismo, Hallap y col., (2004) obtuvieron ese resultado postdescongelación en los mismos toros (11-13 m vs. 4 años). Vallecillo (2011) también describió que la movilidad masal mejora con la edad (6-8 m vs. 18-23 m) pero otros autores observaron el efecto contrario (Taylor y col., 1985; Brito y col., 2002a).

Tampoco se apreciaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en las anomalías espermáticas en fresco y postdescongelación en las dos razas descritas, de acuerdo con otros autores como, Chandler y col., (1984), tras la descongelación de dosis de toros Holstein (15 m vs. 26 m), Muiño y col.,(2006), en esperma fresco ( $<3$  años vs.  $>3$  años); Mandal y col., (2010) en fresco y postdescongelación ( $<30$  m vs. 30-77 m) y Mena y col., (2011) en material seminal fresco, de razas bovinas de aptitud cárnica -Angus, Simmental, Charolais, Limousin, Gelbvieh y Hereford- en 4 grupos de edad (11-13 m vs. 13,5-18 m vs. 19-26 m vs.  $>26$  m). Tampoco, Söderquist y col., (1996) en dosis postdescongelación de toros de entre 14 m vs. 78 m y Brito (2002b) a la edad de 2,5 años vs. 6 años vs. 15 años.

Hay que puntualizar que tanto Brito y col., (2002b) como Söderquist y col., (1996), no encontraron diferencias en los defectos mayores, pero si en los menores con respecto al incremento de la edad (no se han analizado en esta investigación). Al contrario, Hallap y col., (2004, 2006) no encontraron cambios morfológicos postdescongelación a los 11-13 m y 4 años, pero si a

los 7 años. Otros autores (Taylor y col., 1985; Vilakazi y Webb, 2004; Mandal y col., 2010) encontraron diferencias entre las anomalías, siendo más elevadas en toros jóvenes que en adultos.

Para la viabilidad espermática postdescongelación, tampoco se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los toros de la RL (no se analizó este parámetro en la BC), al igual que Vallecillo (2011). Al contrario, Fuerts-Walt y col., (2004) en el CIA 1 encontraron menos espermatozoides viables con la edad, presentando los toros más viejos valores medios, mientras que en el CIA 2, las diferencias entre los grupos de edad fueron pequeñas correspondiendo los valores más bajos a los toros más viejos. En contraposición, otros autores reportaron que la edad afectó de una forma significativa y positiva a la viabilidad espermática (Söderquist y col., 1991; Brito y col., 2002b, Mandal y col., 2010).

A pesar de la variabilidad de resultados encontrada en la bibliografía sobre el efecto de la edad en las características seminales, hay que resaltar que las peculiaridades que presentan la RL y BC, darían más validez a los resultados obtenidos. Se emplearon toros no aprobados ni testados para la comercialización de sus dosis seminales, mientras que los toros de CIA considerados no aptos o aquellos que fueron aprobados, pero poco solicitados, nunca habrán formado parte de los grupos de toros de edad más avanzada. También el factor raza, podría haber influido en las diferencias espermáticas al existir, diferencias genéticas en la calidad del semen (Hoflack y col., 2007) y los rangos de edad analizados, debido a la poca variabilidad en el margen de edad entre los toros de algunos estudios. También podrían afectar a los índices espermáticos, diferencias individuales como, el nivel de actividad de las gónadas, perímetro testicular, tamaño, peso del individuo, la alimentación e incluso las condiciones climatológicas (Graves, 1978; Al-Hakim y col., 1986; Sharma y col., 1991).

### **3. Dinámica de fragmentación del ADN espermático bovino.**

Los estudios sobre fragmentación del ADN espermático se limitan, en muchos casos, a la fragmentación que presenta el individuo en el momento exacto de la eyaculación. Sin embargo, un factor poco estudiado es la resistencia de los espermatozoides cuando se incuban a lo largo del tiempo a una determinada temperatura. Esta información es importante conocerla, pues, dos individuos pueden presentar idéntico nivel de fragmentación basal, pero diferente comportamiento en este parámetro con el paso del tiempo.

En este apartado se analizó el IF del eyaculado postdescongelación tras la incubación en condiciones experimentales de las dosis seminales a temperatura ambiente (22 °C) y a la temperatura fisiológica de la hembra (38,6 °C), tanto en toros de la raza de Lidia como Blanca Cacerense. Los tiempos de incubación se realizaron desde el momento de la descongelación (0 h) y tras 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, hasta las 240 h de incubación.

### 3.1 Efecto de la temperatura de incubación.

Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,001$ ) para el IF debidas a la temperatura de incubación. Los resultados indicaron que la resistencia del ADN espermático postdescongelación en condiciones *in vitro*, fue mayor a una temperatura de 22 °C. En concreto, el grupo mayoritario de dosis, alcanzaron niveles críticos de IF a 38,6 °C, entre las 48 h-72 h (N=41), mientras que a 22 °C sucedió más tarde, a las 72 h-96 h (N=45). Estos resultados están en concordancia con Gosálvez y col., (2008) que indicaron, una fragmentación baja del ADN en toro, durante las primeras 4 h de incubación a 37 °C y con estos mismos autores que en dosis de toro de Lidia (N=4), observaron que el IF se disparaba transcurridas 48 h a 37 °C (Gosálvez y col., 2011c). También Karoui y col., (2012) en vacuno Holstein, describieron que tras 6h de incubación a 37 °C no hubo diferencias en el IF. Sin embargo, Waterhouse y col., (2010), en las razas Holstein y Norwegian Red, encontraron un incremento rápido del IF durante las primeras 9 h de incubación utilizando dos diluyentes diferentes, sin dar explicación al respecto. Otros autores, concluyeron que, a temperatura ambiente, la fertilidad del esperma se conservaría en unas tasas aceptables durante los primeros 3-5 días, pero tras ese período la fertilidad disminuía entre un 3% y 6% por día (Vishwanath y Shannon, 2000; Gosálvez y col., 2008; Gosálvez y col., 2011c), lo cual indica que para preservar el esperma sin que este parámetro se incremente, es necesario disminuir la temperatura y ralentizar el metabolismo espermático.

También observamos, a las dos temperaturas, un incremento progresivo de la inestabilidad del ADN en el núcleo espermático desde el comienzo del experimento, hasta que se degradó por completo. Eso sí, presentando una elevada variabilidad inter individual. Este hecho se comprobó en algunas dosis seminales, donde rápidamente se observaron daños en su ADN (IF $\geq$ 20%) tras un periodo muy breve de incubación (4 h), mientras que otras resistían mejor el paso de las horas. Destacar que 2 dosis seminales pertenecientes a dos eyaculados del mismo individuo, sin información sobre la fecha de extracción, no se degradaron tras 240 h de incubación, manteniendo el mismo

nivel de IF desde el inicio y con un comportamiento muy similar a las dos temperaturas.

En concordancia con otros estudios, se ha observado que con el paso del tiempo las muestras tienden a ir aumentando el IF desde el momento de su descongelación, tanto en toro (Karabinus y col., 1990, 1991, 1997; Boe-Hansen y col., 2005; Gosálvez y col., 2007, 2008, 2011b), como en caballo (López-Fernández y col., 2007), morueco (López-Fernández y col., 2008), verraco (Pérez-Llano y col., 2010), humana (Gosálvez y col., 2009; García-Peiro y col., 2011), varias especies de mamíferos (Gosálvez y col., 2011c) y especies salvajes, como el rinoceronte (Portas y col., 2009), el koala (Zee y col., 2009) y los ciprínidos *Tinca tinca* (López-Fernández y col., 2009). De hecho, no se conocen estudios que hayan descrito lo contrario.

Al comparar los resultados de velocidad de degradación del ADN espermático del toro a la temperatura de incubación del tracto genital de la hembra, se observa que es similar a la del verraco, que puede llegar a retrasarse hasta 5 días (Pérez-Llano y col., 2010). Sin embargo, en los ciprínidos, la degradación es casi total tras 1 h de incubación (López-Fernández y col., 2009), seguido del morueco, que con 4 h de incubación sufre una fragmentación máxima (Gosálvez y col., 2007, 2008; López-Fernández y col., 2008a, 2010) y del caballo y el ser humano, que llegaron a doblar el nivel basal del IF en tan solo 5 h (López Fernández y col., 2007; Gosálvez y col., 2009).

Estas diferencias entre especies puede estar relacionado con el contenido de protaminas en el esperma nuclear. En el toro y el verraco está presente el gen codificante para la P2 pero parece ser disfuncional o producir una proteína aberrante (Balhorn, 2007; Gosálvez y col., 2011c) y éstas dos especies son las que presentan espermatozoides con más resistencia al daño espermático. Quizá la no presencia de P2 podría ser la causa responsable de una cromatina espermática más estable. Concretamente en bovino, el IF fue correlacionado positivamente ( $P < 0,05$ ) con el porcentaje de espermatozoides que mostraron un contenido bajo en protaminas y negativamente ( $P < 0,05$ ) con el tamaño de la circunferencia escrotal, de manera que cuanto mayor fue ésta, el esperma mostró más contenido en protaminas y menos daño en el ADN espermático (Fortes y col., 2012). Por tanto, parece que la deficiencia en protaminas en el esperma es uno de los factores que contribuyen al daño e inestabilidad del ADN espermático de bovino

Desde un punto de vista biológico, conocer la dinámica de fragmentación de una muestra es muy importante. En humana, una dosis seminal utilizada

para IA o FIV, podría tener elevados niveles de IF en el momento de la fertilización, si ha transcurrido cierto tiempo desde la eyaculación. En los programas de reproducción asistida en humanos, en concreto con la técnica FIV, los oocitos son expuestos al espermatozoides un máximo de 20 h. En algunos casos, este período de co-incubación, produce problemas en el desarrollo normal del embrión, mientras que una co-incubación ultracorta mejora los niveles de fertilización mediante FIV (Bungum y col., 2006).

Se recomendaría en un futuro estudiar más a fondo la dinámica de fragmentación del ADN de las dosis seminales para conocer mejor la resistencia del ADN nuclear en el tiempo, sobretodo, antes de utilizarla en la práctica clínica (Gosálvez y col., 2008; 2011b; Karoui y col., 2012).

Una vez que descongelamos las dosis, es aconsejable su rápida utilización dado que la degradación del ADN se inicia en ese mismo instante y cualquier retraso podría ejercer una influencia negativa sobre su capacidad de fertilización (Gosálvez y col., 2008). También es importante preservar el semen a baja temperatura para reducir el metabolismo espermático y así prolongar la vida fértil de los espermatozoides, evitando fallos reproductivos en las técnicas de reproducción asistida.

Conocer la velocidad de degradación del ADN espermático de las dosis seminales serviría para emplear solamente las pertenecientes a donantes con mayor estabilidad temporal de su ADN en la IA o FIV. No se recomienda el uso de dosis seminales de individuos o eyaculados que presenten altos niveles de IF antes de las 48 h de incubación a 38,6 °C porque ello significaría un aumento agudo del IF en el tracto genital de la hembra en el momento de la fertilización, disminuyendo sus posibilidades de éxito para conseguir embriones viables.

### **3.1.1 Efecto de la extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.**

Si las cualidades etológicas del toro lidiado en la plaza han sido óptimas, lo más probable es que el ganadero recoja *postmórtem* sus testículos en el desolladero, se refrigeren a 5 °C y así se trasladen hasta el laboratorio donde se realizará la extracción seminal para su criopreservación. Por ello se consideró el estudio de la dinámica de fragmentación del ADN, durante 96 h de incubación a 38,6 °C y 22 °C, y así conocer el patrón del comportamiento del ADN espermático en estas dosis observándose diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en función de la temperatura de incubación.

El nivel basal del IF basal en estas muestras, es bajo al inicio del experimento

(IF=2,9%), de acuerdo con estudios realizados en otras especies (Anel- López y col., 2012). El epitelio epididimal de la cola del epidídimo es capaz de proteger al espermatozoide del estrés oxidativo y favorecer la supervivencia y movilidad tras la descongelación *in vitro* (Reyes Moreno y col., 2002). Además, Martins y col., (2007) demostraron el mantenimiento de la capacidad fertilizadora de los espermatozoides epididimales de toro, criopreservados rápidamente, tras la muerte del animal.

Sin embargo, con respecto a la dinámica del IF, en estas dosis, se disparó tras 4 h de incubación (IF=20,43%) a 38,6 °C, superando el umbral crítico de fragmentación. En cambio, a 22 °C fue posterior, al no alcanzar este umbral hasta las 24 h (IF=22,23%).

Estas diferencias indican que las dosis seminales extraídas *postmórtem* sufrirían una velocidad de degradación del ADN espermático más acusada en el tracto genital de la hembra, con lo cual, dispondrían de menos tiempo para alcanzar el oocito. Esto revela la importancia de la temperatura y el tiempo en el manejo de las dosis seminales postdescongelación para conseguir una IA exitosa en ganado bovino.

Sin embargo, en otras especies como el ciervo común *Cervus elaphus hispanicus* (N=9) Anel-López y col., (2012) obtuvieron un incremento moderado del IF, con una media del 11,70% en 6 h a 39 °C, señalando autores de este mismo grupo (Fernández-Santos y col., 2009) que el ADN de estas muestras fue resistente al almacenamiento sin antioxidantes, permaneciendo con niveles bajos de IF tras la incubación.

La supervivencia del almacenaje espermático en el epidídimo del toro guarda relación con la secreción de proteínas epididimales que mantienen la movilidad *in vitro* (Reyes-Moreno y col., 2002). Poco se conoce de las secreciones epididimales y de los mecanismos moleculares que permiten preservar la funcionalidad y viabilidad espermática. Hasta el momento, los mecanismos propuestos que regularían la protección del espermatozoide en la cola del epidídimo implican a los inhibidores de los factores de complemento, enzimas que actúan produciendo la lisis celular (Reyes-Moreno y col., 2002), participan en el metabolismo y conjugación del glutatión que proporciona protección contra el daño oxidativo (Agarwal y col., 2003; Zubkova y Robaire, 2004), y regulan la actividad proteolítica espermática de la serin- y cistein-proteasas, que pueden inhibir y proteger la membrana espermática de una degradación proteolítica inadecuada (Fouchecourt y col., 2000).

Como estas muestras no han circulado por los conductos del epidídimo no contienen los fluidos espermáticos que allí se les añaden y que, entre otros componentes, contienen los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que hacen frente a la tensión oxidativa. Por tanto, éstos no actuarían frente al ROS intracelular y el ADN espermático se dañaría más fácilmente. Esta afirmación concuerda con los autores que señalan que los espermatozoides epididimarios son más vulnerables en el ambiente uterino (Chen y col., 2003; Wai-Sum y col., 2006; Aitken y de Lullis, 2010; Domínguez-Rebolledo, 2011) y podría ser la razón del acusado incremento de los niveles de IF durante la dinámica realizada simulando las condiciones de temperatura del tracto genital de la hembra.

### **3.2 Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia.**

Se observó que las dosis seminales de toros diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en la dinámica de fragmentación del ADN espermático, lo cual indica que algunas dosis seminales son más tolerantes que otras al daño de su ADN espermático y que, por tanto, la dinámica es distinta para cada individuo inclusive dentro de su misma especie.

Este resultado concuerda con Karoui y col., (2011, 2012) que encontraron una variabilidad individual muy elevada en el ratio de IF e indicaron que podría ser una característica heredable de cada individuo. Al contrario, Boe-Hansen y col., (2005) no hallaron diferencias en 3 muestras seminales congeladas procedentes de toros de la raza Holstein-Frisian, tras realizar varios análisis hasta los 25 min, pero esto podría explicarse porque los periodos de tiempo analizados fueron muy cortos, y el semen de toro posee una elevada resistencia a la fragmentación del ADN espermático durante las primeras 4 h de incubación (Gosálvez y col., 2008).

Esta variabilidad en la dinámica de fragmentación del ADN podría asociarse a diferencias inherentes a los procesos bioquímicos y metabólicos de la célula espermática (Loomis y Graham, 2008), la endogamia (Baccetti y col., 2001 en humano; Ruiz-López y col., 2010 en gacela), las características genéticas y el entorno de cada individuo (Karoui y col, 2012), y la composición en ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática del espermatozoide que se relaciona con la susceptibilidad o resistencia al estrés oxidativo (Waterhouse y col., 2006, 2010, en bovino; Domínguez-Rebolledo, 2010, en ciervo).

Nuestros resultados también están de acuerdo, con los descritos por otros autores en otras especies (Pérez-Llano y col., 2010 en cerdo; López-Fernández y col., 2007 en caballo; Gosálvez y col., 2007 en varias especies de mamíferos; López-Fernández y col., 2008a en carnero; López-Fernández y col., 2009 en tenca). También se han descrito estas diferencias en situaciones estresantes como el sexado del semen (Gosálvez y col., 2011b) y en la presencia de contaminación bacteriana en el esperma de toro (González-Marín y col., 2011).

Por tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se constata que la dinámica del IF en términos de velocidad de degradación de ADN, difiere entre individuos de la misma raza dentro de la especie bovina, siendo esta información de gran importancia.

Mientras que muchas muestras podrían ser poco vulnerables a la incubación, como parecen confirmar los resultados de este trabajo, es posible que una parte de las muestras de toro pudiesen ser más vulnerables. Por lo tanto, los protocolos estándares de las técnicas de reproducción asistida fracasarían en cuanto a la funcionalidad de esos espermatozoides.

### **3.2.1 Estudio comparativo de dosis seminales procedentes del mismo eyaculado.**

Tras analizar varias dosis seminales del mismo eyaculado del toro de Lidia (N=5) no se hallaron diferencias significativas en la dinámica de fragmentación del ADN entre las muestras, como era esperable, pero sí se observó una repetibilidad en las medidas del IF desde el inicio hasta las 96 h de incubación a 38,6 °C.

Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en toros domésticos que demostraron la existencia de una larga repetibilidad de las medidas tras 6h de incubación a 37°C de los mismos individuos (N=201), incluso asociado a, la aparición de contaminación bacteriana en las muestras de semen (González-Marín y col., 2011; Karoui y col., 2012). Esta repetibilidad de resultados demostraría que el IF podría ser una medida constante en dosis distintas obtenidas del mismo eyaculado, convirtiéndose en un valioso marcador tras comprobar su fertilidad, para ser utilizadas con técnicas de reproducción asistida.

Nuestros resultados están de acuerdo con Karoui y col., (2012) que, además de la baja variabilidad del IF, encontraron correlación con el éxito en IA advirtiendo su utilidad como medida predictiva para clasificar los individuos por su alta o baja fertilidad.

La relación del toro con la fertilidad en IA y el hecho que las medidas de IF sean repetibles hace de la dinámica del IF un marcador valioso de fertilidad en el toro. Por tanto será importante confirmar la dinámica de IF de cada eyaculado dentro del intervalo de tiempo que el espermatozoide necesita para alcanzar el óvulo (Gosálvez y col., 2008) para deducir su impacto sobre la fertilidad.

### **3.2.2 Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental.**

Como parece que la dinámica de fragmentación del ADN espermático es una característica inherente al individuo, se analizaron varios eyaculados del mismo individuo de la raza de Lidia (N=7) extraídos en épocas diferentes (con una diferencia mínima de 2 meses entre cada eyaculación) para evaluar dicho efecto.

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de cada eyaculado. Los resultados obtenidos por López-Fernández y col., (2011) en macho cabrío, indican que existen diferencias en cuanto a las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en función de la latitud, las condiciones de cría y la época del año. En contraposición, Karoui y col., (2012), encontraron un efecto minúsculo de la época de extracción, que podría deberse a que las extracciones se realizaron en un CIA con óptimas condiciones ambientales.

Las diferencias encontradas en este trabajo pueden ser debidas a que influyesen sobre el toro factores externos que pudieran perturbar su estado físico y pasasen desapercibidos para los técnicos el día de la extracción, como infecciones bacterianas o víricas, episodios febriles, aumento de la temperatura ambiental, estrés, contaminación microbiana de las células germinales (Karabinus y col., 1997; Sakkas y col., 1999; Ahmadi y N. Sg., 1999; Sharma y col., 2004; Gallegos y col., 2008; González-Marín y col., 2011), la latitud, las condiciones de cría, posibles influencias estacionales (López-Fernández y col., 2011), o la exposición a toxinas de origen diverso (García-Contreras y col., 2011). Además, también podrían influir otros factores como la alimentación, la condición corporal, la contaminación, etc., que podrían alterar la capacidad de los espermatozoides para soportar el estrés oxidativo, al inducir cambios en la composición de la membrana, en la disponibilidad de antioxidantes intracelulares o en la acción de factores dependientes de la espermatogénesis, ocasionando fallos en la sustitución de las histonas-protaminas o en la maduración espermática (por ejemplo, susceptibilidad a la activación de

vías apoptóticas o nucleasas), finalizando en un proceso erróneo de condensación de la cromatina espermática (Sakkas y col., 1999; Anzar y col., 2002; Agarwal y col., 2008; Aitken y De Luliis, 2010).

Todo lo apuntado anteriormente, recalca la importancia de realizar un examen físico exhaustivo al semental antes de la extracción seminal, y luego realizar ésta con las mejores condiciones de temperatura y de higiene posibles. Además, convendría analizar la dinámica del IF de cada eyaculado individual, pues es una característica inherente al animal como ha quedado patente.

### **3.3 Estudio comparativo de dosis seminales extraídas por vagina artificial y por electroeyaculación.**

No hubo diferencias en las dinámicas de fragmentación del ADN espermático de las dosis obtenidas de los eyaculados extraídos por VA y EE al mismo individuo de la raza Blanca Cacerña. No hay estudios a este respecto, únicamente los resultados del IF de Jiménez-Rabadán, (2013) que no halló diferencias en ovino, pero si las observó entre la VA y la EE en caprino, atribuyéndolo a la posible variación en la composición del plasma seminal, pero no realizó la dinámica de fragmentación del ADN.

Como ya se ha comentado, en ambos métodos, el espermatozoide es eyaculado por los conductos seminales a la misma velocidad y se expone al plasma seminal del mismo modo. Es conocido que tras la eyaculación, los metabolitos generados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante los procesos oxidantes influyen sobre la fusión espermatozoide-ovocito, la movilidad espermática y la integridad del ADN (Aitken y col., 1998). Para contrarrestar estos efectos, el plasma seminal contiene enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y otros compuestos antioxidantes como el ascorbato, urato,  $\alpha$ -tocoferol, piruvato, glutatión, taurina e hipotaurina (Finguerova y col., 2007), así como albúmina, carnitina, carotenoides y flavonoides (Tremellen, 2008). Por tanto, los eyaculados recibirían la misma protección antioxidante del plasma seminal y ello explicaría porqué la dinámica de fragmentación del ADN presenta la misma resistencia a la incubación a 38,6°C independientemente del método de extracción utilizado.

## Conclusiones

1. El Test de Dispersión de la Cromatina Espermática ( SCD) es una técnica rápida, económica y de fácil aplicación e interpretación que debería incorporarse a la rutina laboratorial como apoyo al seminograma básico realizado en el ganado vacuno en general, y en el vacuno extensivo, en particular.
2. El índice de fragmentación medio del ADN espermático en el ganado bovino fue del 8,08% y tan solo un 4,70% del total de muestras criopreservadas analizadas, presentaron niveles elevados ( $IF \geq 20\%$ ) de fragmentación del ADN.
3. De los parámetros analizados, la movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad postdescongelación se han correlacionado con el IF pero podrían no ser concomitantes, lo que indicaría que el IF es un parámetro independiente del seminograma clásico de calidad seminal.
4. La raza influye sobre este índice, obteniéndose para la raza de Lidia un IF medio del 6,05% y para la Blanca Cacerense de un 13,97%. En el resto de parámetros espermáticos, se observaron diferencias debidas a la raza en el volumen y en las anomalías morfológicas postdescongelación.
5. La edad del individuo influye en la calidad seminal a partir de los 9 años de edad. Se incrementan significativamente el volumen y el IF, mientras que el resto de parámetros no presentan diferencias.
6. No se encontraron diferencias en los parámetros espermáticos, en función del método de extracción utilizado (vagina artificial y electroeyaculación).

La extracción *postmórtem* por flujo retrógado de la cola del epidídimo, mostró buenas características de calidad seminal, diferenciándose significativamente en el volumen seminal, el IF y parámetros de movilidad.

7. La dinámica de fragmentación del ADN espermático de muestras seminales criopreservadas, varió en función de la temperatura de incubación, siendo más rápida a temperatura del tracto genital de la hembra con un límite de resistencia del ADN de 48 h, mientras que en las obtenidas *postmórtem* fue de 24 h. También presentó una elevada variabilidad inter-individual e intra-individual si las dosis pertenecían a eyaculados distintos del mismo semental, mientras que no se encontraron diferencias en las dinámicas si formaban parte del mismo eyaculado.
8. Las dosis seminales criopreservadas, obtenidas por electroeyaculación y vagina artificial al mismo toro de la raza Blanca Cacereña, no mostraron diferencias en la dinámica de fragmentación del ADN espermático, siendo similares.

## Bibliografía

**Abad, C., Amengual, M.J., Gosálvez, J., Coward, K., Hannaoui, N., Benet, J., García-Peiró, A., Prats, J. (2013).** Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrología* 45, 211-216.

**Acevedo, N. (2001).** Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine. Thesis doctoral. Blacksburg (VA): Virginia Polytechnic Institute and State University. EEUU.

**Acosta, M., Sanz, J., Rodríguez, I. (1991).** Aportaciones a la recogida de material seminal en el ganado vacuno bravo. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Salamanca, Castilla y León, 152-155.

**Addad, R.O., Freneau G.D., Cardoso, L., Marcal, L. (2009).** Avaliação clínico-andrológica em touros Nelore e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. *Ciencia Animal brasileira* 10, 1044-1054.

**Agarwal, A., Allamaneni, S. (2004).** The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Review Minerva Ginecol.* 56(3), 235-245.

**Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. (2003).** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829-843.

**Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008).** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *An. J. Reprod. Immunol.* 59, 2-11.

**Ahmadi, A., Ng, S. (1999).** Fertilizing ability of DNA-Damaged Spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 284, 696-704.

**Aitken, R.J., De, Iuliis, G.N. (2010).** On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 3-13.

**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.

**Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S. (1998).** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59, 1037-1046.

**Aitken, R.J., Koppers, A.J. (2011).** Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 13, 36-42.

**Aitken, R.J., Jones, K.T., Robertson, S.A. (2012).** Reactive oxygen species and sperm function - In sickness and in health. *J. Androl.* 33(6), 1096-1106.

**Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W. (1992).** Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *J. Reprod. Fertil.* 94, 451-462.

**Aitken, R.J., Fisher, H.M., Fulton, N., Gómez, E., Knox, W., Lewis, B., Irvine, S. (1997).** Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.* 47(4), 468-482.

**Aitken, R.J., Krausz, C. (2001).** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 122, 497-506.

**Al-Hakim, M. K., Ali, S. B. A., Singh, B. P. (1986).** Studies on semen characteristics of Karadi bulls. *Animal Breeding Abstracts.* 54, 155.

**Albers, M.I., Barrios, D.R. (2011).** Concentración y morfología de los espermatozoides epididimarios obtenidos de toros postmortem. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* 52(2), 091-098.

**Allamaneni, S.S., Naughton, C.K., Sharma, R.K., Thomas, A.J. Jr., Agarwal, A. (2004).** Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with

varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil. Steril.* 82, 1684-1686.

**Almquist, J.O. (1982).** Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance. *J. Dairy Sci.* 65(5), 814-823.

**Almquist, J.O., Amann, R.P. (1976).** Reproductive Capacity of Dairy Bulls. Part XI. Puberal characteristic and postpuberal change in production on semen and sexual activity of Holstein bull ejaculated frequently. *J. Dairy Sci.* 59, 986-991.

**Alvarez, C., Castilla, J.A., Martínez, L., Ramírez, J.P., Vergara, F., Gaforio, J.J. (2003).** Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum. Reprod.* 18(10), 2082-2088.

**Amann, R.P. (1981).** A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.* 2, 37-58.

**Amann, R.P. (1993).** Physiology and endocrinology in equine reproduction. Ed. McKinnon and Voss. Lea and Febiger, Philadelphia, EEUU, 658-658.

**Amann, R.P., Almquist, J.O. (1961).** Reproductive capacity of dairy bulls I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. I. *J. Dairy Sci.* 44, 1537-1543.

**Amann, R.P., Almquist, J.O. (1976).** Bull management to maximize semen output. In: Proc. 6th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. 1-15.

**Amann, R.P., Griel Jr.L.C. (1974).** Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. *J. Dairy Sci.* 57(2), 212-219.

**Amann, R.P., Schanbacher, B. (1983).** Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 57(2), 380-403.

**Anel, L., Gerra, C., Alvarez, M., Anel, E., Martínez, A.F., Boixo, C.J., Kaabi, M., Herraes, P., Paz, P. (2002).** Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus Elaphus Hispanticus*). *Theriogenology* 57, 577.

**Anel-López, L., Álvarez-Rodríguez, M., García-Álvarez, O., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., Luis Anel, L., de Paz, P., Julián-Garde, J., Martínez-Pastor, F. (2012).** Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim. Repr. Sci.* 135(1), 37-46.

**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.

**Anzar, M., He, L., Buhr, M., Kroetsch, T., Pauls, K. (2002).** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.* 66, 354-360.

**Aravindan, G., Bjordahl, J., Jost, L., Evenson, D. (1997).** Susceptibility of human sperm to in situ DNA desnaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 236(1), 231- 237.

**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.

**Arriola, J. (1995).** Nuevas tecnologías reproductivas en el ganado de lidia. *Rev. Bovis* nº 62, febrero, 53-64.

**Arriola, J., Yañez, B., Villareal, P. (1989).** Respuesta del toro de lidia a la electroeyaculación. 4º Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e I.A., León, Castilla y León, España: 211-213.

**Ausió, J., Eirín-López, J.M., Frehlick, L.J. (2007).** Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 63-79.

**Austin, J.W., Hupp, E.W., Murphree, R.L. (1961).** Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J. Dairy Sci.* 44(12), 2292-2297.

**Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E., Piomboni, P. (2001).** Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum. Reprod.* 16(7), 1365-71.

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

**Balhorn, R., Gledhill, B.L., Wyrobek, A.J. (1977).** Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 16, 4074-4080.

**Balhorn, R., Corzett, M., Brewer, L. (2000).** DNA Condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 230-234.

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

**Ballachey, B., Evenson, D., Saacke, R. (1988).** The sperm chromatin structure assay relationship with alternative tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9, 109-115.

**Barrios, A. (2002).** Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. IX Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela.

**Barth, A.D. (2000).** Bull breeding soundness evaluation manual. 2<sup>a</sup> Ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 75.

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

**Bartolomé, G.P., García, B.L. (1998).** Raza Blanca Cacereña: Programa de Conservación. *Arch. Zootec.* 47, 371-380.

**Belletti, M.E., Costa, L., Mendes, M. (2005).** Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 85-90.

**Belletti, M.E., Mello, M.L. (2004).** Comparison between the Toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology* 62, 398-402.

**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.

**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.

**Berndtson, W., Igboeli, G., Pickett, B. (1987).** Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young bulls. *J. Anim. Sci.* 64, 241-246.

**Bianchi, P., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1993).** Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and In Situ Nick-Translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol. Reprod.* 49, 1083-1088.

**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.

**Bochenek, M., Smorag Z., Pilch J. (2001).** Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology* 56, 557-567.

**Boe-Hansen, G. B., Ersboll, A. K., Greve, T. y Christensen, P. (2005).** Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006-2019.

**Bordignon, V., Smith, L. (1999).** Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation Development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.* 61, 1513-1520.

**Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C. Coticchio, G. (2006).** Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21, 2876-2881.

**Boyers, S., Davis, R., Katz, D. (1989).** Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* 12, 172-200.

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

**Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (2002).** Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 38895-38900.

**Brewer, L., Corzett, M., Lau, E., Balhorn, R. (2003).** Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J. Biol. Chem.* 278, 42403-42408.

**Brito, L.F.C., Silva, A.E.D.F., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A.G., Kastelic, J.P. (2002a).** Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology* 58(6), 1175-1186.

**Brito, L.F.C., Silva, A.E.D.F., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A.G., Kastelic, J.P. (2002b).** Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 70(3-4), 181-190.

**Briz, M., Bonet, S., Pinart, B., Camps, R. (1996).** Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 221-239.

**Brogliatti, G., García, F., Cavia, R., Larraburu, G., Albrecht, A. (2004).** 12 CASA parameters of fresh bull semen collected by artificial vagina or electroejaculation in Argentina. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 156-156.

**Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. Giwercman, A. (2007).** Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 22, 174-179.

**Calero, R., Bravo, J.A., Bartolomé, P. (2007).** Agricultura y Ganadería Extremeñas. Informe 2007, Badajoz, 203-226.

**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.

**Cañón, J. (2008).** Mejora genética en el ganado de lidia: los métodos de selección. Manual de reproducción y genética del toro de lidia. Ed. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León 1, 60-72.

**Cañón, J., Tupac-Yupanqui, I., García-Atance, M., Cortés, O., García, D., Fernández, J., Dunner, S. (2008).** Genetic variation within the lidia bovine breed. *Animal genetics* 39(4), 439-445.

**Carretero, M.I., Lombardo, D., Arraztoa, C.C., Giuliano, S.M., Gambarotta, M.C., Neild, D.M. (2012).** Evaluation of DNA fragmentation in llama (< i> Lama glama</i>) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.* 131(1), 63-71.

**Centola, G., Ginsburg, K. (1996).** Evaluation and treatment of infertile male. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom, 263-276.

**Chandler, J.E., Adkinson, R.W. (1990).** Genetic and non-genetic contributions to variation in spermatozoal morphology of mature Holstein bulls. In: Proceeding of the NAAB 13th Technical Conference on AI and Reprod. 57-62.

**Chandler, J.E., Adkinson, R.W., Nebel, R.L. (1984).** Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in Continental and French straws. *J. Dairy Sci.* 67, 398-404.

**Chang, J., Shih, L., Yu L., Liao, H., Liu, J. (2004).** Apoptosis induced by bovine ephemeral fever virus. *J. Virol. Methods* 122, 165-170.

**Chen, H., Chow, P.H., Cheng, S.K., Cheung, A.L., Cheng, L.Y, WS, O.(2003).** Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *J. Androl.* 24, 704-711.

**Chenoweth, P.J. (2005).** Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64, 457-468.

**Chohan, K., Griffin, J., Lafromboise M., De Jonge C., Carrell D. (2006).** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 27(1), 53-59.

**Christensen, P., Brockhoff, P.B., Lehn-Jensen, H. (1999).** The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 23, 503-507.

**Chung, J. (1997).** Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. *Korean J. Emb. Trans.* 12(2), 189-194.

**Coddington, A.M., Hales, B.F., Robaire, B. (2004).** Spermio-genic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. *J. Androl.* 25(3), 354-362.

**Compan, H. (2008).** Nuevas tendencias en la alimentación de toros y novillos. Manual de manejo y nutrición del Toro de Lidia. Ed. Instituto Tecnológico Agrario (Itacyl). Tomo I, 20-39.

**Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003).** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *J. FASEB* 17, 1195-1214.

**Cortés-Gutiérrez E.I., Ortíz-Hernández, B.L., Dávila-Rodríguez, M.I., Cerda-Flores, R.M., Fernández, J.L., López-Fernández C, Gosálvez, J. (2013).** 5-bp Classical Satellite DNA Loci from Chromosome-1 Instability in Cervical Neoplasia Detected by DNA Breakage Detection/Fluorescence in Situ Hybridization (DBD-FISH). *Int J Mol Sci.* 19 14(2), 4135-4147.

**Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C, Fernández, J.L., Crespo, F., Gosálvez, J. (2014).** Localization of alkali-labile sites in donkey (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*) spermatozoa. *Theriogenology* 81(2), 321-325.

**Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández, J.L., López-Fernández, C., Gosálvez, J. (2011).** DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Anal Quant Cytol Histol.* 33(3), 175-81.

**Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2007).** Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urológicas Esp.* 31(2), 120-131.

**Cortes-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C, Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2008).** DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 69(8), 1022-1032.

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

**Cupps, P.T., Briggs, J.R. (1998).** Changes in the epididymis associated with morphological changes in the spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 48, 1241-1244.

**Dadoune, J. (2003).** Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* 61, 56-75.

**Davis, R., Siemers, R. (1995).** Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 857-869.

**De la Fuente, J. Monleon, M., Yepes, J. (1994).** Aplicación de tecnologías reproductivas en el ganado avileño. *Rev. Bovis*, 59, 59-79.

**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.

**Derivaux, J. (1982).** Reproducción de los animales domésticos. Trad. por José Gómez Piquer. 2ª Ed. ACRIBIA Zaragoza, 486.

**Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009).** Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* 25, 5-32.

**Didion, B.A., Kasperson, K.M., Wixon, R.L., Evenson, D.P. (2009).** Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J. Androl.* 30(6), 655-660.

**Dobrinski, I., Hughes, H. P. y Barth, A. D. (1994).** Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J. Reprod. Fertil.* 101, 531-538.

**Domínguez-Rebolledo, A.E. (2010).** Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo. Tesis doctoral, Universidad de Castilla La Mancha.

**D'Occhio, M., Hengsberger, K., Jonhston, S. (2007).** Biology of sperm chromatin and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci.* 101, 1-17.

**Enciso, M., Muriel, L., Fernández, JI., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M.,**

**Montejo, J.M., Ardoy, M., Pacheco, A., Gosálvez, J. (2006a).** 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, M. (2010).** La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

**Enciso, M., López-Fernández, C., Fernández, JI., García, P., Gosálvez, A., Gosálvez, J. (2006b).** A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 65, 308-316.

**Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., Gosálvez, J. (2009).** A two-tailed comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod. Biomed. On line* 18, 609-616.

**Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S.D., Sarasa, J., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2011a).** Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* 76, 23-32

**Enciso, M., Johnston, S.D., Gosálvez, J. (2011b).** Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay. *Reprod. Fertil. Dev.* 23(5), 633-637.

**Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J., Erenpreisa, J. (2002).** Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J. Androl.* 23, 717-723.

**Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. (1980).** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240, 1131-1133.

**Evenson, D.P. (1983).** Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 248-253.

**Evenson, D.P. (1999).** Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fertil. Dev.* 11(1), 1-15.

**Evenson, D.P., Jost, L. (1994).** Sperm chromatin structure assay: DNA denaturation. *Methods Cell. Biol.* 42, 159-76.

**Evenson, D.P., Jost, L., Baer, R. (1993).** Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *J. Environ. Mol. Mutagen.* 21, 144-153.

**Evenson, D.P., Jost, L., Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, G., Purvis, K., De Angelis, P., Claussen, O. (1999).** Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14, 1039-1049.

**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.

**Evenson D.P., Thompson, L., Jost, L. (1994).** Flow Cytometric: Evaluation of boar semen by the Sperm Chromatin Structure Assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637-51.

**Evenson, D.P., Wixon, R. (2005).** Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 532-537.

**Evenson, D.P., Wixon, R. (2006).** Clinical Aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-991.

**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.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, J.L., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vázquez, R., Álvarez J. (2003).** The Sperm Chromatin Dispersion Test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24(1), 59-66.

**Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., Lafromboise, M., De Jonge, C. (2005).** Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD). *Fertil. Steril.* 84(4), 833-842.

**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.

**Fernández-Santos, M., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Esteso, M., Soler, A., Paz, P., Anel, L., Garde, J. (2006).** Sperm characteristics and DNA Integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphushispanicus*) Epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *J. Androl.* 28, 294-305.

**Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., Matías, D., Domínguez-Rebollo, A.E., Esteso, M.C., Montoro, V., Garde, J.J. (2009).** Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 93-104.

**Fingerovaa, H., Novotnyb, J., Barborikc, J., Brezinovaa, J., Svobodovaa, M., Krskovad, M., Obornaa, I. (2007).** Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS randox®. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 151, 37-40.

**Fischer, M., Willis, J., Zini, A. (2003).** Human Sperm DNA Integrity: Correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* 61(1), 207-211.

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

**Fortes, M.R., Holroyd, R.G., Reverter, A., Venus, B.K., Satake, N., Boe-Hansen, G.B. (2012).** The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. *Theriogenology.* 78(2), 326-33.

**Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., Dacheux, J. (2000).** Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization secretion and dynamic changes of mayor proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1729-1830.

**Fraser, L. (2004).** Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol. J. Vet. Sci.* 7(4), 311-321.

**Fraser, L., Strezežek, J. (2004).** The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochem Cytobiol.* 42, 49-55.

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

**Fuerst-Waltl, B., Reichl, A., Fuerst, C., Baumung, R., Sölkner, J. (2004).** Effect of maternal age on milk production traits, fertility, and longevity in cattle. *J. Dairy Sci.* 87(7), 2293-2298.

**Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, Ch., Sölkner, J. (2006).** Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *An. Reprod. Sc.* 95, 27-37.

**Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., Goyanes, V., Gosálvez, J., Fernández, J. (2008).** Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia Trachomatis and Mycoplasma. *Fertil. Steril.* 90, 328-334.

**Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., Lenzi, A. (2000).** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 830-839.

**García-Contreras, A., De Loera, Y., García-Artiga, C., Palomo, A., Guevara, J. A., Herrera-Haro, J., López-Fernández, C., Johnston, S., Gosálvez, J. (2011).** Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reprod. Toxicol.* 31(4), 570-573.

**García-Macías, V., De Paz, P., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Gomes-Alves, S, Bernardo, J., Anel, E., Anel, L. (2007).** DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm Bos Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J. Androl.* 30, 88-98.

**García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Borragan, S., Chamorro, C., Soler, A., Anel, L., de Paz, P. (2006).** Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and brown bear (*Ursus arctos*). *J Androl.* 27, 837-846.

**García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., Benet, J. (2011).** Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* 95, 105-109.

**García-Peiró, A., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Abad, C., Amengual, M.J., López-Fernández, C., Gosálvez, J., Benet, J. (2012).** Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J. Androl.* 33, 361-367.

**Gaudioso, V., Riol, J. (1996).** Producciones equinas y de ganado de lidia. Tomo XI. Capítulo XVII. Ed. Mundiprensa, Madrid, 269-279.

**Gerber, D., Irons, P., Herold, F., Cooper, D. (2002).** Quality and freezability of epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus Caffer*) following prolonged exposure to ambient temperatures or delayed flushing. *Theriogenology* 57, 582.

**Gledhill, B. (1966).** Studies of the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoal heads. *Acta Vet. Scand.* 7, 1-20.

**Gliozi, T.M., Zaniboni, L., Cerolini, S. (2011).** DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* 75(9), 1613-1622.

**Gillan, L., Kroetsch, T., Chis Maxwell, W.M., Evans, G. (2008).** Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 201-214

**Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J., Jepson, K., Frohm, B., Spano, M. (2003).** Correlation between sperm motility and Sperm Chromatin Structure Assay parameters. *Fertil. Steril.* 80, 1404-1412.

**Golan, R., Cooper, T.G., Oschr,y Y., Oberpenning, F., Schulze, H., Shochat, L., Lewin, LM. (1996).** Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod.* 11, 1457-1462.

**González-Marín, C., Gosálvez, J., Roy, R. (2012a).** Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13(11), 14026-14052.

**Gonzalez-Marín, C., Kjelland, M. E., Roy, R., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Moreno, J. F., Gosálvez, J. (2012b).** Use of quinolones in bull semen extenders to reduce sperm deoxyribonucleic acid damage. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 7(4), 180-185.

**González-Marín, C., Roy, R., López-Fernández, C., Díez, B., Carabaño, M.J., Fernández, J.L., Kjelland, M.E., Moreno, J.F., Gosálvez, J. (2011).** Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 139-148.

**Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez, E., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Caballero, P., Nuñez, R. (2009).** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil. Steril.* 92(1), 170-173.

**Gosálvez, J., Fernández, J.L., Gosálvez, A., Arrollo, A., Agarwal, A., López-Fernández, C. (2007).** Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil. Steril.* 88, S365- S365.

**Gosálvez, J., Fernández, J.L., Goyanes, V., López-Fernández, C. (2006).** Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Biotechnology* 1, 38-51.

**Gosálvez, J., González-Martínez, M., López-Fernández, C., Fernández, J.L. Sánchez-Martín, P. (2011d).** Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil. Steril.* 96, 1083-1086.

**Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A., Holt, H.V. (2011c).** Correlations between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol Reprod De* 78, 951-961.

**Gosálvez, J., Ramírez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K.M., Kjelland, M. E., Moreno, J. F. (2011a).** Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75, 197-205.

**Gosálvez, J., Ramírez, M.A., López-Fernández C., Crespo, F.K., Evans, M., Kjelland M.E., Moreno, J.F. (2011b).** Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Dynamic features. *Theriogenology* 75, 206-211.

**Gosálvez, J., Rodríguez-Predreira, M., Mosquera, A., López-Fernández, C., Esteves, S.C., Agarwal, A., Fernández, J.L. (2013).** Characterisation of a sub-population of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the Sperm Chromatin Dispersion test. *Andrology* 1-8.

**Gosálvez, J., Vázquez, J.M., Enciso, M., Fernández J.L., Gosálvez, A., Bridle J.J., López-Fernández, C. (2008).** Sperm DNA fragmentation in rams vaccinated with Miloxan. *J. Open. Vet. Sci.* 2, 7-10.

**Graham, J.K. (1994).** Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41(5), 1151-1162.

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

**Gravance, C., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D., Casey, P. (1998).** Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.* 19, 704-709.

**Graves, C.N. (1978).** Semen and its component. In: G. W. Salisbury, N. L. Van-Demark and J. R. Lodge (eds.) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, WH Freeman and Company, San Francisco, EEUU, 247-285.

**Hallap, T., Häärd, M., Jaakma, U., Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. (2004).** Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at one and four years of age. *J. Androl.* 27, 166-171.

**Hallap, T., Jaakma, U., Rodríguez-Martínez, H. (2006).** Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 214-218.

**Hafez, C. (1989).** Reproducción e inseminación artificial en animales. 5º Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. Mexico, 694.

**Hecht, N.B. (1998).** Molecular mechanism of male germ cell differentiation. *Bioassays* 20555-20561.

**Hellman, B., Vaghef, H., Bostrom, B. (1995).** The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mut. Res. DNA Repair* 336(2), 123-131.

**Henault, M.A., Killian, G.J., Kavanaugh, J.F., Griel, L.C. (1995).** Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 52, 390-397.

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

**Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L. (2007).** Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein Friesian Bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 153-161.

**Igboeli, G., Foote, R.H. (1968).** Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 51, 1703-1705.

**Imrat, P., Mahasawangkul, S., Gosálvez, J., Suthanmapinanth, P., Sombutputorn, P., Jansittiwate, S., Thongtip, N., Pinyopummin, A., Colenbrander, B., Holt, W.V., Stout, T.A.E. (2012).** Effect of cooled storage on quality and DNA integrity of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 241105-241116

**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.

**Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (2003).** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743-758.

**Ji, B.T., Shu, X.O., Linet, M.S., Zheng, W., Wacholder, S., Gao, Y.T., Ying D.M., Jin, F. (1997).** Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer Inst.* 89(3), 238-244.

**Jiménez-Rabadán, P. (2013).** Advances in sperm cryopreservation of samples collected by vagina artificial and electroejaculation collection from Blanca-Celtibérica goat breed. Tesis doctoral. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. Universidad de Castilla la Mancha.

**Johnson, M., Everitt, B. (1984).** Essential Reproduction. 2<sup>a</sup> Ed. Blackwell Scientific Publications, Londres, England, 296.

**Johnston, S.D., López-Fernández, C., Gosálvez, A., Zee, Y., Holt, W.V., Allen, C., Gosálvez, J. (2007).** The relationship between sperm morphology and chromatin integrity in the koala (*Phascolarctos cinereus*) as assessed by the sperm chromatin dispersion test (SCDt). *J. Androl.* 28(6), 891-899.

**Johnston, S.D., Zee, Y.P., López Fernández, C., Gosálvez, J. (2012).** The effect of chilled storage and cryopreservation on the sperm DNA fragmentation dynamics of a captive population of koalas. *J. Androl.* 33(5), 1007-1015.

**Juriscova, A., Acton, B.M. (2004).** Deadly decisions: The role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction* 128, 281-291.

**Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraiez, P., Anel, L. (2003).** Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60, 1249-1259.

**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.

**Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Kaproth, M.T.E. (1991).** Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J. Dairy Sci.* 74, 3836-3848.

**Karabinus, D.S., Vogler, C.J., Saacke, R.G., Evenson, D.P. (1997).** Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J. Androl.* 18, 549-549.

**Kasimanickam, R., Nebel, R., Peeler, I., Silvia, W., Wolf, K., Mcallister, A., Cassell, B. (2006).** Breed differences in competitive indices of holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology* 66, 1307-1315.

**Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I., Carabaño, M.J. (2011).** Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 28-38.

**Karoui, S., Díaz, C., González-Marín, C., Amenabar, M. E., Serrano, M., Ugarte, E., Gosálvez, J., López-Fernández, Carabaño, M.J. (2012).** Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility?. *J. Anim. Sci.* 90(8), 2437-2449.

**Kennedy, R. (1998).** The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 50, 955-972.

**Khalifa, T.A., Rekkas, C.A., Lymberopoulos, A.G., Sioga, A., Dimitriadis, I., Papanikolaou, T. (2008).** Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 143-163.

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

**Koonjaenak, S., Chanatinart, V., Ekwall, H., Rodríguez-Martínez, H. (2007).** Morphological features of spermatozoa of Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *J. Vet. Med. A.* 54, 169-178.

**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.

**Latif, M.A., Ahmed, J.U., Bhuiyan, M.M.U., Shamsuddin, M. (2009).** Relationship between scrotal circumference and semen parameters in crossbred bulls. *The Bangladesh Veterinarian* 26(2), 61-67.

**Latini, M., Gandini, L., Lenzi, A., Romanelli, F. (2004).** Sperm tail agenesis in a case of consanguinity. *Fertil. Steril.* 81(6), 1688-91.

**Loomis, P.R., Graham, J.K. (2008).** Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customised freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 119-128.

**López, A., Pérez-Clariget, R., Álvarez, F., Queirolo, D., Burgueño, J. (2007).** Influencia de factores medioambientales sobre la producción espermática en toros del Uruguay. APPA-ALPA. Cusco. Perú.

**López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosálvez, J. (2007).** Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.

**López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vazquez, J. M., Holt, W.V., Gosálvez, J. (2008a).** Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology* 70, 898-908.

**López-Fernández, C., Gage, M.J., Arroyo, F., Gosálbez, A., Larránz, A.M., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2009).** Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction* 138, 25-66.

**López-Fernández, C., Gosálvez, J. (2012).** Seeing sperm DNA fragmentation in rabbits. *Mol Reprod Dev.* 79(1), 1.

**López-Fernández, C., Johnston, S.D., Gosálbez, A., Gosálvez, J. (2011).** Seasonal changes in sperm DNA fragmentation of Murciano-Granadina goats: the compelling case for dynamic assessment. *Small. Rum. Res.* 100, 50-53.

**López-Fernández, C., Johnston, S.D., Fernández, J.L., Wilson, R.J., Gosálvez, J. (2010).** Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriology* 74, 1362-1370.

**López-Fernández, C., Pérez-Llano, B., García-Casado, P., Sala, R., Gosálvez, A., Arroyo, F., Fernández, J., Gosálvez, J. (2008b).** Sperm DNA Fragmentation in a random sample of the spanish boar livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 103(1-2) 87-98.

**Madrid, N., Ott, R., Rao, D., Parret, D., Vanderwert, W., Willms, C. (1988).** Scrotal circumference, seminal characteristics, and testicular lesions of year linn Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.* 49, 579, 584.

**MAGRAMA, ARCA (2014).** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Sistema ARCA. <http://www.magrama.gob.es>.

**Malama, E., Kiossis, E., Theodosiou, T., Boscós, C., Bollwein, H. (2012).** Lag effect of microclimatic conditions on DNA integrity of frozen-thawed bovine sperm. *Anim Reprod Sci.* 136, 33-41.

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

**Malcotti, V., Pelufo, V., Bergamo, N., Aisen, E. (2012).** Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing-thawing. *Anim. Prod. Sci.* 52, 741-745.

**Marco-Jiménez, F., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P. (2008).** Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 403-408.

**Marcon, L., Boissonneault, G. (2004).** Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 70(4), 910-918.

**Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. (2004).** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.* 71(1), 28-37.

**Martínez, F.A. (2005).** Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract. Thesis. Institute of Reproductive Medicine, University of Veterinary Medicine-Hannover, Germany.

**Martínez-Pastor, F., Díaz-Corujo, A.R., Anel, E., Herraez, P., Anel, L., Paz P. (2005).** Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 64, 958-974.

**Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Domínguez-Rebolledo, A.E., Esteso, M.C., Garde, J.J. (2009).** DNA status on thawed semen from fighting bull: A comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 424-431.

**Martins, C. F., Driessen, K, Melo, P., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V., Rumpf, R., Dode M. (2009).** Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 50-57.

**Martins, C.F., Rumpf, R., Pereira, D.C., Dode, M.N. (2007).** Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 326-331.

**Mathevon, M., Buhr, M.M., Dekkers, J.C. (1998).** Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J.Dairy Sci.* 81(12), 3321-3330.

**Mclay, D., Clarke, H., (2003).** Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125, 625-633.

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

**Meistrich, M., Mohapatra, B., Shirley, C., Zhao, M. (2003).** Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-488.

**Mello, M.S. (1982).** Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry* 74, 387-392.

**Mengual, L., Ballejà, 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.

**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.

**Montes, F. "Paquiro"(1836)** Tauromaquia completa o el arte de torear en plaza. Ed. Turner,1983, Madrid, 256.

**Morrell, J., Johannisson, A., Dalin, A., Hammar, L., Sandebert, T., Rodríguez-Martínez H. (2008).** Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Ac. Vet. Scan* 50, 2.

**Morris, I., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D. (2002).** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis(comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.* 17, 990-998.

**Moskovtsev, S.I., Willis, J., White, J., & Mullen, J.B.M. (2009).** Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 74(4), 789-793.

**Moustafa, M., Sharma, R., Thorton, J., Mascha, E., Abdel-Hafes, M., Thomas, A., Agarwal, A. (2004).** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA desnaturation in spermatozoa from patients examined for fertility. *Hum. Reprod.* 19(1), 129-138.

**Muño, R., Fernández, M. y Peña, A.I. (2006).** Parámetros cinéticos de eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. *ITEA: Información Técnica Económica Agraria.* 102, 55-66.

**Muño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O. (2009).** Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology* 72, 860-868.

**Muriel, N. Garrido, J. Fernández, Remohí J., Pellicer, A., De Los Santos, M., Meseguer, M. (2006)** Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the Sperm Chromatin Dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 85(2)371-383.

**Nagy, S., Johannisson, A., Wahlsten, T., Ijäs, R., Andersson, M., Rodríguez-Martínez, H. (2013).** Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires *Theriogenology* 79(8), 1153-1161.

**Nakazawa, Y., Shimada, A., Noguevhi, J., Domeki, I., Kaneko, H., Kikuchi, K. (2002).** Replacement of nuclear protein by histone in pig sperm during "in vitro" fertilization. *Reproduction* 124, 565-72.

**Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Finol-Parra, G., Carruyo, G., Vilchez-Siu, V., Osorio-Meléndez, C., Rubio-Guillén J., Valeris-Chacín, R. (2011).** Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 24, 2.

**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.

**Oliva, R., Dixon, G.H. (1990).** Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments. *J Mol. Evol.* 30, 333-346.

**Ostling, O., Johanson, K.J. (1984).** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.

**Palmer, C.W. (2005).** Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls *Theriogenology* 64, 469-479.

**Parejo, J.C., Sansinforiano, M.E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Fernández-García, J.L., Padilla, J.A. (1997).** Optimización de la técnica RAPD en la raza vacuna Blanca Cacerense. *Arch. Zootec.* 46, 279-284.

**Parejo, J.C., Padilla, J.A., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Sansinforiano M.E. (2008).** III Symposium nacional de razas autóctonas en peligro de extinción. Losar de la Vera, Cáceres.

**Parland, S.M., Kearney, J.F., Rath, M., Berry, D.P. (2007).** Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.* 90(9), 4411-4419.

**Parvanov, P. (2000).** Study on the effect of method of bull semen collection upon several qualitative parameters of fresh and after thawing of semen. *Bulg. J. Agric. Sci.* 6, 233-237.

**Pérez-Llano, B., Enciso, M., García-Casado, P., Sala, R., Gosálvez, J. (2006).** Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology* 66, 2137-2143.

**Pérez-Llano, B., López-Fernández, C., García-Casado, P., Arroyo, F., Gosálvez, A., Sala, R., Gosálvez, J. (2010).** Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: ejaculate and temperature effects. *Anim. Reprod. Sc.* 119, 235-243.

**Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M., Bailey, J.L. (2004).** Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.* 25, 224-233.

**Poccia, D. (1986).** Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol* 105, 1-65.

**Polo, S.E., Jackson, S.P. (2011).** Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: A focus on protein modifications. *Genes. Dev.* 25, 409-433.

**Portas, T., Johnston, S.D., Hermes, R., Arroyo, F., López-Fernández, C., Bryant, B., Hildebrandt, T.B., Göritz, F., Gosálvez, J. (2009).** Frozen-thawed rhinoceros sperm exhibit DNA damage shortly after thawing when assessed by the sperm chromatin dispersion assay. *Theriogenology* 72(5), 711-720.

**Potts, R., Newbury, C., Smith, G., Notarianni, L., Jefferies, T. (1999).** Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.* 423(1/2), 103-11.

**Purroy, A. (2003).** Comportamiento del Toro de Lidia. En el campo, en el Ruedo. Ed. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 267.

**Quevedo, L. (2008).** Extracción de semen y evaluación seminal al semental de lidia. Manual de reproducción y genética del toro de lidia. Ed. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid 1, 28-41.

**Reyes-Moreno, C., Gagnon, A., Sullivan, R., Sirard, M. (2000).** Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J.Androl.* 21(6), 876-886.

**Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., Sirard, M. (2002).** Caracterización and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.* 66(1), 159-166.

**Robaire, B., Viger, R. (1995).** Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.* 52, 226-236.

**Rodríguez, B., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Martínez-Moya, M., Alonso, C., Martín, B., Rodríguez-Alonso, B., García-Peiró, A., Gosálvez, J. (2012).** Varicocele, leucocitospermia y su impacto en la fragmentación del ADN espermático. *Rev. Int. Androl.* 10(1), 3-10.

**Rodríguez Montesinos, A. (1997).** El Toro de Santa Coloma. Ed. Consejo General de Colegios Veterinarios de España, Madrid, 350.

**Rodríguez Montesinos, A. (1995).** Selección, consanguinidad y cruzamientos. Influencias en las líneas y castas actuales. Ponencia: II Symposium Nacional del Toro de Lidia. Ed. Comité Organizador Symposium Nacional del Toro de Lidia, Zafra. Badajoz, 45-50.

**Rodríguez, S., Goyanes, V., Segrelles, E., Blasco, M., Gosálvez, J., Fernández, J. (2005).** Critically Short Telomeres Are Associated With Sperm DNA Fragmentation. *Fertil Steril.* 84(4), 843-845.

**Romero, C. (2009).** Raza Blanca Cacereña: Una raza en peligro de extinción. II Congreso de Estudiantes Universitarios de Ciencia, Tecnología e Ingeniería Agronómica, 157-160.

**Rubes, J., Selevan, S., Evenson D., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z. (2005).** Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum. Reprod.* 20(10), 2776-2783.

**Ruiz-Lopez, M.J., Evenson, D.P., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R. (2010).** High levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. *Biol. Reprod.* 83(3), 332-338.

**Rueda, L., Bartolomé, P., Vara, G. (2011).** Ensayo de tres protocolos de superovulación en la Raza bovina Blanca Cacereña para la ampliación del banco de embriones. Póster: Symposium Hispano-Luso d razas autóctonas en peligro de extinción. San Vitero. Zamora.

**Rybar, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatcova, M., Rubes, J. (2004).** Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay In the Czech Republic. *Vet. Med.* 49, 1-8.

**Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., Kubickova, S., Veznik, Z., Rubes, J. (2010).** Fertil bull sperm aneuploidy and chromatin integrity in relationship to fertility. *Int. J. Androl.* 33, 613-622.

**Rybar, R., Prinosilova, P., Kopecka, V., Hlavicova, J., Veznik, Z., Zajicova, A., Rubes, J. (2012).** The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standard semen parameters in men from infertile couples. *Andrología* 44, 410-418.

**Saacke, R.G. (1990)** What is abnormal? And is abnormal dependent upon the animal? N.A.A.B. 13<sup>th</sup> Tech. Conf. Art. Ins. Reprod. 67-73.

**Sailer, B., Jost, L., Erickson, K., Tajiran, M., Evenson, D. (1995).** Effects of X-Irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* 25(1), 23-30.

**Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, E., Bizzaro, D., Bianchi, P., Bianchi, U. (1999).** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* 4, 31-37.

**Sakkas, D., Seli, E., Manicardi, G.C., Nijs, M., Ombelet, W., Bizzaro, D. (2004).** The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Hum. Fertil.* 7, 99-103.

**Salamon, S., Maxwell, W. (1995).** Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37, 185-249.

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

**Salisbury, G.W., Baker, F.N. (1966).** Nuclear morphology of spermatozoa from inbred and linecross Hereford bulls. *J. Anim. Sci.* 25, 476.

**Sánchez-García, L., Fernández-Rodríguez, M., Vallejo-Vicente, M. (1992).** Formación de un banco de germoplasma (semen y embriones congelados) en el programa de preservación de las razas bovinas morenas gallegas. *Arch. Zootec.* 41, 485-496.

**Sánchez-Pena, L., Reyes, B., López-Carrillo, L., Recio, R., Moran-Martínez, J., Cebrian M., Quintanilla, V. (2004).** Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196(1), 108-113.

**Sang-Myeong, L., Kleiboeker, B. (2007).** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365, 419-434.

**Schmid, T., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti F, Young S, Weldon R. (2007).** The Effects of Male Age on Sperm DNA Damage in Healthy Non-smokers. *Hum. Reprod.* 22, 180-187.

**Selevan, S., Borkovec, L., Slott, V., Zudova, Z., Rubes, J., Evenson, D., Perrault S.D. (2000).** Semen quality and reproductive health of young czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect* 109(9), 887-94.

**Seli, E., Sakkas, D., Gardner, D., Schoolcraft, W., Moffatt, O. (2004).** Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 82, 378-383.

**Sergerie, M., Mieuisset, R., Croute, F., Daudin, M., Bujan, L. (2007).** High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertil. Steril.* 88(4), 970.E1-970.E7.

**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.* 3, 91-10.

**Shanmugam, M., Vinoth, A., Rajaravindra, K.S., Rajkumar, U. (2014).** Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. *Anim. Reprod. Sci.* 145, 81-85.

**Sharma, R., Agarwal, A. (1996).** Sperm quality improvement in cryopreserved human semen. *J. Urol.* 156, 1008-1012.

**Sharma, N., Mohan, G. Sahni, K. L (1991).** Characteristics and cryopreservation of semen of Holstein-Friesian bulls under tropics. *Indian J. An. Sci.* 61, 977-979.

**Sharma, R. K., Said, T., Agarwal, A. (2004).** Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Androl.* 6(2), 139-148.

**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.

**Shoukir, Y., Chardonens, D., Campana, A., Sakkas, D. (1998).** Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: A paternal influence? *Hum. Reprod.* 1998, 13, 1632-1637.

**Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., Lewis, S.E. (2011).** Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed.* On line 23, 724-734.

**Silva, A.E.D.F., Dias, A.L., Unanian, M.M., Freitas, A.R., Bloch, C.J. (2003).** Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev. Bras. Zootec.* 32, 1890-1900.

**Silva, A.E.D.F., Unanian, M.M., Cordeiro, C.M.T., Freitas, A.R. (2002).** Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Rev. Brasil. Zoot.* 31(3), 1157-1165.

**Silva, B., Gonzalo, A., Cañón, J. (2006).** Genetic parameters of aggressiveness, ferocity and mobility in the fighting bull breed. *Anim. Res.* 55, 65-70.

**Silva, P., Gadella, B. (2006).** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.

**Singh, N., Mccoy, M., Tice, R., Schneider, E. (1988).** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1), 184-191.

**Slowinska, M., Karol, H., Cieresko, A. (2008).** Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiology* 56, 100-102.

**Söderquist, L., Janson, L., Haard, M., Einarsson, S. (1996).** Influence of season, 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.

**Söderquist, L., Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S. (1991).** Sperm Morphology and fertility in AI bulls. *Zentralblad Veterinärmed* 38, 534-543.

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

**Sotillo, J.L., Serrano, V. (1985).** *Producción animal I. Etnología Zootécnica Tomo I.* Ed. Tebas-Flores, Madrid, 403.

**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.

**Specht, I.O., Hougaard, K.S., Spanò, M., Bizzaro, D., Manicardi, G.C., Lindh, C.H., Toft, G., Jönsson, B.A., Giwercman, A., Bonde, J.P. (2012).** Sperm DNA integrity in relation to exposure to environmental perfluoroalkyl substances - A study of spouses of pregnant women in three geographical regions. *Reprod. Toxicol.* 33, 577-583.

**Speit, G., Hartmann, A. (1999).** The comet assay (Single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 113, 203-212.

**Speit, G., Vasquez, M., Hartmann, A. (2009).** The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mut. Res.* 681, 3-12.

**Stout, M.A. (2012).** Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same Holstein bulls .Tesis Doctoral. Universidad de Louisiana, EEUU.

**Sun, J., Jurisicova, A., Casper, R. (1997).** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentacion in human sperm:correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56, 602-607

**Taylor, J.F., Bean, B., Marshall, C.E., Sullivan, J.J. (1985).** Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. *J.Dairy Sci.* 68, 2703-2722.

**Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J., Friedman, S. (1984).** A Test For The Practical Evaluation Of Male Fertility By Acridine Orange (Ao) Fluorescence. *Fertil Steril.* 42(1), 87- 91.

**Thomas, C., Garner, D., Dejarnette, J., Marshall, C. (1998).** Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58(3), 786-793.

**Tomlinson, M., Moffatt, O., Manicardi, G., Bizzaro, D., Afnan, M., Sakkas, D. (2001).** Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.* 16(10), 2160-2165.

**Tremellen, K. (2008).** Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum. Reprod.* 14, 243-258.

**Tsakmakidis, I.A, Khalifa, T.A.A., Boscos, C.M. (2012).** Age-related changes in quality and fertility of porcine semen. *Biol. Res.* 45, 381-386.

**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.

**Unión de Criadores del Toro de Lidia (2005).** *Un Siglo de Toros 1905 - 2005.* Ed. UCTL, Madrid, 193.

**Vagini, L., Baruffi, R.L., Mauri, A.L., Petersen, C.G., Massaro, F.C., Pontes, A., Olivera J.B.A., Franco, Jr. J.G. (2007).** The Effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod. Biomed. Online* 15, 514-519.

**Vallecillo, H.A.F. (2011).** Caracterización reproductiva de toros de la raza Marismeña como base a su conservación. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

**Van Eldik, P., EH Van Der, E.H., Waaij, E.H., Ducro, B., Kooper, A.W., Stoot T.A.E., Colenbrander, B. (2006).** Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology* 65, 1159-1170.

**Vilakazi, D.M., Webb, E.C. (2004).** Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South African. J. An. Sci.* 34(1), 62-69.

**Virro, M., Larson-Cook, K., Evenson, D. (2004).** Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) Parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* 81, 1289-1295.

**Vishwanath, R., Shannon, P. (2000).** Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Repro. Sci* 62, 23-53.

**Wang, J., Fan, H.C., Behr, B., Quake, S.R. (2012).** Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell.* 150, 402-412.

**Ward, W., Coffey, D. (1991).** DNA Packaging and organization in the mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44(4), 569-574.

**Ward, W. (1993).** Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 48(6), 1193-1201.

**Ward, W., Zalensky, A. (1996).** The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 6(2-3), 139-147.

**Wat-sum, O., Chen, H., Chow, P.H. (2006).** Male genital tract antioxidant enzymes - their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 205, 80-83.

**Waterhouse, K.E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D., De Angelis, P. (2006).** Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 781-788.

**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.

**Watson, P.F. (1981).** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62, 483-492.

**Watson, P.F. (2000).** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 481-492

**Way, A.L., Griel, L.C., Killian, G.J. (2000).** Effects of accessory gland fluid on viability, capacitation and acrosoma reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J. Androl.* 21, 213-219.

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

**Wykes, S., Krawetz, A. (2003).** The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 278, 29471-29474.

**Wyrobek, A.J., Evenson, D., Arnheim, N., Jabs, E.W., Young, S., Pearson, F., Glasser, R.L.F., Thiegmann, I., Eskenazi, B. (2006).** Advancing male age increase the frequencies of sperm with DNA fragmentation and certain gene

mutations, but not aneuploidies or diploidies. *Proc Natl. Acad. Sci. EEUU* 103(25), 9601-9606

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

**Yu, I., Leibo, S.P. (2002).** Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179-1190.

**Zee, Y.P., López-Fernández, C., Arroyo, F., Johnston, S.D., Holt, W.V., Gosálvez, J. (2009).** Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction* 138, 267-278.

**Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J., Jarvi, K. (2001).** Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 58, 258-261.

**Zini, A., Libman, J. (2006)** Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Cmaj.* 175(5), 495-500.

**Zini, A., San Gabriel, M., Baazeem, A. (2009).** Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J. Assist. Reprod. Gen.* 26(8), 427-432.

**Zubkova, E.V., Wade, M., Robaire, B. (2005).** Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil. Steril.* 84(2), 1191-1198.



