

**Efecto de la raza sobre la protaminación espermática y su relación con la calidad de espermatozoides bovinos criopreservados**

*Effect of breed on sperm protamination and its relationship with the quality of cryopreserved bovine spermatozoa*

Juan Camilo Restrepo Guzmán (1037641014)<sup>1</sup>, Alfredo Giraldo Balanta<sup>2</sup>, Mauricio Rojas López<sup>3</sup>, Kelly Vanessa Zapata Carmona<sup>4</sup>, Giovanni Restrepo Betancur<sup>4</sup>, Alexandra Úsuga Suarez<sup>5</sup>.

*<sup>1</sup> Estudiante de Maestría en Biotecnología de la Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES; Medellín, Colombia.*

*<sup>2</sup> Estudiante de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES; Medellín, Colombia.*

*<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Medellín, Colombia.*

*<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia; sede Medellín, Colombia*

*<sup>5</sup> Docente Investigador, Grupo de Investigación en Ciencias Animales INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES; Medellín, Colombia*

## Resumen

Para llevar a cabo el desarrollo de algunas biotecnologías en la reproducción animal es importante el uso de semen de óptima calidad. Para esto es necesario conocer la viabilidad misma del espermatozoide, desde su macroestructura hasta su microestructura, incluyendo entre esta última, una característica básica como la integridad del ADN. En el espermatozoide a diferencia de las células somáticas, su ADN se encuentra unido a proteínas llamadas protaminas, las cuales le permiten tener un grado de compactación mayor. Cualquier falla en el proceso de formación de las protaminas, conocido como protaminación, implica daño del espermatozoide, conllevando a la fragmentación del ADN, que a su vez conduce a un menor éxito en la fertilización. Por lo anterior, el interés de esta investigación fue evaluar el efecto de la raza sobre la protaminación espermática y su relación con la calidad de espermatozoides bovinos criopreservados. Para ello se utilizó el semen de diez toros: cinco bovinos *Bos indicus*, de la raza Guzerá; y cinco bovinos de raza criolla Blanco Orejinegro (BON). Se colectaron tres eyaculados de cada toro con un intervalo de dos meses, mediante el método de electroeyaculación, obteniendo un total de 30 eyaculados. El semen fue criopreservado a una concentración final de 60 millones de espermatozoides por mililitro (mL) en un diluyente a base de Tris, mediante un protocolo de congelación rápida. Posteriormente se descongelaron mínimo 5 pajillas por eyaculado, a las cuales se les evaluó movilidad y cinética espermática mediante un análisis computarizado con el sistema Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptic, España); la integridad de la membrana plasmática mediante el test hiposmótico; la vitalidad espermática mediante microscopía de fluorescencia; la morfología espermática mediante la tinción eosina negrosina; la estabilidad de la membrana plasmática, la actividad mitocondrial, la integridad de ADN y la protaminación espermática fueron evaluadas mediante citometría de flujo. Para el análisis estadístico, se ajustó un modelo mixto y para la comparación de las medias se realizó una prueba de Tukey. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Se estableció un nivel de significancia de  $p < 0,05$  para todos los análisis. La raza BON mostró mejores resultados ( $p < 0,05$ ) para

parámetros de calidad seminal como: motilidad progresiva; velocidad media, rectilínea, y curvilínea; amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, frecuencia de batida, linealidad, espermatozoides rápidas e integridad de membrana plasmática. A pesar, de que la raza Guzerá tuvo una menor fragmentación del ADN espermático, la raza BON tuvo mejores resultados en los espermatozoides viables protaminados (V/P) y un mayor potencial alto mitocondrial ( $p < 0,05$ ). Además, se encontró una correlación positiva y significativa ( $p < 0,05$ ). entre el esperma viable/protaminado con la movilidad total (0,42), la movilidad progresiva (0,33), los espermatozoides rápidos (0,40), la integridad de membrana plasmática (0,30), la vitalidad espermática (0,21), los espermatozoides vivos no capacitados (0,42) y el potencial de membrana mitocondrial alto (0,63). En conclusión, existe un efecto de la raza sobre la protaminación y la calidad del semen bovino congelado-descongelado.

**Palabras clave:** *bovino, raza, calidad seminal, protaminación, espermatozoides.*

## **Abstract**

To carry out the development of some biotechnologies in animal reproduction, the use of optimal quality semen is very important. For this, it is necessary to know the viability of the sperm, from its macrostructure until his microstructure, including a basic characteristic such as the integrity of the DNA. In the sperm, unlike somatic cells, DNA is bound to proteins called protamines, which allow it to have a greater degree of compaction. Any failure in protamine formation process (protamination), involves damage to the sperm, leading to DNA fragmentation, which in turn leads to reduced fertilization success. Therefore, the interest of this research was to evaluate the effect of breed on sperm protamination and its relationship with the quality of cryopreserved bovine sperm. For this, was used semen from ten bulls: five *Bos indicus* animals of Guzerá breed; and five Blanco Orejinegro (BON) bulls. Three ejaculates were collected from each bull with an interval of two months, using the electroejaculation method, obtaining a total of 30 ejaculates. Semen was

cryopreserved at a final concentration of 60 million sperm per mL in a Tris-based extender, using a rapid freezing protocol. Subsequently, at least 5 straws per ejaculate were thawed, and sperm motility and kinetics were evaluated through a computerized analysis with the Sperm Class Analyzer system (SCA®, Microptic, Spain); the integrity of the plasma membrane through the hyposmotic test; sperm vitality by fluorescence microscopy; sperm morphology using eosin negrosin staining; plasma membrane stability, mitochondrial activity, DNA integrity and sperm protamination were evaluated by flow cytometry. For statistical analysis, a mixed model was fitted and a Tukey test was performed to compare the means. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilks test. A significance level of  $p < 0,05$  was established for all analyses. BON breed showed better results ( $p < 0,05$ ) for seminal quality parameters such as: progressive motility, average path velocity, straight line velocity, curvilinear velocity, amplitude of lateral head displacement, beat cross frequency, linearity, fast spermatozoa and plasma membrane integrity. Although Guzerá breed had lower sperm DNA fragmentation, BON breed had better results in protamine viable spermatozoa (V/P) and a greater high mitochondrial potential ( $p < 0,05$ ) of sperm. Furthermore, a positive and significant correlation was found ( $p < 0,05$ ) between viable/protaminated sperm with total motility (0,42), progressive motility (0,33), fast spermatozoa (0,40), plasma membrane integrity (0,30), sperm vitality (0,21), live non-capacitated sperm (0,42) and high mitochondrial membrane potential (0.63). In conclusion, there is an effect of breed on protamination and quality of frozen-thawed bovine semen.

**Keywords:** *bovine, breed, seminal quality, protamine, sperm.*

## **Introducción**

Se prevé un aumento significativo de la población mundial, en más de 1.000 millones de personas para los próximos 15 años, alcanzando 8.500 millones de personas en 2030 (1), donde la demanda de alimentos hace que cada día la industria agropecuaria se preocupe más por ser eficientes al producir. El aumento

en la eficiencia productiva de la ganadería colombiana beneficia directamente a la población consumidora de carne y leche en el país, ya que se dispondría de una oferta de proteína de origen animal constante y de alta calidad. Especies como *Bos indicus*, *Bos taurus* y razas criollas, se han perfilado con un excelente potencial para la producción de leche y carne en Colombia, al manejar la rusticidad de la mano con la producción y poseer excelente capacidad de conversión alimenticia en ambientes hostiles (2).

El uso de las biotecnologías reproductivas en la especie bovina, se ha tornado en un instrumento común y asequible para los pequeños, medianos y grandes productores, en especial la inseminación artificial y la fecundación *in vitro* (FIV) (3). Al momento de realizar dichos procedimientos se necesitan espermatozoides de óptima calidad, que tengan la capacidad de fecundar la mayor cantidad de ovocitos disponibles (4). Estas tecnologías buscan intensificar y acelerar de forma importante el mejoramiento genético. Su uso, basado en una adecuada selección genética, permitiría obtener nuevos y mejores animales en un tiempo menor, aumentando la eficiencia reproductiva de los mismos

La criopreservación del semen y el uso de la inseminación artificial en los hatos ganaderos ha tenido un impacto positivo en la producción de animales y en la calidad de los mismos. A pesar de que la técnica de criopreservación ha sido la más avanzada dentro de todas las especies domésticas, aún quedan muchas incógnitas por resolver. La viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación aún es baja y difiere significativamente entre los toros reproductores. Estas limitaciones son un vacío importante por resolver, ya que podrían afectar el uso extensivo de las biotecnologías reproductivas (5). La congelación es un proceso crítico para los espermatozoides, donde experimentan diversos cambios estructurales como moleculares. A nivel molecular ocurren cambios en la cromatina, fragmentación del ADN, degradación del ARNm, variaciones epigenéticas y de la expresión génica, entre otros (5)(6). Por ejemplo, la integridad del ADN del

espermatozoide es reconocida como una característica de vital importancia para que se lleve a cabo el proceso de fertilización y desarrollo embrionario (7).

Durante la formación de los espermatozoides, suceden procesos que llevan a cambios radicales en la estructura de la cromatina hasta formar un espermatozoide maduro. En este proceso, las espermátidas se diferencian en espermatozoides y la mayoría de las histonas son reemplazadas por protaminas para proteger el genoma paterno, permitiendo un empaquetamiento del ADN hereditario y reducir el tamaño de su núcleo (8). Las protaminas funcionan como protector del material genético de los espermatozoides frente a factores endógenos o exógenos (nucleasas, radicales libres o mutágenos) y el transporte del ADN de los espermatozoides hacia el óvulo (9,10). Cualquier falla en este proceso implica el daño del espermatozoide, conllevando a la fragmentación del ADN que a su vez conduce a un menor éxito en los procesos de congelación (7).

Algunos estudios han demostrado que la deficiencia o la alteración en el proceso de protaminación espermática puede ser uno de los factores que contribuyan a la inestabilidad y daño del ADN, afectando la fertilidad del reproductor (11). Así mismo, el patrón de expresión de la protamina 1 o 2 puede llegar a tener un efecto negativo o positivo en la inseminación artificial como la producción de embriones *in vitro* con semen criopreservado (12). Para el conocimiento de los autores, no se han reportado casos que evalúen el efecto de la raza sobre los niveles de protaminación espermática, en los que se incluya razas bovinas criollas. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la raza sobre la protaminación espermática y su relación con la calidad de espermatozoides bovinos criopreservados.

## **Materiales y métodos**

### *Tipo de estudio*

El estudio tuvo un diseño observacional de tipo descriptivo prospectivo transversal.

### *Localización*

El material de investigación fue recolectado en el departamento de Antioquia (Colombia). Posteriormente las muestras se procesaron en los laboratorios de Biotecnología Animal, propiedad de la Universidad CES y el laboratorio de Reproducción Animal, de la estación Agraria San Pablo, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, ubicados en los municipios de Sabaneta y Rionegro, Antioquia, respectivamente. Los análisis de protaminación y citometría de flujo se realizaron en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia.

### *Material de investigación*

Se utilizaron 10 bovinos machos, distribuidos de la siguiente manera: cinco *Bos indicus*, de la raza Guzerá; y cinco bovinos de raza criolla (Blanco Orejinegro). Estos fueron sometidos a la recolección de tres eyaculados por animal, para un total de 30 eyaculados. Los animales estuvieron en condiciones apropiadas y estándar de alimentación, ambiente, manejo reproductivo, y condición corporal entre 3 y 4 (escala entre 1 y 5, siendo 1 extremadamente delgado y 5 extremadamente obeso). La recolección se realizó mediante el método de electroeyaculación con un ElectroJac5 (Neogen Corporation), después de haber realizado previamente la estimulación rectal de las glándulas accesorias. El semen recién recolectado fue mantenido a 37°C en un baño maría, y diluido en proporción 1:1 en un diluyente a base de Tris (2.42 g de Tris, 1.48 g de ácido cítrico, 1.00 g de fructosa, 6.4 ml de glicerol, 25 mg de gentamicina, 50 000 IU de penicilina) para ser transportado a una

temperatura de refrigeración ( $T^{\circ}$ ) en un equipo especializado (Equitainer<sup>®</sup>, Minitube) hasta el laboratorio.

### *Evaluación del semen bovino fresco*

A cada eyaculado recolectado se le realizó evaluaciones de volumen, concentración, movilidad, vitalidad, morfología, integridad de la membrana plasmática y protaminación. El volumen se midió utilizando una probeta graduada, la concentración del semen (millones de espermatozoides/mL) se determinó a partir de una gota de semen fresco, mediante un fotómetro Spermacue<sup>®</sup> (Minitube). Utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc.), se determinó la movilidad espermática promediando los porcentajes de movilidad progresiva de cinco campos diferentes de observación (400X). La morfología y la vitalidad espermática se evaluaron mediante el conteo de 200 espermatozoides teñidos por la técnica de eosina-nigrosina modificada (13,14). Sobre un portaobjetos temperado a 37°C en una platina térmica, depositando una gota de semen y a su lado una gota de colorante eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich 861006 y N4763) a 37°C. Ambas gotas se mezclaron durante 30 a 60 segundos, se realizó un extendido y la fijación de este con calor sobre una platina térmica. Se observó la morfología individual de 200 espermatozoides al microscopio (100X) y se clasificó como morfológicamente normales o anormales (15); al igual que se clasificaron como vivos aquellos espermatozoides que no incorporaron el colorante (espermatozoides blancos) y como muertos aquellos que sí lo hicieron (espermatozoides rosados) (16). Se establecieron porcentajes de espermatozoides normales (% de morfología normal), así como de espermatozoides vivos (% de vitalidad). De igual forma, se evaluó la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides por la metodología de la prueba hipoosmótica (HOS) (13), para la cual se tomaron 100  $\mu$ l de semen y se adicionaron a un tubo con 500  $\mu$ l de una solución hipoosmótica de sacarosa 5.4% (100 mOsmol/l). Esta mezcla fue incubada a 38.5°C por 30 minutos y luego se evaluó el hinchamiento espermático de 100 células en mínimo 5 campos diferentes (400X), utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200

(Nikon Inc.). Se determinó el porcentaje de células reaccionadas a partir de 100 espermatozoides contados. Como criterio de selección, solo se procesaron los eyaculados con parámetros mínimos de 70% de movilidad, 70% de vitalidad, 500 millones de espermatozoides por ml y 70% de espermatozoides morfológicamente normales, valores mínimos recomendados por la Sociedad internacional de Teriogenología (13).

La evaluación de la protaminación espermática se realizó mediante un protocolo estipulado (16), realizado con un citómetro de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter). Las muestras se lavaron con PBS y se diluyeron hasta alcanzar una concentración de  $60 \times 10^6$  células/mL. Se centrifugó 1 ml de cada muestra (a 200 g durante 5 minutos), posteriormente una parte de la muestra recibió la tinción de inmediato, mientras que la otra parte de la misma muestra se fijó con la solución de Carnoy durante 5 minutos a  $-4^\circ\text{C}$  y para luego ser teñida. Las muestras se centrifugaron y los sedimentos se tiñeron con 200  $\mu\text{L}$  de solución CMA3 a 0,25 mg / ml a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se evaluaron mediante citometría de flujo MoFlo XDP (Beckman Coulter). Utilizando un láser de argón con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La fluorescencia de los espermatozoides teñidos con Cromomicina A3 se reunieron en el detector de fluorescencia 2 (FL-2) con un filtro de paso de banda de 585/42 nm. Se examinaron un mínimo de 10000 espermatozoides para cada eyaculado y se analizaron utilizando el software WinMDI 2.9 (16). Se obtuvo un control positivo preincubando los espermatozoides con 200 mmol de ditioneitol, un agente reductor de disulfuro, a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos (15).

#### *Criopreservación de semen bovino*

La criopreservación del semen se realizó mediante un protocolo estipulado (17,18), en el que luego de ser diluido a una concentración de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL, el semen fue enfriado de  $37$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 hora y 30 minutos. Posteriormente, el semen fue empacado en pajillas de 0.5mL, mediante un equipo automático de

empaques y selladores de pajillas por ultrasonido (MRS1 Dual V2, IMV Technologies) mantenidas a una temperatura de 4°C durante 2 horas. Luego fueron llevadas a vapores de nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -140°C durante 15 minutos para finalmente ser sumergidas en un tanque de nitrógeno líquido (IMV Technologies) a una temperatura de -196°C para su almacenamiento. Se congelaron un mínimo de 10 pajillas por cada eyaculado.

#### *Evaluación de la calidad de semen bovino criopreservado*

Las pajillas se retiraron del nitrógeno líquido y se descongelaron en agua a 37 ° C durante 30 s. Posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros post-descongelación:

- *Evaluación de la movilidad y cinética espermática (CASA).* La movilidad y la cinética espermática de cada pajilla, fue evaluada mediante un análisis computarizado con el sistema Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptic, España) de acuerdo a un protocolo modificado del reportado por algunos autores (19), en cuanto a la configuración de especie bovino y área de la partícula entre 15 y 75  $\mu\text{m}^2$ . Se utilizó un microscopio de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon, Japón) con una cámara digital (Scout SCA780, Basler, EEUU). Se determinaron los parámetros de movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud (STR), linealidad (LIN), rápidos (RAP), amplitud lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida (BCF).
- *Evaluación de estabilidad de membrana.* Para la evaluación de la estabilidad de la membrana, se usó una combinación de las sondas fluorescentes Merocianina 540 (M540) / Yo-Pro-1 (Molecular Probes Inc). Se mezcló una gota de 10  $\mu\text{l}$  de semen descongelado con 2,7  $\mu\text{M}$  de M540 y 25 nM de Yo-Pro-1 (19). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 ° C en la

oscuridad y luego se evaluaron utilizando un citómetro de flujo (LSR Fortessa, BD Biosciences) en un rango de emisión entre 500 y 550 nm para Yo-Pro-1 y 580-620 nm para M540. Los datos de citometría de flujo se analizarán con el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, EE. UU.).

- *Evaluación de actividad mitocondrial.* El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M) de los espermatozoides se evaluaron con una versión adaptada del protocolo descrito por Zamzami et al. (1996) (21). Se usó un tubo de poliestireno para depositar yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6, Molecular Probes) en PBS a una concentración final de 80 nM y 7-aminoactinomicina D (7-AAD, Molecular Probes) a una concentración final de 2  $\mu$ g / ml. Los compuestos se pipetearon y luego se les añadió 10  $\mu$ l de semen. El volumen final de la reacción fue de 300  $\mu$ l. Posteriormente, para teñir las células para evaluar simultáneamente su viabilidad, se añadió una concentración final de 1 mg / ml de yoduro de propidio (PI) (Molecular Probes, EE. UU.). Las muestras se incubaron durante 30 minutos y se midió  $\Delta\Psi$ M utilizando citometría de flujo (LSRFortessa <sup>TM</sup>, BD Biosciences). Las muestras fueron excitadas usando un láser de fase sólida de 488 nm, y detectando fluorescencia de DiOC6 y 7-AAD a 530/30 nm y 630/30 nm, respectivamente. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, EE. UU.).
- *Evaluación de integridad ADN.* La fragmentación del ADN espermático se evaluó mediante tinción con PI, según lo descrito por Darzynkiewicz et al. (22). Las células se fijaron con 300 ml de etanol al 70% (Merck, Alemania) preparado en PBS (pH 7,4), durante 12 horas a 4 ° C. Las muestras se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4 °C) y los gránulos resultantes se lavaron dos veces más con 3,0 ml de PBS. Las células se tiñeron con PI 1 mg mL<sup>-1</sup> en PBS con EDTA 0.37% p / v y 0.01% v / v de Triton X-100 y 200 U mL<sup>-1</sup> de RNase A (SigmaAldrich). Después de 30 minutos de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, los datos se tomaron con un citómetro de

flujo (LSRFortessa, BD Biosciences). Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, EE. UU).

- *Protaminación espermática.* Esta prueba se realizó como se describió previamente para el semen diluido.

La evaluación de la vitalidad espermática y la integridad de la membrana plasmática pos-descongelación se realizó por las metodologías descritas previamente para el semen diluido.

### *Análisis estadístico*

Para la comparación de los diferentes parámetros de calidad y capacidad fecundante del semen bovino, por raza, se realizó una prueba ANOVA, la cual contará con gráficos de cajas y bigotes, para cada uno de los cruces de variables cuantitativas de acuerdo con la raza. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Para la comparación de las medias ajustadas entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey. Se utilizó un nivel de confianza del 95% y un valor  $p < 0,05$  para determinar significancia estadística. Todos los análisis serán desarrollados mediante el programa SAS 9.2.

### **Resultados**

Los resultados presentados en la Tabla 1, describen los valores obtenidos para cada una de las variables evaluadas, para el semen bovino fresco.

**Tabla 1.** Análisis de calidad del semen bovino fresco.

Variable	Media	Dev tip	Coefficiente de variación	Error estándar
MT	89,6	10,5	11,7	1,07
MP	72,7	18,3	25,2	1,8
VAP	57,3	16,5	28,8	1,6
VSL	39,5	14,6	37,1	1,4
VCL	101,6	28,3	27,9	2,8
ALH	4,7	1,2	26,4	0,1
BCF	11,8	6,8	57,4	0,6
STR	65,9	8,9	13,6	0,9
LIN	38,8	7,07	18,2	0,7
RAP	76,3	18,3	24,06	1,8
VE	85,6	13,9	16,2	1,4
MA	13,8	9,4	68,3	0,9
HOS	68,0	14,5	21,3	1,4
Frag. ADN	0,4	0,4	90,3	0,04
NV/P	18,1	15,6	86,4	1,6
NV/NP	3,4	2,0	59,6	0,2
V/NP	1,9	7,0	362,3	0,7
V/P	76,4	16,7	21,9	1,7

Movilidad total (%). MP: Movilidad progresiva ( $\mu\text{m/s}$ ). VAP: Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ). VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ). BCF: Frecuencia de batida (Hz). STR: Rectitud (%). LIN: Linealidad (%). RAP: Rápidos (%). VE: Vitalidad espermática (%). MA: Morfología anormal (%). HOS: Integridad de la membrana plasmática (%). Frag. ADN: Fragmentación de ADN (%). NV/P: No viables/protaminados (%). NV/NP: No viables/no protaminados (%). V/NP: Viables/no protaminados (%). V/P: Viables/protaminados (%).

Los resultados expuestos en la Tabla 2, denotan los valores obtenidos de cada una de las variables evaluadas, para el semen bovino descongelado. Respecto al efecto que tuvo la raza sobre la calidad espermática para el semen descongelado, se evidenció que la raza Blanco Orejinegro (BON) tuvo mejores resultados cuando es comparada con la raza Guzerá, **en términos de MP, RAP y HOS**; sin embargo, dicha raza presentó una menor tasa de espermatozoides anormales comparada con la BON **(Tabla 3)**.

**Tabla 2.** Análisis de calidad del semen bovino descongelado.

<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variación</b>	<b>Error estándar</b>
MT	32,2	16,4	51,1	1,5
MP	18,6	11,4	61,5	1,0
VAP	49	10,5	21,5	0,9
VSL	39,2	9,2	23,6	0,8
VCL	91,2	20,1	22,0	1,8
ALH	5,5	1,3	25,2	0,1
BCF	20,9	3,9	18,9	0,3
STR	80	4,9	6,1	0,4
LIN	44,7	5,1	11,5	0,4
RAP	24,3	14,7	60,7	1,3
VE	30,8	12,2	39,7	1,1
MA	15,6	9,4	60,1	0,8
HOS	19,8	8,3	42	0,7
Frag. ADN	0,9	1,1	120,5	0,1
NV/P	66,3	14,6	22,0	1,2
NV/NP	8,1	7,6	93,4	0,6
V/NP	0,2	0,2	90,3	0,02
V/P	25,2	11,5	45,5	0,9
$\Delta\Psi$ M Alto	20,2	10,5	52,0	0,9
$\Delta\Psi$ M Bajo	78,1	10,6	13,6	0,9
M/NCAP	1,2	1,6	129,1	0,1
M/CAP	58,4	14,1	24,1	1,2
V/CAP	24,6	12,4	50,5	1,0
V/NCAP	14,8	13,3	89,9	1,1

Movilidad total (%). MP: Movilidad progresiva ( $\mu\text{m/s}$ ). VAP: Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ). VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ). BCF: Frecuencia de batida (Hz). STR: Rectitud (%). LIN: Linealidad (%). RAP: Rápidos (%). VE: Vitalidad espermática (%). MA: Morfología anormal (%). HOS: Integridad de la membrana plasmática (%). Frag. ADN: Fragmentación de ADN (%). NV/P: No viables/protaminados (%). NV/NP: No viables/no protaminados (%). V/NP: Viables/no protaminados (%). V/P: Viables/protaminados (%).  $\Delta\Psi\text{M}$  Alto: Potencial mitocondrial alto (%).  $\Delta\Psi\text{M}$  Bajo: Potencial mitocondrial bajo (%). M/NCAP: Muertos/ no capacitados (%). M/CAP: Muertos/ capacitados (%). V/CAP: Viables/ capacitados (%). V/NCAP: Viables/ no capacitados (%).

**Tabla 3.** Efecto de la raza sobre la calidad del semen bovino criopreservado.

RAZA	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	RAP	VE	MA	HOS
<b>BON</b>	34,5	21,3	45,9	36,7	86,0	4,9	22,1	79,8	44,4	27,9	29,5	19,4	22,0
	$\pm 2,2^a$	$\pm 2,2^a$	$\pm 1,3^b$	$\pm 1,2^b$	4 $\pm 2,6^b$	$\pm 0,1^b$	$\pm 0,4^a$	$\pm 0,6^a$	$\pm 0,7^a$	$\pm 1,7^a$	$\pm 1,8^a$	$\pm 1,4^a$	$\pm 1,09^a$
<b>Guzerá</b>	30,6	16,7	51,2	40,9	95,0	5,9	20,0	80,2	45,0	21,8	31,7	12,5	18,3
	$\pm 2,0^a$	$\pm 1,4^b$	$\pm 1,2^a$	$\pm 1,1^a$	$\pm 2,4^a$	$\pm 0,1^a$	$\pm 0,5^b$	$\pm 0,6^a$	$\pm 0,6^a$	$\pm 1,8^b$	$\pm 1,4^a$	$\pm 0,8^b$	$\pm 1,0^b$

MT: Movilidad total (%). MP: Movilidad progresiva ( $\mu\text{m/s}$ ). VAP: Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ). VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ). BCF: Frecuencia de batida (Hz). STR: Rectitud (%). LIN: Linealidad (%). RAP: Rápidos (%). VE: Vitalidad espermática (%). MA: Morfología anormal (%). HOS: Integridad de la membrana plasmática (%).

Respecto al efecto que tuvo la raza sobre la protaminación, la integridad de ADN, la capacitación y la actividad mitocondrial para el semen descongelado, se evidencia que la raza BON tuvo mejores resultados en parámetros como espermatozoides no viables y viables protaminados, cuando es comparada con la raza Guzerá. No obstante, la raza Guzerá presentó una menor tasa de espermatozoides con ADN fragmentado, no viables, no protaminados y muertos no capacitados, cuando es comparada con la raza BON (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto de la raza sobre la protaminación, la integridad de ADN, la capacitación y la actividad mitocondrial de los espermatozoides bovinos criopreservados.

Raza	Frag. ADN	NV/P	NV/NP	V/NP	V/P	$\Delta\Psi$ M Alto	$\Delta\Psi$ M Bajo	M/NCA P	M/CAP	V/CAP	V/N CAP
<b>BON</b>	1,3 $\pm 0,1^a$	58,3 $\pm 2,0^b$	10,4 $\pm 1,2^a$	0,3 $\pm 0,03^a$	30,8 $\pm 1,6^a$	25,1 $\pm 1,3^a$	73,4 $\pm 1,3^b$	1,5 $\pm 0,2^a$	54,3 $\pm 2,0^b$	25,7 $\pm 1,5^a$	16,7 $\pm 1,9^a$
<b>Guzerá</b>	0,6 $\pm 0,06^b$	73,7 $\pm 0,8^a$	5,9 $\pm 0,3^b$	0,2 $\pm 0,02^a$	20,0 $\pm 0,7^b$	15,7 $\pm 0,9^b$	82,4 $\pm 0,9^a$	0,9 $\pm 0,1^b$	62,3 $\pm 1,2^a$	23,5 $\pm 1,5^a$	13,1 $\pm 1,3^a$

Frag. ADN: Fragmentación de ADN (%). NV/P: No viables/protaminados (%). NV/NP: No viables/no protaminados (%). V/NP: Viables/no protaminados (%). V/P: Viables/protaminados (%).  $\Delta\Psi$ M Alto: Potencial mitocondrial alto (%).  $\Delta\Psi$ M Bajo: Potencial mitocondrial bajo (%). M/NCA P: Muertos/ no capacitados (%). M/CAP: Muertos/ capacitados (%). V/CAP: Viables/ capacitados (%). V/NCAP: Viables/ no capacitados (%).

Con relación a los datos expuestos en la tabla 5, los espermatozoides V/P presentaron mayor población de  $\Delta\Psi$ M Alto por lo que se deduce que hubo una mayor tasa de actividad mitocondrial. Además, hubo correlación positiva entre la fragmentación de su ADN, y aquellos y vivos no capacitados.

**Tabla 5.** Análisis de correlación entre la protaminación, la actividad mitocondrial y la capacitación de espermatozoides bovinos criopresevados.

	FRAG. ADN	$\Delta\Psi$ M Alto	$\Delta\Psi$ M Bajo	M/NCAP	M/CAP	V/CAP	V/NCAP
<b>NV/P</b>	-0,30 0,0004	-0,45 <,0001	0,46 <,0001	-0,20 0,01	0,47 <,0001	-0,06 0,46	-0,30 0,0004
<b>NV/NP</b>	0,31 0,0002	-0,10 0,21	0,12 0,15	-0,13 0,11	-0,04 0,58	-0,12 0,15	-0,07 0,36
<b>V/NP</b>	0,18 0,03	0,30 0,0003	-0,29 0,0006	0,08 0,32	-0,35 <,0001	0,10 0,21	0,24 0,003
<b>V/P</b>	0,17 0,04	0,63 <,0001	-0,65 <,0001	0,34 <,0001	-0,57 <,0001	0,15 0,06	0,42 <,0001

Frag. ADN: Fragmentación de ADN (%).  $\Delta\Psi$ M Alto: Potencial mitocondrial alto (%).  $\Delta\Psi$ M Bajo: Potencial mitocondrial bajo (%). M/NCAP: Muertos/ no capacitados (%). M/CAP: Muertos/ capacitados (%). V/CAP: Viables/ capacitados (%). V/NCAP: Viables/ no capacitados (%).

**Tabla 6.** Análisis de correlación entre la protaminación y la calidad del semen bovino criopreservado.

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	RAP	VE	MA	HOS
<b>NV/P</b>	-0,30 0,001	-0,21 0,02	0,32 0,00 05	0,37 <,000 1	-0,33 0,000 3	0,21 0,02	-0,05 0,58	0,29 0,00 2	0,12 0,20	-0,30 0,001	-0,13 0,15	-0,22 0,01	-0,18 0,04
<b>NV/ NP</b>	0,003 0,97	-0,03 0,71	- 0,28 0,00 2	-0,31 0,000 8	-0,31 0,000 7	-0,17 0,06	-0,04 0,61	-0,20 0,03	-0,05 0,54	0,01 0,86	-0,02 0,78	0,05 0,54	0,04 7 0,62
<b>V/NP</b>	0,23 0,01	0,21 0,02	- 0,15 0,10	-0,19 0,03	-0,08 0,37	-0,08 0,36	0,06 0,49	-0,21 0,02	-0,21 0,02	0,27 0,003	-0,03 0,71	0,16 0,08	0,15 0,10
<b>V/P</b>	0,42 <,0001	0,33 0,0004	- 0,21 0,02	-0,26 0,005	-0,21 0,02	-0,15 0,10	0,11 0,24	-0,23 0,01	-0,11 0,22	0,40 <,0001	0,21 0,02	0,28 0,00 2	0,30 0,00 1

MT: Movilidad total (%). MP: Movilidad progresiva ( $\mu\text{m/s}$ ). VAP: Velocidad media ( $\mu\text{m/s}$ ). VSL: Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ). ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ). BCF: Frecuencia de batida (Hz). STR: Rectitud (%). LIN: Linealidad (%). RAP: Rápidos (%). VE: Vitalidad espermática (%). MA: Morfología anormal (%). HOS: Integridad de la membrana plasmática (%).

## Discusión

Dentro de las biotecnologías reproductivas en animales, la criopreservación de semen bovino es una de las técnicas más utilizadas y distribuida a nivel mundial en la industria ganadera, siendo la congelación un método agresivo al cual se enfrentan los espermatozoides. Este procedimiento no induce a defectos ultraestructurales, no obstante, si puede reducir la movilidad, viabilidad y aumentar las anomalías de los mismos. Los daños más evidentes se encuentran en la estructura de la membrana plasmática, donde se pueden originar membranas hinchadas y alteradas después de la etapa de congelación-descongelación. También se puede evidenciar daño acrosómico, mitocondrial, y a nivel molecular pueden ocurrir cambios en la cromatina, fragmentación del ADN, degradación del ARNm, variaciones epigenéticas y de la expresión génica, entre otros, después del proceso de congelación. (5,6,7).

El ADN espermático está organizado de forma diferente al de las células somáticas. Allí éste se encuentra unido a una serie de proteínas llamadas histonas, mientras que en el espermatozoide hay un proceso de remodelación y compactación. Esta remodelación inicia en el núcleo con el remplazo de las histonas, en primer lugar, por variantes de histonas específicas del testículo, luego estas son reemplazadas por proteínas de transición y posteriormente ocurre la incorporación de las protaminas (10). La finalidad de las protaminas es proteger el material genético del espermatozoide frente a factores endógenos o exógenos (nucleasas, radicales libres o mutágenos) y el transporte del ADN de los espermatozoides hacia el óvulo (23, 24). Cualquier falla en el proceso de protaminación implica el daño del espermatozoide, conllevando a la fragmentación del ADN, que a su vez conduce a un menor éxito en la fertilización (25). Por ejemplo, en humanos la fragmentación del ADN espermático se ha consolidado como un biomarcador interesante para mejorar el análisis del semen, ya que ha sido un factor estrechamente relacionado con indicadores de salud reproductiva masculina (26).

La raza Blanco Orejinegro es perteneciente a la especie *BosTaurus*. siendo una raza antigua, con grandes atributos en su rusticidad productividad y fertilidad. Las hembras criollas obtienen un mayor porcentaje de natalidad, una menor edad al primer servicio y parto (27). En el presente estudio se encontró que la raza BON presentó mejores resultados en cuanto a la calidad y cinética espermática (MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN, RAP, MA, HOS) en semen descongelado cuando fue comparado con la raza Guzerá (*Bos indicus*) (Tabla 3). Estudios señalan características positivas para la cinética espermática en machos de razas criollas, resaltando la importancia de esto en el proceso de fertilización (28)(29). Además, la producción de espermatozoides maduros en machos cebuinos generalmente ocurre de manera tardía (12 y 20 meses) en comparación con los animales taurinos (6 y 9 meses de edad) (30).

En cuanto a la protaminación espermática se evidenció que hubo un mayor porcentaje de espermatozoides protaminados en la raza BON, sin embargo, esto no

se vio reflejado en la fragmentación del ADN, donde la raza Guzerá presentó valores inferiores cuando fue comparado. Por lo anterior, se puede inferir que el ADN espermático puede fragmentarse independientemente de la presencia o no de espermias protaminados. Un conjunto de factores extrínsecos e intrínsecos pueden causar la fragmentación del ADN del esperma, incluido el estrés oxidativo, la apoptosis abortiva, las deficiencias en la recombinación, la edad, la manipulación del semen, el estrés térmico, las vacunas y las infecciones bacterianas (31). La época del año puede también afectar la integridad de la cromatina espermática; en toros taurinos, por ejemplo, el semen colectado en primavera y verano presentó mayor nivel de fragmentación del ADN que el colectado en otoño e invierno (32). En bovinos machos de la raza Nelore, se ha usado la tinción con cromomicina A3 en semen congelado-descongelado para detectar la deficiencia de protaminación espermática, determinándose que la infertilidad en los toros puede no estar relacionada directamente con la deficiencia de protaminación (33).

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M) alto fue mayor para los espermatozoides de la raza BON demostrando una relación con los valores encontrados sobre la calidad del semen bovino criopreservado. En equinos hay estudios que demuestran la relación entre la actividad mitocondrial y su influencia en la movilidad espermática (34). Asimismo, el  $\Delta\Psi$ M alto fue mayor en los espermatozoides viables/protaminados (V/P), además de que estos tuvieron relación directa con los espermatozoides viables/no capacitados (V/NCAP), pudiéndose inferir que esta población no se capacitó prematuramente. Según lo reportado por Giaccagli y Gómez (35), señalan que existe una fuerte asociación entre la alta actividad mitocondrial y la movilidad en espermatozoides capacitados.

Se presentó una relación inversa entre la fragmentación del ADN y el  $\Delta\Psi$ M Bajo con el semen no viable/protaminado (NV/P) (Tabla 5); del mismo modo, los NV/P presentaron una relación negativa con MT, MP, RAP, MA y HOS (Tabla 6). En humanos se observó que había correlación entre espermatozoides de baja o nula

actividad mitocondrial con la fragmentación de su ADN, donde los hombres obesos fueron quienes presentaron un mayor porcentaje (36).

Los espermatozoides viables/protaminados (V/P) mostraron una correlación positiva con algunas variables de cinética y viabilidad espermática como: MT, MP, RAP, VE, y HOS (Tabla 6). Se ha demostrado que la deficiencia de protamina se correlaciona con parámetros disminuidos del espermatozoide, incluyendo concentración, motilidad y morfología (37,38,39). Otra hipótesis que respalda la relación entre las protaminas y la calidad del semen es que la transcripción y/o traducción de protaminas puede actuar como punto de control durante la espermatogénesis, con la espermatogénesis directamente asociada a la cantidad relativa de protamina, afectando la fertilidad del reproductor, en la que cualquier alteración en esta proporción se asocia con fragmentación del ADN, mala fertilización y reducción de la tasa de concepción (11, 38, 39). Lo anterior respalda lo encontrado en el presente estudio, donde el espermatozoide viable/no protaminado (V/NP) presentó una correlación positiva y significativa con la fragmentación de su ADN.

## **Conclusión**

Se concluye que existe un efecto de la raza sobre la protaminación y la calidad del semen bovino congelado- descongelado, siendo la raza Blanco Orejinegro (BON) la que mostró una mayor población de espermatozoides viables/protaminados al compararse con la raza Guzerá.

Este estudio puede ser una base para futuras investigaciones centradas en la evaluación de la protaminación espermática en machos bovinos taurinos y cebuinos, así como en razas criollas o autóctonas, como rasgo fundamental para la integridad del ADN espermático y la utilización de semen bovino descongelado en el desarrollo de biotecnologías reproductivas.

## Referencias

1. Organización de las Naciones Unidas. Población. Consultado 2021 Nov 22. Disponible en: (<http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>)
2. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Raça guzerá é um dos atrativos da ExpoZebu 2006. Consultado 2021 Nov 22. Disponible en: (<http://www.abcz.org.br/Home/Conteudo/18738-Raca-guzera-e-um-dos-atrativos-da-ExpoZebu-2006>)
3. Federación Colombiana de Ganaderos. Cifras de referencia del sector ganadero colombiano. Consultado 2021 Nov 22. Disponible en: (<https://estadisticas.fedegan.org.co>)
4. Michelmann HW. Minimal criteria of sperm quality for insemination and IVF therapy. Int J Androl [Internet]. 1995 [citado el 13 de noviembre de 2023];18 (Suppl 2): 81-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8719866/>
5. Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, et al. Advances in cryopreservation of bull sperm. Front Vet Sci [Internet]. 2019 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 6 (268): 1-15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31552277>
6. Chen X, Wang Y, Zhu H, Hao H, Zhao X, Qin T, et al. Comparative transcript profiling of gene expression of fresh and frozen–thawed bull sperm. Theriogenology [Internet]. 2015 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 83 (4): 504–11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25459024>.
7. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. Int J Vet Sci Med [Internet]. 2018 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 6 (sup1): S49–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
8. Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. Reprod Domest Ruminants [Internet]. 2007 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 6 (1): 315–26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17491156>
9. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in Vitro1. Biol Reprod [Internet]. 2001 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 64 (5): 1375–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11319141/>

10. Pusch HH. The Importance of Sperm Motility for the Fertilization of Human Oocytes in vivo and in vitro. *Andrologia* [Internet]. 2009 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 19 (5): 514–27. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3425955/>
11. Fortes MRS, Satake N, Corbet DH, Corbet NJ, Burns BM, Moore SS, et al. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. *Andrology* [Internet]. 2014 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 2 (3): 370–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24634207/>
12. Zilles K, Schleicher A, Kretschmann H-J. A quantitative approach to cytoarchitectonics: II. The allocortex of *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol (Berl)* [Internet]. 1978 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 154 (3): 335–52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/101095/>
13. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* [Internet]. 1999 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 51 (4): 721–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10728997/>
14. Páez E, Corredor E. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *CIENCIA Y AGRICULTURA* [Internet]. 2014 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 11 (2): 49-59. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/300088635\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_apitud\\_reproductiva\\_del\\_toro](https://www.researchgate.net/publication/300088635_Evaluacion_de_la_apitud_reproductiva_del_toro)
15. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* [Internet]. 2005 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 64 (3): 492–504. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15946734/>
16. Tavalae M, Kiani A, Arbabian M, Deemeh MR, Nasr Esfahani MH. Flow cytometry: A new approach for indirect assessment of sperm protamine deficiency. *Int J Fertil Steril* [Internet]. 2010 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 3 (4): 177–84. Disponible en: [https://www.ijfs.ir/article\\_45796.html](https://www.ijfs.ir/article_45796.html)
17. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* [Internet]. 2004 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 61 (5): 895–907. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14757475/>
18. Hu J-H, Jiang Z-L, Lv R-K, Li Q-W, Zhang S-S, Zan L-S, et al. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* [Internet]. 2011 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 62 (1): 83–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21199643/>

19. Restrepo G, Ocampo D, Velásquez A. Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase. Rev Udca Actual Divulg Cient [Internet]. 2013 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 16 (2): 445–50. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262013000200019](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262013000200019)
20. Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. Anim Reprod Sci [Internet]. 2003 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 76 (3–4): 205–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12586493/>
21. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. J Exp Med [Internet]. 1996 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 183 (4): 1533–44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8666911/>
22. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry [Internet]. 1992 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 13 (8): 795–808. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1333943/>
23. Kutchy NA, Menezes ESB, Ugur MR, UI Husna A, ElDebaky H, Evans HC, et al. Sperm cellular and nuclear dynamics associated with bull fertility. Anim Reprod Sci [Internet]. 2019 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 211 (106203): 106203. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31785643/>
24. García Robles R, Ayala Ramírez PA, Perdomo Velásquez B. SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. Rev Cienc Salud [Internet]. 2012 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 10 (1): 59–71. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-72732012000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732012000100006)
25. Nanassy L, Liu L, Griffin J, T. Carrell D. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. Protein Pept Lett [Internet]. 2011 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 18 (8): 772–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21443494/>
26. Garcia-Segura S. The importance of incorporating sperm DNA fragmentation testing in male infertility diagnostic routine. Transl Androl Urol [Internet]. 2022 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 11 (10): 1371–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21037/tau-22-572>

27. López A, Saldarriaga OA, Arango AE, Rugeles MT, Zuluaga FN, Oliveira M, et al. Ganado Blanco Orejinegro (BON): Una alternativa para la producción en Colombia. *Rev Col Cienc Pec* [Internet]. 2001 [citado el 13 de noviembre de 2023 Nov]; 14(2): 121-128 Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323758/20780945>
28. Palmieri R, Suárez D, Espitia A, González M, Prieto E. Variables seminales en toros criollos colombianos con cuernos costeños y romosiniano. *Rev MVZ Córdoba* [Internet]. 2004 [citado el 13 de noviembre de 2023 Nov. 23]; 9 (1): 381-385. Disponible en: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/506>
29. Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2000 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 60–61: 663–77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10844233/>
30. Pérez Osorio J, Chacón Jaramillo L, Otero Arroyo RJ, Cardona Álvarez J, Andrade Souza F. Relationship between scrotal circumference, testicular growth and semen quality parameters in guzerat breed bulls, from puberty to 36 months of age. *Rev Med Vet* [Internet]. 2014 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 1(27): 73–87. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-93542014000100007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-93542014000100007)
31. Narud B, Khezri A, Zeremichael TT, Stenseth E-B, Heringstad B, Johannisson A, et al. Sperm chromatin integrity and DNA methylation in Norwegian Red bulls of contrasting fertility. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2021 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 88 (3): 187–200. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33634579/>
32. Karoui S, Díaz C, González-Marín C, Amenabar ME, Serrano M, Ugarte E, et al. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility?1. *J Anim Sci* [Internet]. 2012 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 90 (8): 2437–49. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367070/>
33. Simões R, Feitosa WB, Mendes CM, Marques MG, Nicacio AC, de Barros FRO, et al. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotech Histochem* [Internet]. 2009 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 84 (3): 79–83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19306222/>
34. Nesci S, Spinaci M, Galeati G, Nerozzi C, Pagliarani A, Algieri C, et al. Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology* [Internet]. 2020 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 144: 82–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31927418/>

35. Giaccagli MM, Gómez-Elías MD, Herzfeld JD, Marín-Briggiler CI, Cuasnicú PS, Cohen DJ, et al. Capacitation-induced mitochondrial activity is required for sperm fertilizing ability in mice by modulating hyperactivation. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 9 (767161): 1-13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34765607>
36. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* [Internet]. 2012 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 110 (6): 863–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22300410/>
37. Zandemami M, Qujeq D, Akhondi MM, Kamali K, Raygani M, Lakpour N, et al. Correlation of CMA3 staining with sperm quality and protamine deficiency. *Lab Med* [Internet]. 2012 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 43 (6): 262–7. Disponible en: <https://academic.oup.com/labmed/article/43/6/262/2657700>
38. Olivia R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* [Internet]. 2006,12 [citado el 13 de noviembre de 2023]; 12(4): 417-435. Disponible en: <https://academic.oup.com/humupd/article/12/4/417/2182165>
39. Kumaresan A, Das Gupta M, Datta TK, Morrell JM. Sperm DNA integrity and male fertility in farm animals: A review. *Front Vet Sci* [Internet]. 2020 [citado el 13 de noviembre de 2023];7 (321): 1-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>