

Evaluación de la fragmentación de ADN de espermatozoides de caprino, utilizando protocolos con naranja de acridina

Evaluation of DNA Fragmentation in Goat Spermatozoa Using Acridine Orange Protocols

Avaliação da fragmentação de DNA em espermatozoides de cabra usando protocolos de laranja de acridina

Enrique de Jesús Hernández-Carrillo¹
Alberto Jorge Cárdenas Padilla²
Alicia Alcantar Rodríguez³
José Alfredo Medrano Hernández⁴

Recibido: 12 de marzo de 2025

Aprobado: 21 de mayo de 2025

Publicado: 1 de octubre de 2025

Cómo citar este artículo:

Hernández-Carrillo EJ, Cárdenas Padilla AJ, Alcantar Rodríguez A, Medrano Hernández JA. Evaluación de la fragmentación de ADN de espermatozoides de caprino, utilizando protocolos con naranja de acridina. *Spei Domus*. 2025;21(1): 1-12.
doi: <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2025.01.02>

Artículo de investigación. <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2025.01.02>

¹ Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Extensión Pichucalco, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, México. Col. Napana, C.P. 29520, Pichucalco, Chiapas.

Correo electrónico: enrique.cariilo@unach.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9699-2600>

² Maestro en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8750-8399>

³ Maestra en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5535-0800>

⁴ Doctor of Philosophy. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2265-6890>



Resumen

En las unidades de producción caprinas es fundamental evaluar la fertilidad del macho, pues de esta depende, en gran medida, la tasa de concepción de las hembras. Los parámetros más comunes que se evalúan en la calidad seminal no reflejan el daño en el ADN espermático. Existen diferentes causas que pueden provocar un daño irreversible en el ADN del gameto masculino, que ocurren durante la espermatogénesis o en el transporte a través del tracto reproductivo. El naranjado de acridina (N.A.) representa una alternativa simple de evaluar fragmentación del ADN, por lo que su estandarización para el uso en espermatozoides de caprino permitirá su uso de forma rutinaria. Para la investigación se utilizaron siete caprinos de la raza Saanen, colectando sus eyaculados con vagina artificial y evaluando un total de *pools*. El análisis inicial de la calidad espermática incluyó las siguientes características microscópicas: motilidad masal, la motilidad progresiva, la viabilidad y la morfología espermática. Para evaluar la fragmentación en el ADN, se utilizaron dos metodologías para la inducción del daño: i) NaOH, y ii) luz ultravioleta, en comparación semen fresco diluido. Los protocolos evaluados correspondieron a distintas concentraciones de N.A.: 1) 100 µg/ml, 2) 200 µg/ml, 3) 500 µg/ml, 4) 1000 µg/ml y 5) 2000 µg/ml. Para evaluar el efecto de los protocolos se utilizó el PROC GLM en SAS University. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los protocolos evaluados. Sin embargo, en las concentraciones mayores de 500 µg/ml, se logró registrar en el semen fresco espermatozoides con fragmentación del ADN. En conclusión, el N.A. para evaluar el ADN podría usado a una concentración de 500 µg/ml para la evaluación de calidad espermática.

Palabras clave: Caprinos, calidad seminal, ADN, naranja de acridina.

Abstract

In caprine production systems, evaluation of male fertility is critical to determine female conception rates. However, conventional semen quality parameters fail to reflect sperm DNA integrity. Irreversible DNA damage in gametes may occur during spermatogenesis or transit through the reproductive tract. Acridine orange (AO) staining provides a cost-effective method to assess DNA fragmentation. Seven Saanen bucks were included in this study. Ejaculates were collected via artificial vagina, and pooled semen samples were analyzed. Semen parameters included mass motility (MM), progressive motility (PM), viability (V), and sperm morphology. DNA damage was quantified using two positive controls (NaOH exposure and UV irradiation) and one negative control (fresh semen). Five AO concentrations were tested: 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, and 2000 µg/ml. Statistical analysis was performed using the PROC GLM procedure in SAS® University Edition. No significant differences were observed among protocols ($p > 0.05$). However, AO concentrations ≥ 500 µg/ml induced detectable DNA damage in fresh semen spermatozoa. These results suggest that AO staining at 500 µg/ml is optimal for evaluating sperm DNA damage during routine semen quality assessments in caprines.

Keywords: Caprine, semen analysis, DNA fragmentation, acridine orange, sperm quality.

Resumo

Em unidades de produção de caprinos, a avaliação da fertilidade masculina é essencial, pois determina em grande parte a taxa de concepção das fêmeas. Os parâmetros mais comumente avaliados para a qualidade do sêmen não refletem danos ao DNA do espermatozoide. Diferentes causas podem causar danos irreversíveis ao DNA do gameta masculino, ocorrendo durante a espermatogênese ou durante o transporte pelo trato reprodutivo. O laranja de acridina (A.O.) representa uma alternativa simples para avaliar a fragmentação do DNA, portanto, sua padronização para uso com espermatozoides caprinos permitirá seu uso rotineiro. Sete cabras Saanen foram utilizadas para o estudo. Seus ejaculados foram coletados por meio de vagina artificial

e um total de pools foi avaliado. A análise inicial da qualidade do sêmen incluiu as seguintes características microscópicas: motilidade da massa, motilidade progressiva, viabilidade e morfologia espermática. Para avaliar a fragmentação do DNA, foram utilizadas duas metodologias indutoras de danos: i) NaOH e ii) luz ultravioleta, em comparação com sêmen fresco diluído. Os protocolos avaliados corresponderam a diferentes concentrações de NA: 1) 100 µg/ml, 2) 200 µg/ml, 3) 500 µg/ml, 4) 1000 µg/ml e 5) 2000 µg/ml. O PROC GLM da Universidade SAS foi usado para avaliar o efeito dos protocolos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos avaliados. No entanto, em concentrações superiores a 500 µg/ml, espermatozoides com fragmentação de DNA foram registrados no sêmen fresco. Em conclusão, o NA para avaliação de DNA pode ser usado em uma concentração de 500 µg/ml para avaliação da qualidade do esperma.

Palavras-chave: Cabras, qualidade do sêmen, DNA, laranja de acridina.

Introducción

La evaluación de la calidad seminal en los animales domésticos ayuda a establecer la fertilidad del macho y es fundamental para asegurar una buena fertilidad en los sistemas pecuarios, aunque los parámetros de rutina utilizados para evaluar el semen no reflejan la calidad del ADN espermático [1].

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético requerido para la fecundación, el desarrollo del embrión, el correcto desarrollo fetal y posnatal [2]. La fragmentación de ADN espermático es aquel estado donde el ADN sufre roturas tanto de cadena simple como doble de grado variable a consecuencia de factores intrínsecos (apoptosis, defectos de empaquetamiento de la cromatina, deficiencias en la recombinación genética, el estrés oxidativo por causa de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno) [3] y extrínsecos (cambios de temperatura, infecciones, medicamentos, procesamiento de semen para biotecnologías reproductivas, etc.) [4] que ocurren durante el proceso de la espermatogénesis, en el transporte a través del tracto reproductivo o en el procesamiento del semen.

Existen diversas técnicas de laboratorio que permiten cuantificar el nivel de daño en el ADN espermático [5]. El ensayo de naranja de acridina (N.A.) se desarrolló como una alternativa simple de evaluar la fragmentación del ADN espermático por microscopía de fluorescencia [6]. Esta prueba se ha usado para evaluar la calidad espermática previa y posteriormente a la crio preservación en bovinos [7,8], equinos [9], aves [10] y porcinos [11]. Para la especie caprina se desconoce su aplicación y su previa estandarización.

La fragmentación del ADN en espermatozoides impacta sobre el grado de éxito que tendrá un programa de reproducción con respecto a la fertilización y desarrollo embrionario [12]. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estandarizar el uso

de N.A. por medio de la comparación de distintas concentraciones, para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de caprinos.

Materiales y métodos

Localización del objeto de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Comportamiento Animal de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación (UMI) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Selección y descripción de los participantes

En esta investigación se utilizaron siete sementales caprinos de la raza Saanen (de entre 2 y 3 años) con fertilidad probada, alojados en los corrales de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los machos fueron mantenidos con una dieta compuesta por 70 % de alfalfa y 30 % de un concentrado a base de maíz, sorgo y sales minerales, con acceso a agua *ad libitum*. La colecta de semen se realizó a razón de dos veces por semana de manera rutinaria para cada macho cabrío desde al menos un mes previo al inicio de esta investigación.

Información técnica

Colecta seminal

Los eyaculados fueron colectados con vagina artificial (42-45 °C). Después, fueron mezclados para ser utilizados en forma de *pool*, buscando eliminar el efecto individuo en este protocolo, y utilizando para el desarrollo del trabajo un total de 10 *pools*. Cada *pool* se diluyó 1:1 (v/v) con una solución transporte (Tris 250mM, dextrosa 28 mM, y ácido cítrico 104 mM) y fue colocada en baño termostático a 35 °C para mantener su viabilidad hasta su evaluación.

Preparación de las soluciones stock de naranja de acridina

Para la comparación de las diferentes concentraciones de N.A. se prepararon cinco soluciones stock, utilizando 1) 100 µg/ml, 2) 200 µg/ml, 3) 500 µg/ml, 4) 1000µg/ml, 5) 2000 µg/ml de N.A. diluidos en agua desionizada. Después, se realizó una solución

de tinción, que la conformó 2.5 ml de solución stock, 10 ml de ácido cítrico (0.19213 M) y 0.625 ml de NaHpo₄-7H₂O (0.0804 M) [13].

Variables evaluadas

Motilidad masal

Para evaluar la motilidad masal (M.M.), se colocó una alícuota de 10 µl de semen diluido 1:1 en solución de transporte en un portaobjetos atemperado a 37°C, observándolo en un microscopio de contraste de fases con 100 aumentos, y asignando un valor subjetivo en una escala de 0 a 3 [14].

Motilidad progresiva

Para evaluar la motilidad progresiva (M.P.) se realizó una dilución del semen (1:100, v/v) en solución salina fisiológica (0.9 % NaCl), colocando dicha muestra en baño termostático a 35 °C. Una alícuota 10 µl de la dilución se colocó en un portaobjetos atemperado a 37 °C, colocando un cubreobjetos para su observación en un microscopio de contraste de fases a 200 aumentos. Se asignó un valor subjetivo dado en porcentaje (escala de 0 a 100%) dependiendo de la visualización de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo [15].

Viabilidad espermática

La técnica consistió en colocar en un portaobjetos atemperado a 37°C una alícuota de 10 µl de la tinción eosina-nigrosina y 10 µl de la dilución 1:100, mezclando ambas gotas y realizando un frotis secando al aire. La viabilidad se evaluó a 400 aumentos, contando 200 espermatozoides. Los espermatozoides vivos se observan blancos (membrana plasmática intacta), mientras que los espermatozoides muertos se observan rosas (daño en la membrana) [16].

Morfología espermática

Fue utilizado el mismo frotis preparado previamente para evaluar la viabilidad. La morfología se evaluó a 1000 aumentos, contando 200 espermatozoides y categorizándolos en espermatozoides normales y con morfoanomalías [14].

Fragmentación de ADN

El daño inducido en el ADN se evaluó con la prueba N.A., en donde el ADN íntegro (de doble cadena) se observa con una fluorescencia verde, mientras que el ADN dañado (de cadena sencilla) se observa con una fluorescencia naranja-roja. Para evaluar la fragmentación de ADN en espermatozoides se utilizó una muestra de semen fresco como control, y se comparó a su vez con dos distintas metodologías utilizadas en la inducción de daño al ADN: i) mezcla 1:1 de semen diluido con hidróxido de sodio (NaOH), y ii) exposición a luz ultravioleta (UV)] y un control negativo (semén fresco) [1].

Para la primera técnica de inducción de daño al ADN se utilizó una solución de NaOH (0.6 M), realizando una dilución 1:1 (v:v) con la dilución 1:100 de semen en solución salina fisiológica y obteniendo una concentración final de NaOH de 0.3M. La mezcla se mantuvo por 30 minutos y posteriormente se realizaron frotis con 10 µl en portaobjetos atemperados a 37°C y secados al aire. Para la segunda técnica de inducción de daño al ADN se realizaron frotis con 10 µl de la dilución 1:100 secados al aire, siendo expuestos a luz UV durante toda la noche (12 h). Para el control negativo fueron preparados frotis con 10 µl de la dilución 1:100 secados al aire. Todos los frotis preparados fueron fijados por una noche con una solución Carnoy's (3:1; metanol:ácido acético glacial) antes de realizar la tinción fluorescente con N.A.

Sobre cada frotis se aplicó 1 ml de la solución de la tinción correspondiente por 10 minutos, posteriormente se enjuagó con agua destilada y se secaron por 5 minutos cubriéndolos de la luz en todo momento. Para el montaje final, se colocaron 10 µl de una solución antidecoloración para preservación de fluorescencia (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano/DABCO) sobre el portaobjetos (para mantener la fluorescencia) y un cubreobjetos para su evaluación inmediata utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DMLS). Se contabilizaron 100 espermatozoides a 1000 aumentos, donde los espermatozoides con núcleo teñido de color verde presentan el ADN íntegro y los espermatozoides con núcleo teñido de color naranja/rojo presentan fragmentación en el ADN.

Estadística

Para el análisis de los resultados se evaluó el efecto de las concentraciones de N.A. (100, 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml) en el semen fresco. Utilizando un análisis de varianza (Tukey al 0.05) con el PROC GLM en el software SAS *University*.

Resultados y discusión

En la evaluación de las características generales de los *pools* se puede observar que los promedios de cada variable son similares a los parámetros registrados por Rangel [17] quien registró los siguientes valores en machos cabríos encastados con Alpino: M.M.: 2.83 %, M.P.:85.83 %, V: 85.11 % y espermatozoides normales: 80.97 %. De igual forma, son similares al rango establecido para la especie caprina por Delgadillo et al. [18], obteniendo los siguientes valores: M.M.: 1.53-2.92 %, M.P.:56-88 %, V: 73-95 % y espermatozoides normales: 70-85 %.

Tabla 1. Promedio general de las características evaluadas en los pools preparados a partir de eyaculados colectados de caprino.

Motilidad Masal (0 - 3)	Motilidad Progresiva (%)	Viabilidad (%)	Morfología normal (%)
2.2 ± 0.24	81.5 ± 5.3	70.6 ± 7.3	82.5 ± 5.7

La evaluación de la fragmentación de ADN puede parecer poco importante y no es considerada en las metodologías utilizadas para evaluar la calidad seminal en las diferentes especies de animales domésticos. Ribeiro et al. [19] considera que puede haber una relación entre la integridad del ADN y otras funciones espermáticas, como la motilidad espermática y la capacidad de fecundar. El desarrollo embrionario inicial depende de la integridad del ADN espermático [20]. Lo que hace necesario la estandarización de la técnica de N.A. para espermatozoides de caprinos.

Si bien este ensayo se utiliza en varias especies según el protocolo descrito por Tejada et al. [13]. Hasta donde sabemos, este es el primer informe sobre la estandarización de la técnica de N.A. para espermatozoides de caprinos en semen fresco.

En el cuadro 2, se observa el promedio del daño en el ADN obtenido para los diferentes controles, utilizando las concentraciones: 1) 100 µg/ml, 2) 200 µg/ml, 3) 500 µg/ml, 4) 1000 µg/ml, 5) 2000 µg/ml de N.A para cada solución stock. No fueron observadas diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones y el semen fresco.

Tabla 2. Promedio de fragmentación de ADN en espermatozoides con y sin inducción de daño, evaluados con diferentes concentraciones de N.A. en la solución stock.

	Concentración de N.A. ($\mu\text{g/ml}$)				
	100	200	500	1000	2000
	Fragmentación de ADN (%)				
Semen fresco	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.3 \pm 0.21	0.6 \pm 0.40	0.2 \pm 0.20
	Protocolos de inducción de daño al ADN				
NaOH	96.2 \pm 2.09	98.5 \pm 1.07	99.7 \pm 0.21	99.5 \pm 0.34	97.8 \pm 1.77
Luz UV	94.8 \pm 3.67	99.5 \pm 0.50	98.9 \pm 0.64	96.9 \pm 1.32	98.1 \pm 1.27

Nota: Los valores son promedios \pm error estándar de la media.

Algunos autores han propuesto la existencia de un umbral de daño de ADN espermático por encima del cual la gestación y el desarrollo embrionario se impiden. En espermatozoides de toro, se ha visto que medidas del índice de fragmentación por encima del 20%, están asociadas con tasas de fertilidad bajas [21,22], destacando que nuestra investigación utilizando semen de caprino se encuentra por debajo de este porcentaje. Y dentro del rango considerado normal en otros rumiantes, que está en torno de 2 a 5% de fragmentación [23]. Otros reportes de investigaciones han descrito resultados similares a lo observado en la presente investigación. Ribeiro et al. [19] encontraron un 99.2% \pm 0.9 de espermatozoides con ADN integro en eyaculados frescos de bovinos.

Evaluando la efectividad de la visualización de espermatozoides con ADN fragmentado en diferentes concentraciones de N.A. podemos destacar que en esta investigación se encontraron espermatozoides con estas características en las concentraciones de 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Ahmad et al. [24], quienes realizaron una optimización de la técnica de N.A. para espermatozoides de búfalo, y encontraron que las concentraciones más altas (500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) tiñeron mejor el ADN fragmentado que las concentraciones menores (1, 2 y 200 $\mu\text{g/ml}$) en las soluciones stock.

Si bien Evenson [25] menciona que la técnica de N.A. para evaluar el daño al ADN tiende a dificultarse por la adsorción del vidrio del portaobjetos y el rápido desvanecimiento de la fluorescencia bajo un microscopio con luz blanca y de fluorescencia, en el presente trabajo se logró mantener un buen desempeño con latécnica, pudiendo categorizar fácilmente a los espermatozoides con daño en el ADN y con ADN integro (Figura 1). De igual manera, una de las ventajas que tiene es que es un método relativamente rápido de realizar, aunque no es un ensayo de bajo costo, debido a lo que implica el uso de un microscopio de fluorescencia.

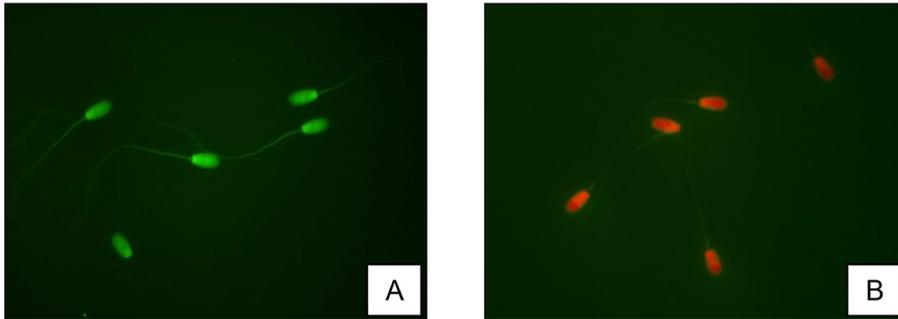


Figura 1. Espermatozoides de caprinos teñidos con la técnica de N.A. para la evaluación de la fragmentación de ADN. A) Espermatozoides obtenidos de semen fresco (ADN verde); B) Espermatozoides con daño al ADN inducido mediante luz UV.

Fuente: fotografías adquiridas en el Laboratorio de Reproducción Animal, UIM, FES-C, UNAM.

Conclusiones

En conclusión, la técnica de N.A. utilizada para evaluar el daño en el ADN en espermatozoides caprinos es factible. Aunque no fueron observadas diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones empleadas en el desarrollo de la presente investigación, el uso de una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ en la solución *stock* mejora la visualización de espermatozoides con ADN fragmentado durante la evaluación de la calidad seminal en fresco. El uso del N.A. podría ser aplicado como parte de las amplias técnicas empleadas en la evaluación microscópica de semen caprino durante el proceso de crioconservación.

Agradecimientos

Proyecto realizado con el apoyo PAPIIT (IN205421) y Cátedra FESC (CI2214). Los autores agradecen a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Caprino de Registro A.C. y a Caprinocultores Unidos de Guanajuato A.C. por proveer los animales utilizados en esta investigación.

Referencias

- [1] Carretero M, Giuliano M & Neild D. Evaluación de la calidad del ADN espermático en Camélidos Sudamericanos y otras especies domésticas. SPERMOVA. 2017; 7(1):18-26. Disponible en: <https://bit.ly/4mu7MQA>

- [2] Rodríguez E. Fragmentación de ADN en espermatozoides epididimarios de Vicugna pacos “ALPACA” mediante el test de dispersión de la cromatina y su potencial impacto en el desarrollo embrionario temprano. [Tesis de pregrado], Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2022; 44 p.
- [3] Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, & Baldi E. Sperm ADN Fragmentation: Mechanisms of Origin. En E. Baldi & M. Muratori (Eds.), Genetic Damage in Human Spermatozoa (Vol. 1166, pp. 75-85). Springer International Publishing. 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_5
- [4] González-Marín C, Gosálvez J, & Roy R. Types, Causes, Detection and Repair of ADN Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2012; 13(12). <https://doi.org/10.3390/ijms13111402>
- [5] Salinas NS. Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el espermatozoide bovino. [Trabajo final de Ingeniería] Universidad Católica Argentina. 2014; 35 p.
- [6] Portella RJ & Gonzales GF. Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. Ginecol. Obstet. Mex. 2016; 84(7): 462-473. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2016/gom167i.pdf>
- [7] Rubio GJL. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros Holstein, Brahmán y sus mestizos, Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción e Industria animal, Maracaibo, Edo Zulia. 2008; 103 p.
- [8] Papa PM, Maziero RD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell’Aqua CP, Papa FO & Dell’Aqua JA. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. Theriogenology. 2014; 83 (1):107-113. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.009>
- [9] Mosqueira PTJ. Evaluación de los efectos de diluyentes de congelación de semen sobre la capacidad de unión de espermatozoides equinos a zona pelúcida de ovocitos bovinos”, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencia Animal. 2012; 27 p.
- [10] Senan VP, Sherief PM & Nair JR. Cytotoxic effect of ink extracts of cuttlefish and squid on chick embryo fibroblasts. Int J Phar Sci Res. 2013; 4: 1893-1896. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(5\).1893-96](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(5).1893-96)
- [11] González VD. Evaluación de los parámetros morfométricos de los espermatozoides como herramienta para determinar la calidad seminal de machos porcinos, Universidad del Zulia,

- Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción e Industria Animal. 2008; 67-68 p.
- [12] Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B & Gadella BM. ADN damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 2006. 27. Disponible en: <http://dx.doi.org/176-88.10.2164/jandrol.04152>
- [13] Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984;42:87-91.
- [14] Ax RL, Hawkins HE, DeNise SK, Holm TR, & Zhang HM. New developments in managing the bull. In: Fields MJ, Sand RS, Yelich JV, editors. *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. Florida: CRC Press LLC; 2002. p. 287-295.
- [15] Mellisho, SE. *Manual de inseminación artificial en ganado ovino*. Lima; UNALM; 2004. 57 p.
- [16] Rodríguez FA, Ávila CC, Anchondo AG, Sánchez BR. & Jiménez JC. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Rev. Agrocien.* 2008. 42(4): 399-406. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n4/v42n4a2.pdf>
- [17] Rangel AA. Validación de una prueba de estrés osmótico en espermatozoidescaprinos para simular el estrés del proceso congelado-descongelado. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México, México. 2010; 44 p.
- [18] Delgadillo JA, Leboeuf B & Chemineau P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small ruminant research*. 1992; 9:47-59. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0921-4488(92)90055-9)
- [19] Ribeiro PA, Munita BL, Yumi KM, Mello MMI & Ferreira de Souza F. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch. Med. Vet.* 2014; 46. 31-38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- [20] Rodrigues-Martinez H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. *Resúmenes del Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia, Brasil*. 2005.
- [21] Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl.* 1988;9:109-115.

- [22] Karabinus DS, Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Kaproth MT. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci.* 1990;73:2364– 2371.
- [23] Garner DL, LA Johnson, ST Yue, BL Roth, RP Haungland. 1994. Dual ADN staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 15, 620-629.
- [24] Ahmad M, Ahmed M. & Ahmad N. Optimización de la tinción con naranja de acridina para esperma de búfalo, criopreservado en extensor basado en yema de huevo para detectar fragmentación de ADN. *Revista de zoología de Pakistán.* 2017; 49(5):1547-1936. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.5.sc6>
- [25] Evenson PD. The sperm chromatin structure Assay (SCSA®) and other sperm ADN fragmentation test for evaluation of sperm nuclear ADN integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science.* 2016; 169:56-75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>