

ESPERMATOZOIDES CON CROMATINA DAÑADA E INMADURA EN SEMEN CRIOPRESERVADO DE TOROS BRAHMAN

Sperm with damaged and immature chromatin in cryopreserved semen from Brahman bulls

Héctor Nava-Trujillo^{1,2}, Armando Quintero-Moreno^{2,3*}, Adirno Hernández-Fernández⁴ y Carla Osorio-Meléndez²

¹Fundo La Rosita, El Guayabo, Edo. Zulia, Venezuela; ²Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela; ³Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela; ⁴Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR), Santa Bárbara, Edo Zulia, Venezuela; *Correo electrónico: armando.quintero@fcv.luz.edu.ve

RESUMEN

El propósito de este estudio fue cuantificar la presencia de espermatozoides con cromatina dañada e inmadura en el semen criopreservado de toros Brahman. Para ello, frotis de tres eyaculados de cinco toros fueron teñidos con azul de toluidina (AT) y azul de anilina (AN) para evaluar integridad y la inmadurez de la cromatina, respectivamente. Los espermatozoides teñidos con AT fueron considerados espermatozoides con cromatina normal (teñidos de azul claro) o con cromatina dañada (teñidos de azul oscuro o violeta), mientras que los teñidos con AN fueron clasificados como maduros (no teñidos) o inmaduros (teñidos de azul). El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada fue de $7,0 \pm 3,71$; rango entre 3 y 17,5%. Se observaron efectos del toro y el eyaculado sobre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada ($P < 0,05$). El porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura fue de $0,9 \pm 1,29\%$ (rango de 0 a 2,5%). No se observaron efectos del toro o el eyaculado; no obstante, solo siete de los eyaculados presentaron espermatozoides con cromatina inmadura. No se observó una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada y el de espermatozoides con cromatina inmadura ($r = -0,05$; $P = 0,77$). En conclusión, el semen criopreservado de toros Brahman contiene bajos porcentajes de espermatozoides con cromatina dañada y de espermatozoides con cromatina inmadura. Adicionalmente, este estudio demuestra que las tinciones de azul de toluidina y azul de anilina evalúan diferentes características de la cromatina.

Palabras clave: Cromatina espermática; azul de toluidina; inmadurez espermática; azul de anilina; toro.

ABSTRACT

The purpose of this study was to quantify the presence of sperm with damaged and immature chromatin in cryopreserved semen from Brahman bulls. In order to achieve that goal, smears of three ejaculates from five Brahman bulls were stained with toluidine blue (AT) and aniline blue (AN) to evaluate integrity and immaturity of chromatin, respectively. Sperm stained with AT were classified as having normal chromatin (stained light blue) or damaged chromatin (stained dark blue or violet); while sperm stained with AN were classified as mature sperm (unstained) or immature sperms (stained blue). Percentage of sperm with damaged chromatin was $7.0 \pm 3.71\%$, with a range from 3 to 17.5%. Bull and ejaculate effects were observed on the percentage of sperm with damaged chromatin ($P < 0.05$). Percentage of immature chromatin was $0.9 \pm 1.29\%$ (from 0 to 2.5%). No effects of bull or ejaculate were observed, and only seven ejaculates presented sperm with immature chromatin. No correlation was observed between damaged and immature chromatin ($r = -0.05$, $P = 0.77$). In conclusion, Brahman bull semen contains low percentages of sperm with damaged and immature chromatin. Additionally, this study demonstrates that toluidine blue and aniline blue stains evaluate different chromatin characteristics.

Key words: Sperm chromatin; toluidine blue; sperm immaturity; aniline blue; bull.

INTRODUCCIÓN

La calidad espermática (CE) es un aspecto importante para alcanzar una óptima eficiencia reproductiva tanto en los rebaños como en los sistemas de producción *in vitro* de embriones, ya que es conocido que un espermatozoide con alteración de su integridad morfológica y que sea capaz de fecundar un óvulo podría afectar el desarrollo embrionario temprano [11, 18].

Tradicionalmente en Venezuela, los centros de criopreservación de semen de toros (*Bos taurus/ Bos indicus*) monitorean la calidad seminal mediante la evaluación de parámetros individuales, como la concentración y la motilidad espermática, y los que hacen pruebas complementarias realizan, con menor periodicidad, la evaluación de la viabilidad espermática, las anomalías morfológicas y la integridad acrosómica [27]. Sin embargo, varios son los parámetros que se pueden utilizar, ya sea de forma individual o simultánea, para estimar la CE y el potencial reproductivo de los toros [2, 16].

Actualmente, la integridad de la cromatina espermática (ICE) ha cobrado relevancia ya que en un eyaculado es posible encontrar espermatozoides vivos, motiles y con morfología normal que transportan cromatina dañada [1, 12, 26, 27], los cuales no pierden la capacidad fecundante, pero si comprometen el desarrollo embrionario subsiguiente [1, 15]. La ICE ha sido asociada con el potencial reproductivo y varios estudios han reportado una correlación negativa entre el daño a la cromatina y otros parámetros de calidad como la viabilidad y la motilidad, así como con la fertilidad [14, 23, 25, 27, 32]. Varios son los factores asociados con daño en la cromatina; entre éstos se ha reportado que la criopreservación aumenta el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina [22, 25, 32]. Durante la espermatogénesis, el ADN espermático se encuentra inicialmente dispuesto en forma de nucleosomas, al estar unido al igual que el ADN de las células somáticas a unas proteínas llamadas histonas, las cuales serán posteriormente reemplazadas casi en su totalidad por las protaminas que son las encargadas de dar la compactación característica al núcleo espermático [28]. Cuando esta sustitución de histonas por protaminas falla, se genera una persistencia excesiva de histonas, lo que resulta en inmadurez de la cromatina espermática [28]. Las histonas han sido poco estudiadas en los espermatozoides de animales de interés zootécnico. Sin embargo, algunos estudios han demostrado una relación entre la inmadurez de la cromatina y el potencial reproductivo de toros [9, 22, 31], aunque estos hallazgos no son concluyentes debido al bajo porcentaje de espermatozoides inmaduros observado en los eyaculados estudiados [25].

La ICE puede ser evaluada mediante técnicas reconocidas [7], muchas de las cuales resultan laboriosas y costosas, lo que limita la adopción de forma rutinaria de esta evaluación en los laboratorios. Una alternativa la representa la tinción con azul de toluidina (AT), un colorante nuclear básico utilizado para la coloración metacromática de la cromatina al unirse a los grupos fosfatos libres del ADN, y esta propiedad es útil para

evaluar anomalías en la ICE [24]. En espermatozoides con cromatina normal, la mayoría de los fosfatos están bloqueados por las protaminas y por tanto, pocas moléculas del colorante se unen al ADN, lo que resulta en una coloración que varía de azul a verde claro, mientras que en los espermatozoides con cromatina dañada y en consecuencia mayor número de sitios de unión para el colorante, el color resultante de la tinción varía de azul oscuro a morado [4, 5, 24]. Adicionalmente se ha reportado que los espermatozoides teñidos de azul oscuro por la AT, corresponden con los espermatozoides con ADN fragmentado, identificados a través del Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA) o por el test de TUNEL (*Terminal dUTP Nick End-Labeling*) y que adicionalmente la AT es una técnica eficaz en la identificación de espermatozoides con alteraciones en la cromatina [13].

En el caso de la inmadurez de la cromatina espermática, el uso de la tinción de azul de anilina (AN) permite la identificación de los espermatozoides con histonas persistentes, dado que estas proteínas son ricas en lisina, aminoácido que tiene una alta afinidad por el colorante; así, los espermatozoides inmaduros se teñirán de azul, mientras que los espermatozoides con cromatina madura, es decir, en los que las histonas han sido correctamente sustituidas por protaminas, permanecerán incoloros [19].

Pocos son los estudios reportando información acerca de la calidad de la cromatina (integridad y madurez a la vez) en toros *Bos indicus* y menos aún en toros de la raza Brahman, grupo genético que se ha venido utilizando con gran frecuencia para la mejora genética de los rebaños venezolanos, tanto de carne como doble propósito, por lo que es aún necesaria mucha investigación en esta área. Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue determinar conjuntamente los porcentajes de espermatozoides con cromatina dañada y de espermatozoides con cromatina inmadura en semen criopreservado de toros Brahman (*Bos indicus*), así como también determinar la relación entre estos dos parámetros de calidad espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección y procesamiento del semen

El semen criopreservado se obtuvo de un centro especializado en la producción de semen de toro (VIATECA®), ubicado en la población de la Villa del Rosario, municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela. Mientras que las evaluaciones a la descongelación se realizaron en el laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. Para la realización del experimento se utilizó semen congelado de tres eyaculados de cinco toros de raza Brahman (*Bos indicus*), con edades comprendidas entre 5 y 8 años. El diluyente de congelación estaba constituido por leche descremada (83%), yema de huevo (8%), glicerol (8%), fructosa (1%), lincospectina (4 mL), penicilina (1.000.000 UI) y estreptomomicina (1 g). El semen se almacenó en pajuelas de 0,5 mL con una concentración de 30×10^6 espermatozoides motiles.

Determinación de la integridad de la cromatina

El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada se determinó mediante la coloración con AT [6]. Las pajuelas de semen se descongelaron en baño María (Gemmy® modelo YCW-03S, Taipei, Taiwán) a 37°C por 30 segundos, una vez descongeladas se procedió a realizar tres frotis por pajuela, los cuales se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 1 minuto (min) y etanol al 70% por 3 min. Luego, cada frotis se hidrolizó por 25 min en una solución de ácido clorhídrico a una concentración de 4 N, se lavó en agua destilada y se secó al aire. Para realizar la tinción se agregó sobre el frotis una gota de 30 µL del colorante (AT a 0,025% en buffer McIlvaine a pH 4) y se colocó un cubreobjetos. Los frotis se observaron con un microscopio de campo claro (Olympus BX41TF, Tokio, Japón) con un aumento de 400X y se evaluaron al menos 200 células por frotis, las cuales se clasificaron como espermatozoides con cromatina normal, aquellos teñidos de color azul claro; mientras que los teñidos de color azul oscuro o violeta, se consideraron como células con cromatina dañada [6]; además, las células con cromatina dañada generalmente tienen una apariencia granular fina, lo que facilita su identificación [3]. Se evaluaron dos frotis por eyaculado.

Determinación de la inmadurez de la cromatina

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides inmaduros se utilizó la tinción de AN [8]. Los frotis se fijaban por 10 min en metanol absoluto y luego eran sumergidos por 3 min

en una solución de AN al 5% disuelta en ácido acético al 4%. Los frotis se observaron con un microscopio de campo claro a un aumento de 400X y se evaluaron al menos 200 células por frotis. Los espermatozoides no teñidos se clasificaron como maduros, mientras que los teñidos de color azul oscuro se consideraron inmaduros [8]. Se evaluaron dos frotis por eyaculado.

Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS [30]. Los porcentajes de espermatozoides con cromatina dañada e inmaduros, así como los efectos del toro y del eyaculado sobre éstos, se analizaron con el modelo lineal general de análisis de varianza (procedimiento GLM), luego de la transformación de los datos a través del método del arcoseno cuadrado. Todos los valores se presentan como medias corregidas \pm desviación estándar. La relación entre el daño a la cromatina y la inmadurez espermática se estableció con la prueba de Spearman, calculado a través del PROC CORR, también con el uso del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada fue de $7,00 \pm 3,71\%$ y estuvo afectado por el toro ($P=0,0004$), el eyaculado ($P=0,0004$) y la interacción entre estas dos variables ($P=0,0003$). El porcentaje más bajo observado fue para el eyaculado 2 del toro 2 con un 3% y el valor más alto fue para el eyaculado 1 igualmente del toro 2 con un 17,5% (TABLA I).

TABLA I
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS CON CROMATINA DAÑADA EN SEMEN CRIOPRESERVADO DE TOROS BRAHMAN

Eyaculado	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Toro 4	Toro 5
1	$4,00 \pm 0,00^a$	$17,50 \pm 0,70^a$	$8,50 \pm 2,12^a$	$7,00 \pm 1,41^a$	$8,50 \pm 2,12^a$
2	$4,50 \pm 0,70^a$	$3,00 \pm 0,00^b$	$10,00 \pm 2,82^a$	$4,50 \pm 0,70^a$	$4,50 \pm 2,12^{a,b}$
3	$5,50 \pm 0,70^a$	$9,50 \pm 0,70^c$	$6,50 \pm 3,53^b$	$6,00 \pm 1,41^a$	$5,50 \pm 0,70^b$
Promedio	$4,66^A$	$10,00^B$	$8,33^B$	$5,83^A$	$6,16^A$

Valores con letras diferentes, difieren. $P < 0,05$. Letras minúsculas implican comparación dentro del mismo toro; letras mayúsculas implican comparación entre toros.

El porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura promedió un $0,9 \pm 1,29\%$, este parámetro no estuvo afectado ni por el toro ni por el eyaculado ($P > 0,05$); tres de los cinco toros evaluados tuvieron un valor por debajo del 1%, seis de los quince eyaculados evaluados no presentaron espermatozoides con

cromatina inmadura y el valor más alto encontrado fue de 2,50% para el eyaculado 1 del toro 5 (TABLA II). No se observó una correlación significativa entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada y el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura ($r = -0,05$; $P = 0,7757$).

TABLA II
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON CROMATINA INMADURA EN SEMEN CRIOPRESERVADO DE TOROS BRAHMAN

Eyaculado	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Toro 4	Toro 5
1	2,00 ± 1,41	0	2,00 ± 2,82	0	2,50 ± 2,12
2	0	1,00 ± 0,00	2,00 ± 1,41	0	0,50 ± 0,70
3	0	0	1,50 ± 2,12	1,00 ± 1,41	1,00 ± 1,41
Promedio	0,66	0,33	1,83	0,33	1,33

El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada observado en el presente estudio ($7,00 \pm 3,71\%$) fue superior al reportado previamente también para toros Brahman utilizando igualmente la tinción con AT [27]. Estos trabajos son de los pocos que reportan para semen criopreservado de toros Brahman, el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina utilizando la tinción con AT, la cual si ha sido empleada para el estudio de la cromatina espermática en semen criopreservado de toros de otras razas [4, 6, 24, 33]. En semen de toros Nelore, se ha reportado un $3,15 \pm 1,74\%$ de espermatozoides con cromatina dañada [33]. Varios estudios han reportado correlaciones negativas entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada y otros parámetros de calidad espermática como motilidad e integridad de la membrana plasmática, así como también con el potencial reproductivo de toros [20, 21, 25, 27, 32], lo cual sugiere que el estudio de la ICE podría incorporarse en la evaluación rutinaria de la calidad seminal.

El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada reportado en el presente estudio fue menor al observado en otros estudios para toros con una calidad seminal cuestionable [10, 25]. En animales utilizados para la producción comercial de semen se observan bajos porcentajes de daño a la cromatina espermática, debido a que son animales seleccionados, relativamente jóvenes y mantenidos bajo condiciones libres de estrés [17]. En el caso del semen congelado de toro, este bajo porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina parece reflejar una crio-resistencia de la cromatina espermática propia de la especie [29]. Sin embargo, algunos estudios han reportado un efecto negativo de la criopreservación sobre la ICE [22, 25, 32].

En animales de interés zootécnico, la inmadurez de la cromatina ha sido poco estudiada y los porcentajes de espermatozoides con cromatina inmadura observados son bajos [25]. En el presente estudio, el porcentaje de espermatozoides teñidos con AN fue de

$0,9 \pm 1,29\%$. Khalifa y col. [22] reportaron un promedio de $11,22\%$ y al igual que en el presente estudio, no se observó un efecto del toro o el eyaculado sobre este parámetro. Al parecer, un incremento en el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura podría estar relacionado con un defecto genético, con un incremento de la frecuencia de recolección del semen o con algunas patologías como criptorquidismo o varicocele [12, 25].

La retención excesiva de histonas podría estar relacionada con una menor CE, incluyendo una mayor susceptibilidad de la cromatina al daño por la criopreservación y el estrés oxidativo [25]. El porcentaje de espermatozoides teñidos con AN se ha correlacionado negativamente con el porcentaje de espermatozoides vivos y positivamente con el porcentaje de anomalías de la cabeza y con la presencia de gota citoplasmática [22]. Además, se han reportado casos de toros con un alto porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura y baja fertilidad [31]. Altos porcentajes de espermatozoides teñidos positivamente con AN podrían afectar la eficiencia reproductiva. De esta manera, se ha observado que toros con baja fertilidad presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con cromatina inmadura ($1,73 \pm 0,55\%$) que toros de alta fertilidad ($0,67 \pm 0,17\%$, $P < 0,0001$) y el porcentaje de espermatozoides teñidos positivamente con AN se correlacionó negativamente ($r = -0,90$, $P < 0,001$) con la fertilidad de los toros [8]. Estos hallazgos sugieren la necesidad de incorporar la evaluación de la madurez de la cromatina en la evaluación rutinaria de la calidad espermática y en la determinación de los factores que afectan el potencial reproductivo de los toros.

En la actualidad se cuentan con diferentes técnicas para evaluar la ICE; sin embargo, es difícil establecer relaciones entre ellas, dado que estas técnicas aplican principios diferentes y evalúan diferentes aspectos de la cromatina espermática. Khalifa y col. [22] observaron una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura y el porcentaje de

espermatozoides con cromatina dañada evaluada con la tinción de naranja de acridina. Resultados similares fueron observados por Mukhopadhyay y col. [25] pero utilizando la técnica "Ensayo cometa" para evaluar la integridad de la cromatina. En el presente estudio los espermatozoides fueron teñidos con AT y AN y no se observó una correlación significativa entre los porcentajes de espermatozoides respondiendo positivamente para cada una de estas tinciones, lo que sugiere que estas técnicas evalúan diferentes características de la cromatina.

CONCLUSIONES

El semen criopreservado de los toros Brahman evaluados en este experimento contiene bajo porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada, simultáneamente con bajo porcentaje de cromatina inmadura; sin embargo, estos dos parámetros de calidad espermática no se relacionaron estadísticamente, sugiriendo que la tinción de AT y de AN valoran de manera independientemente estas características de la ICE. Adicionalmente, dada la fácil realización de estas técnicas de tinción, el estudio tanto de la ICE como de la inmadurez de la cromatina espermática podrían incorporarse a la evaluación rutinaria del semen a fin de mejorar la estimación de la calidad espermática y el potencial reproductivo de los toros.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES, proyecto CC-0436-11) y al Fundo La Rosita (El Guayabo, Edo. Zulia, Venezuela) por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACEVEDO, N. **Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine**. Virginia State University. Grade Thesis. 84 pp. 2001.
- [2] AL NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenol.** 76(1): 161-167. 2011.
- [3] BARTH, A.D.; OKO, R.J. Defects of sperm head. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press. 285 pp. 1989.
- [4] BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Braz. J. Gen.** 19(1): 97-103. 1996.
- [5] BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenol.** 62: 398-402. 2004.
- [6] BELETTI, M.E.; COSTA, L.; MENDES, M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morphol. Sci.** 22(2): 85-90. 2005.
- [7] CORTES-GUTIÉRREZ, E.L.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J.L.; GONSÁLVEZ, J. Evaluación del daño en el DNA espermático. **Actas Urol. Esp.** 31(2): 120-131. 2007.
- [8] DADOUNE, J.P.; MAYAUX, M.J.; GUIHARD-MOSCATO, M.L. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. **Androl.** 20: 211-217. 1988.
- [9] DE OLIVEIRA, R.V.; DOGAN, S.; BELSER, L.E.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A.; THIBAUDEAU, G.; MEMILI, E. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. **Reprod.** 146: 263-272. 2013.
- [10] DOBRINSKI, I.; HUGHES, H.P.; BARTH, A.D. Flow cytometer and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **J. Reprod. Fertil.** 101: 531-538. 1994.
- [11] EID, L.N.; LORTON, S.P.; PARRISH, J.J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biol. Reprod.** 51: 1232-1237. 1994.
- [12] ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenol.** 76: 23-32. 2011.
- [13] ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I.; ERENPREISA, J.; SPANO, M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flowcytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. **Human Reprod.** 19(10): 2277-2282. 2004.
- [14] EVENSON, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to non-compensable sperm nuclear defects. **Reprod. Fertil. Dev.** 11: 1-15. 1999.
- [15] FATEHI, A.N.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J. Androl.** 27(2): 176-188. 2006.
- [16] GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Anim. Reprod. Sci.** 103: 201-214. 2008.
- [17] GOSÁLVEZ, J.; FERNÁNDEZ, J.L.; GOYANES, V.; LOPEZ-FERNÁNDEZ, C. Análisis de la fragmentación del DNA en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). **Biotech Magazine.** Septiembre-Octubre: 24-37. 2006.
- [18] HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **J. Anim. Sci.** 80: E33-E44. 2002.
- [19] HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit

- as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Androl.** 27: 275-279. 1995.
- [20] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenol.** 55: 947-961. 2001.
- [21] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenol.** 60: 743-758. 2003.
- [22] KHALIFA, T.A.A.; REKKAS, C.A.; LYMBEROPOULOS, A.G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, T. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 104: 143-163. 2008.
- [23] KAROUI, S.; DÍAZ, C.; GONZÁLEZ-MARÍN, C.; AMENABAR, M.E.; SERRANO, M.; UGARTE, E.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CARABAÑO, M.J. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? **J. Anim. Sci.** 90(8): 2437-2449. 2012.
- [24] MELLO, M.S.L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochem.** 74: 387-392. 1982.
- [25] MUKHOPADHYAY, C.S.; GUPTA, A.K.; YADAV, B.R.; CHAUHAN, I.S.; GUPTA, A.; MOHANTY, T.K.; RAINA, V.S. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Livestock Sci.** 136 (2): 114-121. 2011.
- [26] NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XXII (3): 211-216. 2012.
- [27] NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; FINOL-PARRA, G.; VILCHEZ-SIU, V.; OSORIO-MELENDEZ, C.; RUBIO-GUILLEN, J.; VALERIS-CHACIN, R. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 24: 116-122. 2011.
- [28] OLIVA, R. Protamines and male fertility. **Hum. Reprod. Update.** 12(4):417-435. 2006.
- [29] SLOWÍNSKA, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. **Cryobiol.** 56: 100-102. 2008.
- [30] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). **SAS/STAT User's Guide. Version 8.2.** Cary, NC. 2001.
- [31] VIEYTES, A.L.; CISALE, H.O.; FERRARI, M.R. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. **Vet. Rec.** 163: 625-629. 2008.
- [32] WATERHOUSE, K.E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D.P.; DE ANGELIS, P.M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian red bulls. **Reprod. Fertil. Dev.** 18: 781-788. 2006.
- [33] ZÚCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A.; SCALDEAL, P.R.R.; RODOVALHO, N.C.M.; ZANENGA, C.A.; KIEFER, C.; SILVA, E.V. Seleção em gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 9(2): 358-366. 2008.