

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS Y OTRAS ESPECIES DOMÉSTICAS

Evaluation of Sperm DNA quality in South American camelids and other domestic species

María Ignacia Carretero ^{1,3}, María Susana Giuliano ², Deborah Margarita Neild ¹

Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias
Veterinarias, Instituto de
Investigación y Tecnología en
Reproducción Animal.

¹ Cátedra de Teriogenología,

² Cátedra de Física Biológica.

³ Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET).

E-mail address:

ignaciacarretero@fvvet.uba.ar;

ignaciacarretero@gmail.com

RESUMEN

Las anomalías en el material genético pueden expresarse por defectos en la maduración o condensación nuclear, rupturas del ADN y anomalías cromosómicas. Los parámetros de rutina utilizados para evaluar el semen (movilidad espermática, concentración, viabilidad, funcionalidad de membranas y morfología) no reflejan la calidad del ADN espermático. Esto cobra importancia para las técnicas de reproducción asistida, particularmente en la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide en la que espermatozoides con genomas anormales pueden alcanzar el material genético del ovocito. Se postula que tres factores pueden estar involucrados en la etiología del daño del ADN: estrés oxidativo, aberraciones en el empaquetamiento de la cromatina y apoptosis. Varias técnicas han sido utilizadas para estudiar los defectos del ADN. A modo general, las técnicas de evaluación de ADN pueden ser divididas en 2 grupos: aquellas que evalúan el grado de condensación o compactación de la cromatina y aquellas que miden el grado de fragmentación del ADN. Muchas de estas técnicas son laboriosas, costosas y algunas dependen de enzimas cuya actividad y accesibilidad a las roturas de ADN pueden ser irregulares. En este artículo se comenta sobre el desarrollo y puesta a punto de varias de las técnicas de evaluación de la cromatina espermática en camélidos sudamericanos (CSA) y otras especies domésticas.

Palabras clave: calidad de ADN, camélidos sudamericanos, espermatozoides

ABSTRACT

Abnormalities in sperm genetic material can be expressed as maturation or nuclear condensation defects, DNA damage or breakdown and chromosomal abnormalities. Routine semen evaluation (sperm motility, concentration, viability, membrane function and morphology) does not reflect sperm DNA quality. This becomes important when applying assisted reproductive techniques, especially intracytoplasmic sperm injection, in which sperm with abnormal genomes can reach the oocyte's genetic material. Three factors have been suggested to be involved in the etiology of DNA damage: oxidative stress, chromatin packaging anomalies and apoptosis. Various techniques have been used to study DNA defects. In general, DNA evaluation techniques can be divided into two groups: those that evaluate the degree of chromatin condensation or compactation and those that measure the degree of DNA fragmentation. Many of these techniques are laborious, costly and some depend on enzymes whose activity and accessibility to DNA fragments can be irregular. In this article, the development and setting up of various techniques to evaluate sperm chromatin in South American Camelids (SACs) and other domestic species is commented on.

Keywords: ADN quality, South American camelids, sperm

INTRODUCCION

El núcleo de los espermatozoides de mamíferos presenta una cromatina estable y altamente compacta, seis veces más condensada que la de una célula somática (Tavalee *et al.*, 2008). Durante el pasaje de los espermatozoides a través del tracto genital del macho y especialmente en el epidídimo, los espermatozoides de mamíferos sufren cambios estructurales y bioquímicos, necesarios para alcanzar la óptima capacidad fertilizante (Rodríguez *et al.*, 1985). Estos cambios son considerados en conjunto maduración espermática (Bedford, 1975) y dentro de ellos, se ha descrito la progresiva formación de puentes disulfuro (S-S) entre los residuos de cisteína de las protaminas (Bedford, 1973). Así, luego del reemplazo de las histonas por protaminas en el testículo, los grupos tioles (SH) de los residuos de las cisteínas de las protaminas son progresivamente oxidados durante el tránsito por el epidídimo, formándose puentes disulfuro que le otorgan al núcleo espermático una estructura altamente compacta (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Las anomalías en las protaminas o las alteraciones en la proporción de estas proteínas pueden resultar en una disminución de la compactación de la cromatina espermática (Beletti y Mello, 2004). Estas alteraciones de la cromatina han sido asociadas a subfertilidad en varias especies (Beletti y Mello, 1996; Gagnon, 1999). Si bien espermatozoides con anomalías en la cromatina pueden fertilizar ovocitos y producir embriones, se ha propuesto que dichos embriones podrían no llegar a término y/o no originar individuos sanos (Ahmadi y Ng, 1999; Evenson, 1999; Franken *et al.*, 1999; Ostermeier *et al.*, 2001).

Las anomalías en el material genético pueden expresarse por defectos en la maduración o condensación nuclear, rupturas del ADN y anomalías cromosómicas. Los parámetros de rutina utilizados para evaluar el semen (movilidad espermática, concentración, viabilidad, funcionalidad de membranas y morfología) no reflejan la calidad del ADN espermático. Esto cobra importancia para las técnicas de reproducción asistida (TRA), particularmente en la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) en la que espermatozoides con genomas anormales pueden alcanzar el material genético del ovocito. Se postula que tres factores pueden estar involucrados en la etiología del daño del ADN: estrés oxidativo, aberraciones en el empaquetamiento de la cromatina y apoptosis. El estrés oxidativo es causado por un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS) y la capacidad antioxidante del plasma seminal (Sharma *et al.*, 2004). Por otra parte, los espermatozoides serían particularmente susceptibles al daño producido por EROS debido a que su membrana plasmática tiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y su citoplasma contiene bajas concentraciones de enzimas antioxidantes (Agarwal y Allamaneni, 2004). Con respecto a las rupturas del ADN, McPherson y Longo (1992) postulan que el empaquetamiento de la cromatina requiere de la enzima topoisomerasa II para crear y ligar cortes y así facilitar la incorporación de protaminas durante la espermiogénesis. Esos cortes están involucrados en el reordenamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas. Así, estos cortes endógenos presentes en los espermatozoides recién eyaculados, podrían indicar una maduración incompleta durante el proceso de espermiogénesis, resultando en una alteración de la condensación de la cromatina debido a una baja protaminación. Por último, las fases tempranas de la apoptosis son caracterizadas por cambios funcionales de la membrana, más específicamente, por una redistribución asimétrica de fosfolípidos (Vermees *et al.*, 1995). En esta fase,

la fosfatidilserina, normalmente secuestrada en la membrana citoplasmática interna, aparece en la cara externa donde desencadena una repuesta no inflamatoria para que se desencadene la fagocitosis de la célula (Bratton *et al.*, 1997). En las etapas más tardías de la apoptosis, se observa fragmentación de ADN (Frankfurt *et al.*, 1993; Didenko y Hornosby, 1996). Una normal espermatogénesis depende de una eficiente apoptosis: se postula que entre un 25 a 75 % de las células germinales degeneran y mueren en el testículo mamífero adulto (Lue *et al.*, 1999). Sakkas *et al.*, (2003) postulan que hay espermatozoides que pueden comenzar a sufrir apoptosis pero luego “escapan” del proceso (“apoptosis abortiva”) pudiendo sufrir un incremento del daño del ADN y aún así aparecer en el eyaculado.

Varias técnicas han sido utilizadas para estudiar los defectos del ADN. A modo general las técnicas de evaluación de ADN pueden ser divididas en 2 grupos: aquellas que evalúan el grado de condensación o compactación de la cromatina y aquellas que miden el grado de fragmentación del ADN. Dentro de las primeras se encuentran las tinciones con Azul de Anilina, Azul de Toluidina (AT) y Cromomicina A3. Las técnicas que evalúan la fragmentación del ADN espermático han sido subclasificadas por Cortés-Gutiérrez *et al.* (2007) en dos grupos. El primer grupo incluye aquellas metodologías utilizadas para marcar rupturas de hebras simples y dobles, por ejemplo cuando se utilizan enzimas para incorporar nucleótidos marcados in situ como Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) o In situ Nick Translation (ISNT). Considerando que las rupturas del ADN incrementan la susceptibilidad a la desnaturalización, el segundo grupo de estrategias incluye aquellas técnicas que miden la susceptibilidad de la cromatina a desnaturalizarse luego de un tratamiento. En este grupo se incluyen el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH), Single-Cell-Gel-Electrophoresis (SCGE) o prueba de Cometa y el Sperm Chromatin Dispersion test (SCD) o prueba del Halo. Muchas de estas técnicas son laboriosas, costosas y algunas dependen de enzimas cuya actividad y accesibilidad a las roturas de ADN pueden ser irregulares (Fernández *et al.*, 2005). En los CSA y en otras especies domésticas hemos empleado algunas de las técnicas de evaluación del ADN mencionadas, que se describirán en el siguiente apartado.

REVISIÓN DEL TEMA

Hasta el año 2007 no existían reportes sobre el uso de técnicas de evaluación de ADN en CSA. Fue a partir de entonces que nuestro laboratorio comenzó a utilizar algunas de las técnicas y en el año 2009 publicamos nuestro primer estudio en el que se evaluó la condensación y/o compactación de la cromatina en espermatozoides de semen fresco de llama utilizando azul de toluidina (AT) (Carretero *et al.*, 2009). El AT es un colorante catiónico cuya unión al ADN, que da lugar al color metacromático azul-violeta, corresponde a agregados de AT interactuando iónicamente con los fosfatos negativos de los nucleótidos. La coloración celeste (ortocromática) se debe a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al ADN, mediante intercalación o por unión iónica. La completa neutralización de los grupos fosfato por las argininas de las protaminas (Pogany *et al.*, 1981) y la ocurrencia de entrecruzamientos entre protaminas (Bedford, 1979; Balhorn, 1982; 1989) son los principales factores responsables de la reducida afinidad de la cromatina

compacta del espermatozoide maduro por los colorantes catiónicos. De esta manera, utilizando dicho colorante es posible clasificar a los espermatozoides de acuerdo al grado de compactación de la cromatina. Por otro lado, la reducción de los grupos disulfuro mediante agentes reductores como ditioneitol (DTT) o mercaptoetanol (ME), permite que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del ADN queden disponibles y accesibles a la unión de los colorantes (Barrera *et al.*, 1993). Esto permite, utilizar al DTT o al ME como controles positivos de la tinción con AT. Esta tinción se ha utilizado en varias especies para detectar defectos en la condensación de la cromatina (humano: Barrera *et al.*, 1993; Erenpreiss *et al.*, 2001; 2004; Erenpreisa *et al.*, 2003; Tsarev *et al.*, 2009; toro: Beletti y Mello, 1996; Beletti *et al.*, 2005; conejo: Beletti y Mello, 2004; padrillo equino: Naves *et al.*, 2004; Sardoy *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2012a) y actualmente se ha empleado para evaluar la cromatina en caninos, felinos y porcinos (Monachesi y Carretero, 2014; Allera *et al.*, 2016; Arraztoa *et al.*, 2016).

La concentración del colorante utilizado en la tinción varía entre las especies, sin embargo, en la llama, alpaca, guanaco, equino, felino, canino y porcino se observaron los mismos patrones de coloración a pesar de la diferente concentración de AT: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación) y violeta-azul oscuro (positivos, alto grado de descondensación) (Sardoy *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2009; 2010a, 2010b; 2012a; Monachesi y Carretero, 2014; Allera *et al.*, 2016; Arraztoa *et al.*, 2016). Los patrones AT positivos y AT intermedios son considerados espermatozoides con alteración en la condensación de la cromatina. Los porcentajes de espermatozoides AT positivos en semen fresco de llama, alpaca y guanaco fueron: $4,5 \pm 4,6\%$; $7,5 \pm 5,2\%$; $8,9 \pm 3,1\%$; respectivamente y los porcentajes de AT intermedios fueron: $6,4 \pm 5,1\%$; $21,7 \pm 6,8\%$; $29,9 \pm 6,7\%$; respectivamente. En ambas categorías de AT se observa que el porcentaje es superior en la alpaca y el guanaco que en la llama. Estas diferencias podrían deberse a los distintos ambientes, a la época del año en que se encontraban las diferentes especies y/o a la frecuencia de extracción/eyaculación entre las especies domésticas y silvestres. Durante el estudio, las llamas estuvieron ubicadas en la facultad de Ciencias Veterinarias en la ciudad de Buenos Aires, Argentina y las alpacas se encontraban en la Universidad de San Marcos, Perú presentando ambos grupos de animales una buena condición corporal. Los guanacos, se encontraban en semicautiverio, en un criadero del sur argentino donde los nutrientes eran más escasos. Con respecto a la época del año, los porcentajes de AT positivos + intermedios en alpaca observados en verano fueron $29,2 \pm 10,7\%$. Estos valores fueron similares a los espermatozoides AT positivos + intermedios observados en la llama durante el verano ($25,8 \pm 13,0\%$) pero superiores a los observados en llama durante el invierno (AT positivos + intermedios: $13,1 \pm 8,0\%$). De hecho, se observaron diferencias significativas entre las estaciones de verano e invierno en la condensación de la cromatina de espermatozoides de llama (Carretero *et al.*, 2008). Con respecto a la frecuencia de extracción/eyaculación, las especies silvestres podrían tener una frecuencia de eyaculación inferior a la frecuencia de recolección de semen de las especies domésticas y este acúmulo de reservas espermáticas podría llevar a que los espermatozoides se vayan degenerando y/o se vaya dañando su ADN.

En humanos, se han reportado cuatro patrones de cabezas espermáticas diferentes teñidas con AT: violetas oscuros,

azules, violetas claros y celestes. Si bien, en nuestros trabajos, un cuarto patrón se hubiera podido identificar, en nuestra opinión la evaluación se volvería demasiada subjetiva.

En nuestro laboratorio, se probó simplificar la técnica descrita por otros autores (Erenpreiss *et al.*, 2001, 2004; Erenpreisa *et al.*, 2003; Beletti y Mello, 2004; Beletti *et al.*, 2005; Tsarev *et al.*, 2009), quienes utilizaron una hidrólisis ácida previa a la tinción con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la técnica. Estos autores reportaron que los espermatozoides que tienen una cromatina altamente compacta (normales) son apenas afectados por la hidrólisis ácida y en consecuencia se tiñen levemente celestes, mientras que, en los espermatozoides con una cromatina alterada, las protaminas pueden ser parcialmente extraídas por la hidrólisis permitiendo que las moléculas de AT se unan a los grupos fosfato, aumentando la sensibilidad de la técnica. En nuestros estudios realizados en CSA, equinos, caninos, felinos y porcinos sin realizar la hidrólisis ácida previa a la tinción con AT, observamos espermatozoides violetas oscuros en las muestras. Esto simplifica en gran medida la técnica y la hace más económica. Por otra parte, distintos autores han utilizado diferentes soluciones para fijar los extendidos: metanol (Barrera *et al.*, 1993), etanol-ácido acético (3:1) más etanol 70% (Beletti y Mello, 2004; Beletti *et al.*, 2005), etanol-acetona (1:1) (Gagnon 1999; Erenpreiss *et al.*, 2001; Erenpreisa *et al.*, 2003; Tsarev *et al.*, 2009) pero muchas de estas sustancias pueden ser altamente tóxicas si son inhaladas durante su manipulación (Macedo y Nava Muñoz, 2000). En CSA, equino, felino, canino y porcino, la fijación simple con etanol 96° durante 2 minutos fue efectiva (Sardoy *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2009; 2010a, 2010b; 2012a; Monachesi y Carretero, 2014; Allera *et al.*, 2016; Arraztoa *et al.*, 2016), dado que se encontraron patrones de coloración similares a los observados en otras especies (Barrera *et al.*, 1993; Gagnon 1999; Erenpreiss *et al.*, 2001; Erenpreisa *et al.*, 2003; Beletti y Mello, 2004; Beletti *et al.*, 2005; Tsarev *et al.*, 2009). Todas las características mencionadas hacen que el AT sea una técnica sencilla de realizar, económica y rápida para determinar el grado de condensación de la cromatina de los espermatozoides.

La técnica de Cometa fue introducida en 1984 por Ostling y Johanson, permitiendo detectar el daño del ADN en una variedad de células de vertebrados, incluyendo espermatozoides. La metodología consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfhidrilo que se encuentran en las protaminas del espermatozoide, para luego someterlos a un campo eléctrico. Durante la electroforesis los fragmentos de ADN dañado migran desde la cabeza del espermatozoide hacia el ánodo dando una apariencia de "cometa", mientras que las cabezas de los espermatozoides "sin cometa" corresponden a aquellas células que no presentan daño en su ADN. El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son fuentes de electroforesis para ADN, y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad. En nuestro laboratorio intentamos utilizar dicha técnica para evaluar espermatozoides de semen fresco de llama y de equino pero los resultados no fueron concluyentes. Inicialmente, se utilizó la técnica descrita por Linfor y Meyers (2002) en espermatozoides equinos y luego se probaron diferentes variantes de la misma, como la utilización de diferentes buffers de corrida electroforética, diferentes concentraciones de enzimas, diferentes temperaturas y

tiempos de incubación de las muestras. Los principales inconvenientes fueron: se despegaba la mezcla semena-agarosa del portaobjeto, no se logró una correcta descondensación de la cromatina para lograr la corrida electroforética, ninguno de los posibles inductores de fragmentación del ADN fue efectivo (peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, temperatura y ADNasa I) (Carretero, observación personal).

El ensayo que evalúa la estructura de la cromatina espermática (SCSA, Sperm chromatin structure assay) fue descrito como la técnica de oro para evaluar la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización por exposición al calor ó a un ambiente ácido (Evenson *et al.*, 2002). Esta técnica utiliza el colorante metacromático naranja de acridina, que evalúa la proporción de cadena simple (ADN anormal) y cadena doble (ADN nativo) presente en un espermatozoide individual. El ADN dañado responde al tratamiento ácido, desenrollándose y asumiendo la forma de cadena simple y se tiñe de naranja. Este colorante puede ser evaluado tanto por citometría de flujo (SCSA) así como mediante microscopía de fluorescencia. Al utilizar el SCSA en espermatozoides de llama y de equino, no logramos un resultado concluyente y confiable. Los problemas que se presentaron durante la puesta a punto de la técnica fueron: dificultad para encontrar un citómetro de flujo que nos permitiera pasar las muestras con naranja de acridina, ya que este colorante tapanía las tubuladuras del equipo; la velocidad de flujo de las células era de aproximadamente 10.000 eventos/segundo, superior a la reportada por otros autores (humanos: 200-300 eventos/segundo y padrillos: 100-200 eventos/segundo) (Carretero, observación personal). Este problema mejoró diluyendo las muestras con buffer, lo que permitió disminuir la velocidad de flujo, aunque sin llegar a la velocidad reportada en la bibliografía. Por otra parte, se desconocía la calibración del citómetro ya que no se menciona en los trabajos que utilizan la técnica. Se contactó a un laboratorio holandés que utiliza el mismo citómetro de flujo que el utilizado en nuestro estudio (FacsCalibur-Becton Dickinson) y que además trabajaba con la técnica; sin embargo, a pesar de trabajar con la calibración recomendada no se logró la velocidad de flujo reportada por otros autores. Se trató de identificar y localizar la población espermática, ya que tanto en el semen de llama como en el semen equino observamos los espermatozoides en una posición diferente a la reportada para semen humano. En ambas especies los espermatozoides se observaron como una nube de puntos y encima de la nube se observó un anillo de puntos. A partir de estos resultados, podríamos pensar que tanto la nube como el anillo corresponden a la población total de espermatozoides de llama. Es decir, teniendo en cuenta que el citómetro de flujo identifica y separa las células por tamaño y granularidad podrían existir dos poblaciones de espermatozoides en relación al tamaño celular. Esto se refuerza a partir de trabajos realizados en el laboratorio, donde se evaluó la morfometría de la cabeza espermática y se observó que los espermatozoides de llama presentan una gran diversidad en la morfología, es decir, se observa una amplia variedad de cabezas espermáticas tanto en tamaño como en forma (Casaretto *et al.*, 2012). Además, se probaron varios controles positivos como ciclos alternados en nitrógeno líquido (-196 °C) y temperatura de 100 °C (5 ciclos), exposición a temperaturas de 100 °C durante 1 hora y exposición del semen a un agente reductor de los puentes disulfuros (DTT) y ninguno resultó efectivo.

A partir de los resultados obtenidos con el SCSA, comenzamos a teñir espermatozoides de llama con naranja de acridina

para observarlos con microscopía de fluorescencia. El colorante naranja de acridina se intercala en la doble cadena de ADN y emite fluorescencia verde, mientras que cuando se une a las cadenas simples emite fluorescencia naranja. Se probaron dos métodos de fijación (etanol y solución de Carnoy) y dos tiempos de fijación de los frotis (2 y 24 h). La fijación en Carnoy presentó mayor intensidad de fluorescencia y no hubo diferencias entre los tiempos de fijación (Carretero, observación personal). Se probaron los mismos controles de fragmentación del ADN que los ensayados para el SCSA y además se incluyó la realización de frotis en placas termostalizadas y la incubación en HCl. Los frotis en placa termostalizada fueron efectivos pero los resultados fueron muy variables entre eyaculados: en algunos frotis 10 minutos fueron insuficientes para producir un control positivo (fluorescencia naranja-roja) y en otros, en el mismo tiempo, se observaban espermatozoides amarrados como "fantasmas". La incubación en HCl no resultó efectiva. La técnica dejó de implementarse debido a que los resultados obtenidos con los controles positivos no fueron repetibles y los resultados de la muestra no fueron confiables ya que no se observaron espermatozoides dañados (Carretero, observación personal).

Debido a los pobres resultados obtenidos en semen de llama con las técnicas de cometa y naranja de acridina (por citometría y microscopía) comenzamos a buscar otras técnicas alternativas que permitan evaluar la fragmentación del ADN espermático. Fue así que comenzamos con la puesta a punto de la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion assay) utilizada en el 2003 por Fernandez *et al.*, para evaluar espermatozoides humanos. El fundamento del SCD se basa en que cuando los espermatozoides con ADN intacto se colocan en una matriz de agarosa y son expuestos a soluciones de lisis, sus núcleos se desproteinizan, produciendo halos de dispersión de la cromatina (los halos corresponden a "loops" o bucles de ADN unidos a la estructura nuclear residual ó "core") mientras que los espermatozoides que tienen su cromatina fragmentada, fallan en producir halos de dispersión (Fernández *et al.*, 2003). La razón por la que los núcleos espermáticos con una extensa fragmentación de su ADN no producen halo no ha sido bien establecida. Fernández *et al.* (2003) proponen que las hebras simples de ADN interactúan dentro de la cabeza espermática de tal forma que la remoción de las proteínas nucleares por las soluciones de lisis no resulta en la dispersión de los fragmentos de ADN. Por otro lado, nosotros proponemos que los fragmentos de ADN interactúan dentro de la cabeza espermática por complementariedad de bases (adenina-timina, citosina-guanina) generando extremos cohesivos y como resultado fallan en producir halo. Para la técnica del halo en espermatozoides de llama empleamos el mismo protocolo utilizado en humanos (Fernández *et al.*, 2003) pero utilizando mercaptoetanol (ME) en la solución de lisis en lugar de ditioneitol (DTT). Además probamos la efectividad de tres controles diferentes de fragmentación de ADN (incubación del semen a 100 °C durante 30 minutos, incubación con NaOH 0,3 M durante 30 minutos) a temperatura ambiente y exposición a luz UV (36 Watts) durante 2 horas. Todos los controles fueron efectivos, se observaron espermatozoides sin halos de dispersión de la cromatina (Carretero *et al.*, 2012b). Con respecto a la técnica en sí, se probaron tres concentraciones de mercaptoetanol (2,5; 5 y 10%). Para comparar las diferentes concentraciones se tomaron imágenes y mediante un analizador de imágenes se midieron el halo y "core". Además se analizó el tamaño del "halo relativo" (superficie del halo/superficie total (halo + core)* 100). No se encontraron diferencias significativas entre las áreas del "core" de los espermatozoides incubados

en la solución de lisis 1 con concentraciones de 2,5 y 5% de ME, mientras que se observó un aumento significativo del tamaño del "core" cuando se empleó 10% de ME en la solución de lisis 1. Con respecto al área del halo, se encontraron diferencias significativas entre todas las concentraciones de ME utilizadas. Cuando se analizaron los espermatozoides procesados con la técnica de SCD mediante microscopía óptica, se observaron 4 patrones: (i) núcleos con halos grandes de dispersión de la cromatina, (ii) núcleos con halos medianos, (iii) núcleos con halos pequeños y (iv) núcleos sin halos.

De acuerdo a Fernández *et al.*, (2003, 2005), los primeros dos patrones (i y ii) son considerados espermatozoides con ADN intacto (sin fragmentación), mientras que los otros patrones (iii y iv) representan espermatozoides con ADN fragmentado. Cuando se compararon los porcentajes promedio de los patrones de SCD observados con las diferentes concentraciones de ME, se observaron diferencias significativas en los porcentajes promedio de halos grandes ($P=0,0005$) y medianos ($P=0,0001$) entre 5% de ME y el resto de las concentraciones (2,5 y 10% de ME), con el mayor número de halos grandes observados en la concentración de 5% ME. Por lo tanto, y de acuerdo a los resultados del presente estudio, la concentración óptima de ME resultó ser la del 5%. Para la selección de dicha concentración se consideraron 3 factores: 1) los espermatozoides incubados con 5% de ME mantuvieron el área del "core" produciendo un halo extenso alrededor del mismo, 2) la concentración de 5% de ME produjo el mayor porcentaje de halos grandes y 3) los espermatozoides incubados con 5% de ME presentaron el mayor halo relativo. Este último aspecto es importante, porque las células espermáticas pueden tener diferentes tamaños nucleares y este parámetro relativo evita la distorsión que se podría producir si sólo el tamaño absoluto fuera considerado. De forma similar, trabajos en espermatozoides equinos comprobaron la mayor efectividad de 5% de ME en la técnica de SCD comparado a 2,5 y 10%. También fueron efectivos en el equino los controles de fragmentación utilizados en la llama (Carretero *et al.*, 2010c). Patrones similares a los observados en la llama fueron descritos en el humano (Fernández *et al.*, 2003; 2005), en el padrillo equino (Carretero *et al.*, 2010c; 2012a) y en el felino (Allera *et al.*, 2017).

En semen humano, también fueron descritos los mismos cuatro patrones e incluso describieron una quinta categoría, reportada como espermatozoide sin halo y "degradado" (similar al espermatozoide sin halo pero teñido irregular y débilmente) (Fernández *et al.*, 2003; 2005). Estos autores observaron esta última categoría más frecuentemente cuando emplearon el kit Halosperm® que cuando utilizaron el protocolo original. En nuestro estudio, esta quinta categoría no fue observada con ninguna de las concentraciones de ME ensayadas, posiblemente porque el protocolo utilizado es similar al método original de Fernández *et al.*, (donde los autores también observaron pocos espermatozoides degradados) o porque se usó mercaptoetanol en lugar de ditiotreitól en la solución de lisis. Inicialmente, Enciso *et al.*, (2006) ensayaron en espermatozoides de cerdo el kit de SCD desarrollado para humanos (Halosperm® kit), que incluye una incubación ácida previa a la lisis. Observaron imágenes similares a aquellas observadas en humanos (ausencia de halo o halos pequeños en los espermatozoides con fragmentación de su ADN y halos de dispersión alrededor de un "core" central en espermatozoides con su ADN intacto). Sin embargo, la diferenciación entre los tamaños de los halos no fue fácil de establecer en las muestras de cerdos porque el tamaño de los halos no fue tan grande como los observados

en espermatozoides humanos. Por consiguiente, propusieron una variante del kit de SCD para utilizar en espermatozoides de cerdo (Sperm-Sus-Halamax®), que incluye una breve incubación en una solución de lisis (sin una incubación ácida previa), obteniendo núcleos con extensos halos de dispersión de la cromatina en los espermatozoides con ADN fragmentado. Así, en la especie porcina, los núcleos espermáticos con ADN intacto (ausencia de fragmentación) no muestran o sólo presentan una mínima relajación de los "loops" de ADN cercanos al área de la cola espermática (Enciso *et al.*, 2006). Patrones similares a los observados en cerdo fueron descritos en ratón (Rodríguez *et al.*, 2005), toro (García-Macías *et al.*, 2007; González-Marín *et al.*, 2011) y carnero (López-Fernández *et al.*, 2008a). Estos resultados indicarían que existirían dos grupos de especies que reaccionarían de manera diferente frente a la técnica de SCD y por lo tanto, ésta debería adaptarse a cada especie individualmente. Cortés-Gutiérrez *et al.*, (2009) proponen que la técnica de SCD debería ser adaptada al genoma de cada especie debido a que la metodología se basa principalmente en la extracción de proteínas, y la molécula de ADN espermático interactúa con diferentes protaminas en la cromatina (Ausió *et al.*, 2007).

El rango de la fragmentación total observada en nuestro estudio (0,68 a 37% de espermatozoides sin halo + espermatozoides con halos pequeños) es similar al rango reportado para espermatozoides de hombres sanos (3,6 a 35%; Fernández *et al.*, 2003) y para eyaculados de cerdo diluidos y conservados a 15 °C durante 1 a 4 días (0 a 47,9%; López-Fernández *et al.*, 2008b). Sin embargo, los valores de fragmentación del ADN reportados en semen de carnero diluido y conservado por 30 minutos a 15 °C (1 a 11%; López-Fernández *et al.*, 2008a), en semen fresco de equino ($10,0 \pm 6,6\%$; Carretero *et al.*, 2012a) y en semen fresco felino ($6,7 \pm 3,5\%$; Allera *et al.*, 2017) se encuentran más cerca del límite inferior del rango observado en las especies arriba mencionadas. De esta manera, tanto el rango como el valor absoluto observados en carnero, equino y gato son menores. Posiblemente, las diferencias observadas se deben a las diferentes especies evaluadas así como al grado de selección artificial que se ha realizado en cada especie doméstica. Por ejemplo, los cerdos son altamente seleccionados en términos de fecundidad y pubertad, además la vida reproductiva de un cerdo típicamente no es mayor a 4 años en una granja comercial (López-Fernández *et al.*, 2007). Por otro lado, es posible que las diferencias observadas entre el carnero y el cerdo, ambos seleccionados en términos de fecundidad, puedan ser debido al número de muestras analizadas (10 y 180 muestras de diferentes carneros y cerdos, respectivamente) y/o al tiempo de conservación a 15 °C (30 minutos en carnero y 1 a 4 días en cerdo).

La técnica de SCD resulta ser más sencilla que otras técnicas de evaluación de ADN, sin embargo requiere que las soluciones de lisis se preparen con no más de 2 días de antelación a su uso. Es por ello que en nuestro laboratorio hemos intentado simplificar la misma, reduciendo el número de soluciones a utilizar. Tanto en llama como en equino se comprobó que la técnica de SCD es igualmente efectiva si se utiliza una única solución de lisis en lugar de dos (Fumuso *et al.*, 2015; Caldevilla *et al.*, 2017), LLAlo que reduce los costos y no sólo el tiempo de realización de la técnica sino también de preparación de las soluciones.

El TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labelling) es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la fragmentación del ADN espermático. Esta técnica permite visualizar la

incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza, in situ, mediante la acción de la enzima terminal deoxynucleotidil transferasa (TdT). Esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. El nucleótido incorporado está directamente marcado con un fluorocromo. La señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de fragmentos que presente la cadena de ADN. Los espermatozoides que presentan su ADN fragmentado emiten fluorescencia verde. La técnica de TUNEL se ha utilizado para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de semen fresco (Cheuquemán et al., 2013) y criopreservado de alpaca (Santiani et al., 2013) mediante citometría de flujo. También, ha sido utilizada para evaluar espermatozoides de semen fresco de llama mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (Carretero et al., 2015a).

En la llama, se utilizaron diferentes controles de fragmentación como la incubación del semen a 100 °C durante 30 minutos, la incubación con NaOH 0,3 y 0,012M durante 5 minutos a temperatura ambiente; la exposición a luz UV (36 Watts) durante 2 horas y la incubación del semen con ADNasa I (4U/μl) durante 30 minutos a 37 °C. El control positivo más efectivo para inducir la fragmentación del ADN fue el NaOH 0,3M; sin embargo, al microscopio de fluorescencia se observó un alto número de cabezas espermáticas aglutinadas y en el citómetro la población fue más dispersa. Aunque la incubación del semen a 100 °C, el NaOH 0,012M y la ADNasa I (4 U/μl) fueron efectivos para inducir la fragmentación del ADN, los valores fueron significativamente menores ($P < 0,05$) a los observados con el NaOH 0,3M. Sin embargo, en estos tres controles no se observó aglutinación espermática (Carretero et al., 2015a). Los porcentajes de fragmentación en semen fresco de llama evaluado con TUNEL ($7,2 \pm 7,2\%$) fueron superiores a los observados por Cheuquemán et al. (2013) en espermatozoides de semen fresco de alpaca ($0,9 \pm 0,9\%$), ambos utilizando citometría de flujo. Las diferencias podrían deberse a las especies evaluadas (llama vs. alpaca) y/o a diferencias en el protocolo de TUNEL, por ejemplo, la solución de permeabilización fue diferente o que las muestras en la alpaca fueron diluidas con PBS sin tratamiento previo con colagenasa como se realizó en la llama.

Recientemente, realizamos un estudio en el que se correlacionaron las técnicas de SCD y TUNEL para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de semen fresco de llama (Carretero et al., 2017). Los valores de fragmentación fueron $13,7 \pm 6,3\%$ y $8,6 \pm 5,6\%$ para el SCD y el TUNEL, respectivamente. En ambas técnicas la incubación con NaOH 0,3 M produjo un 100% de fragmentación del ADN. A pesar de observar mayor fragmentación en el SCD comparado al TUNEL, se observó una correlación altamente positiva entre ambas técnicas ($r = 0,80$; $p = 0,0002$). De forma similar, en espermatozoides humanos observaron una correlación entre el TUNEL y el SCD (Zhang et al., 2010; Feijó y Esteves, en prensa). Incluso, Chohan et al. (2006), no solo observó correlación entre el TUNEL y el SCD, sino también entre estas dos técnicas y el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), en espermatozoides humanos. También, Fernández et al. (2003) confirmó los resultados del SCD en espermatozoides porcinos utilizando DBD-FISH.

A diferencia del SCSA, TUNEL y el DBD-FISH, la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD) puede ser realizada sin equipamiento complejo o costoso, como el

citómetro de flujo o microscopio de fluorescencia. Nosotros hemos observado que el SCD puede llevarse a cabo tanto mediante microscopio de fluorescencia como de campo claro. En nuestro laboratorio adaptamos la técnica para evaluar espermatozoides de equino y llama (Carretero et al., 2010c; 2012b) y encontramos que el campo claro es más fiable que la fluorescencia. La razón es que la microscopía de campo claro permite distinguir más claramente los límites de dispersión de los halos de la cromatina permitiendo una clasificación más precisa de los diferentes patrones (halos grandes, medianos, pequeños y espermatozoides sin halo). Además la evaluación mediante campo claro (a diferencia de la fluorescencia) permite la observación del flagelo confirmando que el ADN pertenece a un espermatozoide y no al ADN de otra célula (Fernández et al., 2005).

La evaluación del ADN resulta un parámetro muy importante a considerar debido a varios factores como: el genoma paterno formará parte de la mitad del genoma de la descendencia, las características seminales de rutina no reflejan la calidad del ADN espermático, la integridad del ADN espermático resulta esencial en las técnicas de reproducción asistida como la ICSI. Por otra parte, en CSA se reportan bajos índices de preñez utilizando semen criopreservado y una de las causas podría ser el daño que sufren los espermatozoides en su ADN cuando son criopreservados, como ha sido reportado en semen congelado-descongelado de llama con 7% de glicerol (Carretero et al., 2015b).

CONCLUSIONES

El núcleo espermático es una estructura muy estable y compacta, sin embargo puede sufrir alteraciones durante la espermiogénesis o en estadios posteriores. Esto cobra importancia en las técnicas de reproducción asistida, particularmente en la ICSI en la que espermatozoides con genomas anormales pueden alcanzar el material genético del ovocito. Existen varias técnicas que pueden utilizarse para evaluar la cromatina espermática, algunas de ellas costosas requiriendo de equipamiento complejo. En los Camélidos Sudamericanos es posible utilizar técnicas que se emplean en otras especies para evaluar el ADN espermático que resultan sencillas, económicas y repetibles.

REFERENCIAS

- Agarwal A, Allamaneni SSR. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecológica* 2004. 56: 235-245.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 1999. 284: 696-704.
- Allera C, Comercio E, Gonzales Vera J, Miragaya M, Carretero MI. Evaluación del ADN espermático felino mediante la tinción de azul de toluidina. *InVet* 2016. 18(1): 58.
- Allera C, Comercio E, Gonzales Vera J, Miragaya M, Carretero MI (2017). Evaluación del ADN espermático felino mediante la técnica de Dispersión de la Cromatina. *InVet*, en prensa.
- Arraztoa CC, Miragaya MH, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta MC, Péndola CH, Neild DM. Porcine sperm vitrification I: cryoloops method. *Andrologia*, 2016. DOI: 10.1111/and.12706.

- Ausió J, Eirín-López JM, Frehlick LJ. Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc. Reprod. Fertil., Suppl* 2007. 65: 63-79.
- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.*, 1982. 93: 298-305.
- Balhorn R. Mammalian protamines: Structure and molecular interactions. In: Adolph KW (Ed) *Molecular biology of chromosome function*. Springer, New York-Berlin-Heidelberg, 1989. 366-395.
- Barrera C, Mazolli AB, Pelling C, Stockert C. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta histochem (Jena)*, 1993. 94: 141-149.
- Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1973. 18: 199-213.
- Bedford JM. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Hamilton DW & Greep R O (eds). *Handbook of Physiology* 1975. Vol. 5, Chap. 14: 303.
- Bedford JM. Evolution of sperm maturation and sperm storage function of epididymis. In: Fawcett DW and Bedford JM (Eds) *The spermatozoon* 1979. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 7-21.
- Beletti ME, Mello MLS. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Braz. J. Genet.*, 1996. 19: 97-103.
- Beletti ME, Mello MLS. Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology* 2004. 62: 398-402.
- Beletti ME, da Fontoura Costa L, Mendes Guardieiro M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 2005. 22(2): 85-90.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol Chem.*, 1997. 272: 26159-26165.
- Caldevilla M, Carretero MI, Neild D (2017). Modificación del test de Dispersión de cromatina para la evaluación del ADN espermático equino. *InVet*, en prensa.
- Carretero MI, Giuliano S, Casaretto C, Gambarotta M, Neild D. Influencia de la estación del año sobre el ADN de espermatozoides de llama. *InVet* 2008. 10(2): 150. ISSN 1514-6634.
- Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet* 2009. 11(1): 55-63.
- Carretero MI, Giuliano S, Agüero A, Pinto M, Miragaya M, Trasorras V, Egey J, von Thungen J, Neild D. Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010a. 22(1): 310-310.
- Carretero MI, Arraztoa CC, Casaretto CI, Huanca W, Neild DM, Giuliano SM. Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. In: *Fibre production in South American camelids and other fibre animals* 2010b. Lieke Boersma (Eds), Wageningen Academic Publisherspp. 141-144.
- Carretero MI, Arraztoa CC, Caldevilla M, Ferrante A, Lombardo D, Neild D. Chromatin Dispersion test in equine spermatozoa. *InVet* 2010c. 12(2), 249.
- Carretero MI, Arraztoa CC, Ferrante A, Caldevilla M, Santa Cruz R, Neild D. Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012a. 32 (8): 480. VI International Symposium on Stallion Reproduction, September 5-7, Viena, Austria.
- Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, 2012b. 131 (1-2): 63-71.
- Carretero MI, Fumuso FG, Giuliano SM, Neild DM, Cetica P, Miragaya MH. Evaluación del ADN en espermatozoides de llama mediante la técnica de TUNEL utilizando citometría de flujo. Resultados preliminares. Resúmenes del Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. ISSN 978-9874586209, 2015a. pág., 375-378.
- Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso FG, Giuliano S. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on Lama glama sperm cryopreservation. *Andrología* 2015b. 47(6): 685-693.
- Carretero MI, Fumuso FG, Giuliano SM, Neild DM, Cetica P, Miragaya MH. The Sperm Chromatin Dispersion assay (Halo test) correlates with the TUNEL Technique. *Proceedings 7th European Symposium on south American Camelids*. June 12-14, 2017, Assisi, Italia.
- Casaretto C, Lombardo DM, Giuliano SM, Gambarotta MC, Carretero MI, Miragaya MH. Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrología* 2012. 44: 424-430.
- Cheuquemán C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. Assessment of sperm function and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod. Dom. Anim.*, 2013. 48, 447-453.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrel DT. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Journal of Andrology* 2006. 27(1):53-59.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño del DNA espermático. *Actas Urol. Esp.*, 2007. 31(2): 120-131.
- Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Serres-Dalmau C, Gutiérrez de las Rozas AL, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gósalvez J. Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Reprod. Dom. Anim.*, 2009. 44: 823-828.
- Didenko VV, Hornosby PJ. Presence of double strands breaks with single base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell Biol.*, 1996. 135: 1369-76.
- Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálvez A, Gosálvez J. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 2006. 65: 308-31.
- Erenpreisa J, Erenpreiss J, Freivalds T, Slaidina M, Krampe R, Butikova J, Ivanov A, Pjanova D. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry Part A* 2003. 52A:19-27.

- Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl.*, 2001. 22(1): 45-53.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum. Reprod.*, 2004. 19(10): 2277-2282.
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *J. Reprod. Fert. Dev.*, 1999. 11: 1-15.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. The sperm chromatin structure assay (SCS-ATM): clinical use for detecting sperm DNA fragmentation related to male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 2002. 23(1): 1-27.
- Feijó, CM, Esteves, SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Andrology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.002>. En prensa.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J. Androl.*, 2003. 24(1): 59-66.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*, 2005. 84(4): 833-842.
- Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia*, 1999. 31: 361-366.
- Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV, Villa L. Monoclonal antibody to single-strand DNA in a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 1993. 207: 202-5.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Miragaya M, Carretero MI. Simplificación de la técnica de dispersión de la cromatina espermática para evaluar el estado de fragmentación de ADN en espermatozoides de llama (Lama glama). Proceedings VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos. 28-30 de octubre de 2015. Puno, Perú.
- Gagnon C. The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: cache River Press 1999. ISBN: 978-1889899-03-9.
- García-Macias V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E, Anel L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J. Androl.*, 2007. 30: 88-98.
- González-Marín C, Roy R, López-Fernández C, Diez B, Carabaño MJ, Fernández JL, Kjelland ME, Moreno JF, Gosálvez J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011. 123: 139-148.
- Linfor JJ, Meyers SA. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using Single Cell Gel Electrophoresis. *J. Androl.*, 2002. 23(1): 107-113.
- López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 2007. 68: 1240-1250.
- López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology* 2008a. 70(6): 898-908.
- López-Fernández C, Pérez-Llano B, García-Casado P, Sala R, Gosálvez A, Arroyo F, Fernández JL, Gosálvez J. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008b. 103, 87-98.
- Lue YH, Hikin AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999. 140: 1709-1717.
- Macedo JB, Nava Muñoz S. Intoxicación por metanol inhalado. *Rev. Asoc. Mex. Med. Crit y Ter Int.*, 2000. 14(2): 67-70.
- McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 1992. 31: 268-279.
- Monachesi N, Carretero MI. DNA evaluation of raw dog semen using toluidine blue. Preliminary results. *Invet* 2014. 16: 166.
- Naves CS, Beletti ME, Duarte MB, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO. Evaluation of equine spermatid chromatin with toluidine blue and acridine orange. *Biosci. J.*, 2004. 20(3): 117-124.
- Ostermeier G, Sargeant G, Yandell B, Evenson D, Parrish J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.*, 2001. 22: 595-603.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1984. 123: 291-298.
- Pogany GC, Corzen M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm. *Exp. Cell Res.*, 1981. 127-136.
- Rodríguez H, Ohanian C, Bustos-Obregon E. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int. J. Androl.*, 1985. 8: 147-158.
- Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.*, 2005. 84(4): 843-845.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2003. 7: 428-432.
- Santiani Acosta A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez Gutierrez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 2013. 79: 842-846.
- Sardoy MC, Carretero MI, Neild D. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008. 107: 349-350.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Androl.*, 2004. 6: 139-148.
- Tavalae M, Nasr Esfahani MH, Reza Deemeh M. Etiology and evaluation of sperm chromatin anomalies. *Int. J. Fertil. Steril.*, 2008. 2(1): 1-8.
- Tsarev I, Bungum M, Giwercman A, Erenpreisa J, Ebessen T, Ernst E, Erenpreiss J. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin

structure assessment. *Hum. Reprod.*, 2009. 24(7): 1569-1574.

- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. *J. Immunol. Methods*, 1995. 180: 39-52.
- Zhang L, Qiu Y, Wang K, Wang Q, Tao G, Wang L. Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nickend labeling assay. *Fertil. Steril.* 2010. 94(3): 1027-1032.