

Artículo de Revisión/Review Article

# IMPORTANCIA DE LA EVALUACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA EN RUMIANTES. UNA REVISIÓN

## IMPORTANCE OF SPERM CHROMATIN EVALUATION IN RUMINANTS. A REVIEW

Héctor Nava-Trujillo<sup>1,2\*</sup>, Armando Quintero-Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Producción Animal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de los Andes, Mérida, Mérida, Venezuela; <sup>2</sup>Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Zulia, Venezuela. \* La correspondencia debe dirigirse a (Correspondence should be addressed to): H. Nava-Trujillo; e-mail: hectornava00@gmail.com

### RESUMEN

Durante la espermatogénesis el núcleo espermático sufre una serie de cambios importantes que hacen de la cromatina una estructura única cuya calidad es un factor determinante de la capacidad espermática para promover el desarrollo embrionario normal y que consecuentemente está relacionada con la fertilidad. Diversos factores pueden afectar la integridad de la cromatina espermática y por ende afectar la fertilidad teniendo consecuencias sobre la progenie. A pesar de esto y de la disponibilidad de técnicas, la evaluación de la calidad de la cromatina espermática no forma parte de la batería de pruebas que se realizan tanto a nivel de campo como en laboratorio, para estimar la calidad espermática y el potencial reproductivo en rumiantes, y esto puede estar limitando la eficiencia de los sistemas de producción de embriones y de la inseminación artificial con la consecuente disminución de la rentabilidad. En esta revisión se discuten algunos de los factores que pueden afectar la integridad de la cromatina espermática y como el daño a esta estructura afecta la eficiencia reproductiva y a la progenie; además, se presentan algunas alternativas que pudiesen ser útiles a fin de disminuir la incidencia de espermatozoides con daño en la cromatina, con especial énfasis en rumiantes.

**Palabras clave:** Espermatozoide; Cromatina; DNA; Protaminas; Histonas; ROS; Fertilidad; Rumiantes.  
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(1):8-22

### ABSTRACT

During spermatogenesis, the sperm nucleus undergoes a series of important changes that make of the chromatin a unique structure, whose quality is a determining factor of sperm ability to promote normal embryonic development and it is consequently related to fertility. Several factors could affect the integrity of sperm chromatin and thus affect the fertility, having consequences for the offspring. Despite this and the availability of techniques, evaluation of the sperm chromatin quality is not part of the tests performed routinely at the field or laboratory to estimate sperm quality or the fertility in ruminants, and this may be limiting the efficiency of embryos production systems and the artificial insemination with the consequent reduction in profitability. In this review, some of the factors that may affect the integrity of sperm chromatin and how damage to this structure affects reproductive efficiency and progeny are discussed; in addition, some alternatives that could be useful to reduce the incidence of sperm with damaged chromatin, with special emphasis on ruminants are presented.

**Keywords:** Sperm; Chromatin; DNA; Protamines; Histones; ROS; Fertility; Ruminants.  
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(1):8-22

Received/Recibido: 16/08/2016; Accepted/Aceptado: 10/12/2106

Copyright: © 2017 Nava-Trujillo & Quintero-Moreno. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la [Licencia Creative Commons Attribution](#), la cual permite el uso irrestricto, la distribución y reproducción en cualquier medio, dando el crédito correspondiente al autor y la fuente original / This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



## INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis, es un proceso de diferenciación en el que las células germinales sufren una transformación extrema, desde las diploides y metabólicamente activas espermatogonias hasta convertirse en células haploides, con citoplasma modificado, acrosoma y flagelo, los espermatozoides. Durante este proceso, el núcleo sufre una transformación sin igual, no solo por la reducción a la mitad del número de cromosomas, sino también por los cambios estructurales y funcionales del DNA (Balhorn, 2007).

El DNA espermático está organizado de forma diferente al de las células somáticas (Ward & Coffey, 1991). Se encuentra formando una estructura fina, casi cristalina y es seis veces más compacta que en las células somáticas (Poccia, 1986). Esta organización tiene la finalidad de proteger al DNA durante el tránsito a través del tracto reproductivo tanto del macho como de la hembra; así como de agentes estresantes, de la oxidación y los incrementos de temperatura que afectan a la integridad celular; además de proporcionar resistencia ante la acción de nucleasas y del estrés mecánico y convertir al núcleo en una estructura hidrodinámica que facilite el movimiento espermático (Kosower et al., 1992; Braun, 2001; Zini et al., 2001; Sotolongo et al., 2003).

En las células somáticas el DNA se encuentra unido a unas proteínas llamadas histonas, formando los nucleosomas, mientras que en el espermatozoide esta conformación permanece hasta la fase de espermiogénesis cuando el núcleo del espermátide redondeado, ya haploide, sufre un proceso de remodelación y compactación, que comprende el desmantelamiento de los nucleosomas y la formación de los toroides, que son la unidad fundamental del DNA espermático (Ward & Coffey, 1991). Esta remodelación nuclear se inicia con la sustitución de las histonas, en un primer lugar por variantes de histonas específicas del testículo, luego estas son reemplazadas por proteínas de transición y posteriormente ocurre la incorporación parcial de las protaminas, que se unen al DNA a través de sus residuos de arginina (Ward & Coffey, 1991; Balhorn, 2007; Ward, 2010; Johnson et al., 2011; Noblanc et al., 2014). El complejo DNA-protamina, se condensa y forma los toroides, que son estructuras en forma de un salvavidas o dona, que en el caso del toro tienen unos 50 nm de diámetro y que se encuentran interconectadas entre sí por una matriz nuclear filamentosa (Filho et al., 2015). Posteriormente, las protaminas se entrecruzan a través de puentes disulfuros, que se forman por la oxidación del grupo sulfhidrilo de las cisteínas (Ward & Coffey, 1991; Ward, 1993; Fuentes-Mascorro et al., 2000). Esta fase, ocurre a medida que el espermatozoide avanza a lo largo del epidídimo y provoca una máxima compactación de la cromatina, ocurriendo además la disminución de la fragmentación del DNA (Castro y Bustos, 2012; Pérez-Cerezales et al., 2012; Fortes et al., 2014), lo que sugiere que la sustitución de las histonas por las protaminas pudiese darse también a nivel epididimario junto con un proceso de reparación del DNA fragmentado.

El nivel de compactación de la cromatina espermática depende del tipo de protamina presente. Existen dos tipos de protamina, las de la familia P1, que está presente en el espermatozoide maduro de todas las especies y las de la familia P2, cuya presencia es especie dependiente (Oliva, 2006). En el caso de los bovinos, si bien se ha detectado presencia de ARNm para la protamina 2 (Lalancette et al., 2008; Bissonnette et al., 2009; Ganguly et al., 2013), el espermatozoide maduro solo posee protamina 1 unida al DNA (Oliva & Dixon, 1991) y esto le proporciona un mayor nivel de compactación en comparación con la cromatina espermática de especies como el ratón y el hombre, que poseen tanto protamina 1 como protamina 2 (Oliva & Dixon, 1991) y en los que el nivel de compactación parece depender del balance entre los dos tipos de protaminas.

En el espermatozoide maduro, si bien el DNA en su mayoría está asociado con protaminas, una pequeña cantidad de histonas formando nucleosomas que se encuentran unidos a la matriz nuclear, persiste en una proporción del 1% a 2% en ratón, hámster, caballo, toro, ovejo (Uschewa et al., 1982; Bench et al., 1996) y entre 10% y 15% en el hombre (Tanphaichit et al., 1978; Gatewood et al., 1987; Balhorn et al., 2007). Cuando la proporción de histonas es mayor a lo normal (espermatozoide con cromatina inmadura) se predispone al espermatozoide a sufrir fragmentación del DNA (Mukhopadhyay et al., 2011), se compromete su capacidad para promover el desarrollo embrionario normal (Khalifa et al., 2008), y se afecta negativamente la fertilidad (Oliveira et al., 2013). Los espermatozoides con mayor nivel de histonas tienen un núcleo menos compacto y la cabeza más grande (Oliveira et al., 2013) y entre los espermatozoides con núcleo menos compacto el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA ( $17,2 \pm 10\%$ ) fue significativamente mayor que entre los espermatozoides con un núcleo con compactación normal ( $8,3 \pm 5,5\%$ ,  $p < 0,0001$ ) (Martin et al., 2004).

Esta revisión, tiene como objetivos describir los factores que afectan la integridad de la cromatina espermática en rumiantes; así como también la relación entre el daño en la cromatina, la función espermática, la fertilidad y las consecuencias sobre la progenie; además se plantean algunas alternativas para disminuir la incidencia de espermatozoides con cromatina dañada en las muestras de semen. Todo esto con la finalidad de promover mayor investigación en el área y la incorporación de la evaluación de la cromatina entre las pruebas de rutina, tanto a nivel de campo como en los laboratorios de andrología, de producción de semen criopreservado y de producción in vitro de embriones.

## FACTORES QUE AFECTAN LA INTEGRIDAD DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

Varios factores han sido reportados por afectar la integridad de la cromatina espermática. Las anomalías en la cromatina pueden ocurrir durante la espermiogénesis, como resultado de fallas en el proceso de empaquetamiento del DNA (Sailer et al., 1995), lo que podría ser debido al daño ocasionado por radicales libres (Aitken et al., 1998). Sin embargo, el mecanismo exacto no se conoce (Lewis & Aitken, 2005). Una falla en la primera división meiótica con la consecuente presencia de espermatozoides diploides ha sido reportada en dos toros con un alto porcentaje de espermatozoides macrocéfalos (17% y 23%), los cuales a su vez presentaron un promedio de 19,05% (7,1% y 31% respectivamente) de espermatozoides con DNA fragmentado y 8,64% (9,54% y 7,75% respectivamente) de espermatozoides con cromatina inmadura, mientras que en un toro control solo se observó un 2% de espermatozoides con DNA fragmentado y 0,47% con cromatina inmadura (Revay et al., 2009). Adicionalmente, una predisposición genética para defectos de la cromatina espermática podría existir. Se ha reportado que la fragmentación del DNA medida al momento del descongelado del semen tiene una heredabilidad de 0,41 y una repetibilidad de 0,73 (Karoui et al., 2012). En búfalos, la expresión de la variante D del gen para la proteína de transición 1 se relaciona con un mayor porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura ( $12,15 \pm 0,8\%$ ) en comparación con la expresión de la variante C del gen ( $9,79 \pm 0,3\%$ ) (Panigrahi & Yadav, 2010). También, la expresión del péptido tubuloinfundibular de 39 residuos (TIP39) estuvo relacionada con la calidad de la cromatina espermática; así los búfalos con mayor expresión relativa de esta proteína en el plasma seminal tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides con distribución normal de la cromatina tanto en el semen fresco como descongelado ( $96,93 \pm 0,25\%$  y  $96,24 \pm 0,80\%$  respectivamente,  $p < 0,05$ ) que los búfalos con baja expresión de la proteína ( $94,84 \pm 0,71\%$  y  $91,89 \pm 1,69\%$ , respectivamente), con la cromatina espermática en este grupo de búfalos siendo más susceptible al proceso de criopreservación (Selvaraju et al., 2015). En toros, la presencia en los espermatozoides del antígeno asociado a la fertilidad (AFA) que tiene un peso molecular de entre 28-30 KDa, estuvo asociada con una mayor resistencia de la cromatina durante la incubación por 3 horas, lo cual puede deberse en parte a que los espermatozoides que expresan AFA poseen una mayor protección contra el estrés oxidativo, lo cual fue evidenciado por una menor producción de malonaldehído, luego de dos horas de incubación (Karunakaran & Devanathan, 2016). En ovejos, la resistencia de la cromatina espermática al estrés calórico ha sido asociada con el genotipo del polimorfismo del nucleótido simple localizado en la posición -660 en el promotor del gen de la proteína del shock térmico 90 (HSP90AA1), con los animales portando el genotipo GG-660, teniendo mayores niveles de espermatozoides con DNA fragmentado durante los meses calurosos del año en comparación con los ovejos portando el genotipo CC-660 (Ramon et al., 2014).

El daño en la cromatina espermática puede aumentar con la consanguinidad (Karoui et al., 2012), y aunque esto contrasta con lo reportado por Dorado et al., 2015, quienes no observaron un efecto del nivel de consanguinidad sobre el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado en toros, coincide con lo reportado en otras especies (Ruiz-López et al., 2010; Petrovic et al., 2013). En ovejos, el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado fue mayor en los animales consanguíneos ( $25,23 \pm 1,89\%$ ) en comparación con los no consanguíneos ( $7,33 \pm 1,22\%$ ,  $p < 0,01$ ) (Petrovic et al., 2013). Hallazgos similares han sido reportados en ungulados como la *Gazella cuviere* y la *Gazella dama mhor*, las cuales teniendo 31 y 30% de consanguinidad, respectivamente, presentaron  $22,30 \pm 4,49\%$  ( $p < 0,01$ ) y  $14,31 \pm 3,84\%$  ( $p < 0,05$ ) de fragmentación del DNA, respectivamente, siendo superior a los valores de la *Gazella dorcas*, que con solo 4% de consanguinidad presentó  $2,57 \pm 0,57\%$  de espermatozoides con DNA fragmentado (Ruiz-López et al., 2010a).

La raza, la individualidad, la edad, la calidad del semen y la época del año, han sido reportados como factores relacionados con la calidad de la cromatina espermática (Karabinus et al., 1990; Dobrinski et al., 1994; Bochenek et al., 2001; Nava-Trujillo et al., 2011; Karoui et al., 2012; Malama et al., 2012; Kipper et al., 2016). El daño en la cromatina espermática es mayor en toros jóvenes (Karabinus et al., 1990; Karoui et al., 2012; Kipper et al., 2016) y difirió entre los sementales con una calidad seminal inicial normal ( $10,31 \pm 0,005\%$ ) y baja ( $12,11 \pm 0,008$ ,  $p < 0,05$ ) (Mukhopadhyay et al., 2011). En búfalos, el semen con nivel de fragmentación del DNA espermático menor a 8,5%, tuvo mayor porcentaje de espermatozoides vivos, HOST+, y espermatozoides capacitados que los eyaculados con una media mayor al 8,5% de espermatozoides con DNA fragmentado (Pawar & Kaul, 2011).

La época del año puede afectar la integridad de la cromatina espermática. En toros Holstein, el semen colectado en primavera y verano presentó mayor nivel de fragmentación del DNA que el colectado en otoño e invierno (Karoui et al., 2012). En búfalos, Nandre et al., 2011, observaron durante el verano mayores niveles de daño ( $7,61 \pm 1,64\%$ ), que durante el invierno ( $3,00 \pm 0,55\%$ ,  $p < 0,05$ ); y esto ha sido igualmente observado en ovejos (García-Macías et al., 2006; Ramon et al., 2014), donde además la cromatina espermática del semen colectado en los meses de estrés calórico (junio a octubre), presentó mayor daño luego de un periodo de 24 y 48 horas de incubación a 37°C, que el semen colectado en los meses sin estrés calórico (marzo a mayo) (Salces-Ortiz et al., 2015). Malama et al., 2012, reportaron un efecto del mes sobre los niveles de espermatozoides con cromatina dañada y un efecto de factores microclimáticos como temperatura del aire, humedad relativa y punto de rocío sobre el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina y la variación de este luego de tres horas de incubación in vitro, observándose los menores valores de daño en la cromatina durante el otoño y el invierno. Adicionalmente, la inducción

experimental de estrés calórico testicular (insolación testicular por 48 horas) en toros Holstein, ha sido reportado por reducir la estabilidad de la cromatina espermática (Karabinus et al., 1997), mientras que en toros de raza Nelore, la insolación testicular durante cinco días, generó un aumento del porcentaje de espermatozoides con vacuolas nucleares y cromatina anormal desde  $1,7 \pm 0,2\%$  y  $4,7 \pm 2,3\%$  respectivamente a  $12,3 \pm 2,3\%$  y  $30,8 \pm 2,8\%$  a los veintidós días post-insolación, observándose además una correlación negativa entre estos parámetros y la tasa de división embrionaria y la tasa de blastocitos (Fernandes et al., 2008). Rahman et al., 2011, observaron que la cromatina de las células germinales durante las fases de la meiosis y la espermiogénesis fueron las más sensibles al estrés calórico, debido probablemente a que durante estas etapas la cromatina se encuentra en una remodelación activa, además observaron que el daño a la cromatina inducido por la insolación testicular podría deberse a una falla en el proceso de sustitución de las histonas por las protaminas.

Simoes et al., 2013, observaron que el daño en la cromatina se incrementó con la susceptibilidad del semen de sufrir estrés oxidativo. Gürlér et al., 2016, señalan que el efecto dañino de las especies oxígeno reactivas (ROS) sobre el DNA espermático parece depender de la existencia de un daño previo, como el provocado por la criopreservación, ya que sus resultados indican que el daño al DNA aumentó junto con el incremento en los niveles de especies oxígeno reactivas (específicamente los niveles de  $H_2O_2$ ) solo en el semen descongelado, mientras que en el semen fresco el daño al DNA no varió luego de 24 horas de incubación a pesar de que los niveles de ROS se incrementaron significativamente en el mismo periodo. En búfalos, Kadirvel et al., 2009, observaron en semen refrigerado, que el daño en la cromatina estuvo correlacionado positivamente con el porcentaje de espermatozoides con alta producción de ROS ( $r = 0,78$ ,  $p < 0,05$ ) y negativamente con el porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial ( $r = -0,64$ ,  $p < 0,05$ ); mientras que en semen descongelado de búfalos, el porcentaje de espermatozoides con peroxidación lipídica estuvo asociado positivamente con el porcentaje de espermatozoides con deficiencia de protaminas ( $r = 0,56$ ,  $p < 0,05$ ) (Singh et al., 2016).

La criopreservación afecta negativamente diferentes estructuras espermáticas (Celeghini et al., 2008; Rubio-Guillen et al., 2010; Gürlér et al., 2016;). Se ha reportado que aumenta la inestabilidad de la cromatina (Khalifa et al., 2008) y que produce fragmentación y sobrecondensación del DNA espermático (Anzar et al. 2002), aunque también se ha reportado que no afecta la integridad del DNA (Martin et al., 2004). El daño que la criopreservación provoca sobre la cromatina espermática, ocurre principalmente durante la fase de enfriamiento rápido ( $-25^\circ C/min$ ) (Castro et al., 2016); y está relacionado con el tipo de diluyente empleado (Karabinus et al., 1991; Celeghini et al., 2008; Waterhouse et al., 2010; Taşdemir et al., 2013;) y en especial con la presencia de yema de huevo que parece tener un efecto protector (Karabinus et al., 1991; Waterhouse et al., 2010). La susceptibilidad de la cromatina a la criopreservación podría además depender del grado de madurez de esta, dado que semen con un alto nivel de espermatozoides con cromatina inmadura, presentó mayor daño en el DNA (Mukhopadhyay et al., 2011). La criopreservación además de afectar la integridad de la cromatina espermática, incrementa la susceptibilidad de esta durante la incubación a  $37^\circ C$  (Gürlér et al., 2016).

En búfalos, Koonjaenak et al., 2007, sugieren que la criopreservación no compromete la integridad de la cromatina espermática y esto es soportado por los resultados de Kadirvel et al., 2009, 2012 y Kumar et al., 2016, quienes no observaron un efecto dañino de la criopreservación sobre la integridad del DNA espermático. Sin embargo, contrasta con los resultados de otros estudios (Kumar et al., 2011; Kutchy et al., 2014; Mahmoud et al., 2015). Kutchy et al., 2014, observaron un incremento en el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado desde  $0,972 \pm 0,296$  en el semen fresco a  $2,361 \pm 0,139$  siete días después de criopreservado; mientras que en búfalos de raza Murrah, se observó un incremento en el daño de la cromatina desde 10-12% en el semen fresco a 37,25% en el semen descongelado ( $p < 0,01$ ), y esto estuvo acompañado por una disminución significativa de la capacidad antioxidante total, observándose una correlación positiva entre el daño al DNA espermático y la producción de ROS (Kumar et al., 2011). El nivel de daño en la cromatina en el semen criopreservado, está relacionado con el tiempo de almacenamiento. Así se ha observado que el daño en el DNA espermático se incrementó significativamente a partir del año de almacenamiento en nitrógeno líquido (Shoab et al., 2014) aunque Kutchy et al., 2014, observaron un incremento, tanto en semen de toros como de búfalos, tan pronto como 30 días postcongelado y que este se fue incrementando con el tiempo. La resistencia de la cromatina espermática al proceso de criopreservación parece depender de la calidad inicial del eyaculado. Así, el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada en el semen descongelado de toros y búfalos, tres y seis meses luego de la congelación, fue mayor para los sementales que produjeron eyaculados de calidad aceptable (toros:  $4,56 \pm 0,19\%$  y  $11,14 \pm 0,27\%$ ; búfalos:  $1,66 \pm 0,41\%$  y  $5,27 \pm 0,77\%$ ; respectivamente) que los que produjeron eyaculados de pobre calidad (toros:  $8,5 \pm 0,80\%$  y  $13,66 \pm 0,87\%$ ; búfalos:  $4,47 \pm 0,26\%$  y  $8,84 \pm 0,56\%$ ; respectivamente,  $p < 0,05$ ) (Kutchy et al., 2014).

En ovinos, Nur et al., 2011, reportaron que la criopreservación no afecta la integridad de la cromatina indistintamente de que el semen se haya congelado de forma lenta ( $0,5^\circ C/min$ ) o rápida ( $5^\circ C/min$ ); otros reportan que la criopreservación no afecta inmediatamente la integridad de la cromatina espermática, pero si incrementa la susceptibilidad de esta a la desnaturalización durante la incubación a  $39^\circ C$ , ya que si bien el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado se incrementó tanto en semen fresco como descongelado luego de 3 horas de incubación, el incremento fue significativamente mayor en el semen descongelado (Peris et al., 2004) y esto pudiese estar relacionado con la

producción de ROS (Gürler et al., 2016). Mientras que Nur et al., 2010, reportaron que la criopreservación incrementa el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA indistintamente del crioprotector utilizado, pero que el glicerol tiene un efecto más dañino en comparación con otros como propanodiol, sucrosa o trehalosa. Adicionalmente, se ha reportado que la refrigeración del semen incrementó el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA indistintamente del tipo de diluyente, sin embargo, a partir de 24 horas de refrigeración, el efecto fue mayor para el semen diluido en un medio a base de leche y yema de huevo en comparación con el diluyente a base de lecitina de soya (Khalifa and Lymberopoulos, 2013).

Otros factores como la contaminación bacteriana y las vacunaciones, si bien menos estudiados, han sido relacionados con daño a la cromatina. González-Marin et al., 2011, observaron que la fragmentación del DNA en semen descongelado de toros e incubado a 37°C por 4 días, aumentó en línea con el crecimiento bacteriano; y en ovejas, la aplicación de una vacuna anticlostridial, incrementó la fragmentación del DNA desde  $6,4 \pm 7,9\%$  antes de la vacunación, a  $63,4 \pm 24,2\%$  y  $21,7 \pm 10,6\%$ , 20 y 40 días post-vacunación respectivamente, pudiendo estos efectos ser consecuencias de la capacidad de cada animal de responder al incremento de la temperatura corporal post-vacunación y al estrés oxidativo (Gosálvez et al., 2008).

## INTEGRIDAD DE LA CROMATINA, FUNCIÓN ESPERMÁTICA Y FERTILIDAD

El daño en la cromatina se correlaciona negativamente con otros parámetros de calidad espermática. Januskauskas et al., 2003, observaron una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina y el porcentaje de espermatozoides muertos ( $0,58$ ;  $P < 0,05$ ). Waterhouse et al., 2006, reportaron una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina y el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y mitocondrias funcionales. Nava-Trujillo et al., 2011a, reportaron una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada (medida con azul de toluidina) con la motilidad ( $r = -0,48337$ ,  $p = 0,0421$ ) y el porcentaje de espermatozoides vivos ( $r = -0,43104$ ,  $p = 0,0087$ ). En semen de búfalos, se observó una relación negativa entre el daño a la cromatina espermática, la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos, así como una correlación positiva con las morfoanomalías (Eid et al., 2011; Osorio-Meléndez et al., 2011). Adicionalmente se ha observado que los espermatozoides con cromatina dañada tienen cabezas ligeramente más grandes y redondeadas (Nava-Trujillo et al., 2013) y que se distribuyen de forma diferente entre subpoblaciones espermáticas morfométricamente distintas (Nava-Trujillo & Quintero-Moreno, 2013). El daño en la cromatina está asociado positivamente con las alteraciones morfológicas (Dobronski et al., 1994; D'Occhio et al., 2013; Nagy et al., 2013). Enciso et al., 2011, observaron  $61,34 \pm 5\%$  de morfoanomalías en los espermatozoides con DNA fragmentado en comparación con el  $18,08 \pm 2,66\%$  en los espermatozoides con DNA intacto ( $p < 0,05$ ). En semen descongelado de toros Brahman se observó que el  $85,77\%$  de los espermatozoides con morfoanomalías en la cabeza portaban cromatina dañada, lo que contrastó con el  $23,06\%$  de cromatina dañada en espermatozoides con cabezas normales (Nava-Trujillo et al., 2012). El porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática proximal se correlacionó positivamente con el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina (Carreira et al., 2012). En un toro con una alta incidencia de morfoanomalías totales ( $55,8 \pm 5,1\%$ ) se observó un mayor porcentaje de espermatozoides deprotaminados y con fragmentación del DNA ( $3,7 \pm 0,6\%$  y  $13,8 \pm 9,5\%$  respectivamente) que en los toros control cuyo porcentaje de morfoanomalías fue de  $9,9 \pm 2,8\%$  ( $0,4 \pm 0,6\%$  y  $0,6 \pm 0,5\%$  respectivamente) (Carreira et al., 2015). Además, el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura (teñidos positivamente con azul de anilina) estuvo correlacionado positivamente con el porcentaje de morfoanomalías ( $r = 0,58$ ,  $p < 0,0005$ ) y la presencia de gota citoplasmática distal ( $r = 0,41$ ,  $p < 0,014$ ) y negativamente con el porcentaje de espermatozoides vivos ( $r = -0,40$ ,  $p < 0,05$ ) (Khalifa et al., 2008).

La asociación negativa entre el daño en la cromatina y otros parámetros de calidad espermática supone una relación negativa con la fertilidad y si bien existen reportes en los que no se observó tal relación (Charles-Ostermeier et al., 2001; Hallap et al., 2005; Gillan et al., 2008; Dogan et al., 2013; Nagy et al., 2013) un buen número de estudios utilizando diferentes técnicas la han reportado (Tabla 1); además contrariamente a estos reportes (Tabla 1) en los que se evaluó el daño en la cromatina; cuando se evaluó la resistencia de la cromatina espermática a un tratamiento de descondensación con EDTA+SDS, se observó una correlación positiva entre la estabilidad de la cromatina y la tasa de no retorno ( $r = 0,66$ ,  $p < 0,001$ ) (Madrid-Bury et al., 2005).

Erickson et al., 2015, reportaron que el nivel de daño en el DNA, medido con TUNEL, varió entre toros de alta y baja fertilidad ( $4,2 \pm 1,70\%$  vs.  $14,8 \pm 1,96\%$ ,  $p < 0,001$ ) y observaron además que los toros con mayor nivel de daño en el DNA espermático tuvieron una menor tasa de división embrionaria y de blastocitos luego de la fecundación in vitro. En un estudio evaluando la integridad de la cromatina espermática con la tinción de azul de toluidina y la prueba Halomax<sup>®</sup>, se observó que los toros de alta fertilidad tenían un menor nivel de daño (medidos con las dos pruebas) que los de baja fertilidad ( $1,9 \pm 0,30$  y  $4,13 \pm 0,26$  vs  $3,27 \pm 0,31$  y  $7,01 \pm 0,71$ , respectivamente,  $p < 0,000$ ) (Dogan et al., 2015). El contenido espermático de protaminas e histonas ha sido asociado con la integridad de la cromatina y el potencial reproductivo de los toros. Lalancette et al., 2008 reportaron que toros de baja fertilidad tenían mayores niveles de ARNm de protamina 2 que los toros de alta fertilidad

( $p=0,0019$ ) y espermatozoides de toros con semen fresco de mayor calidad expresaron mayores niveles de ARNm para protamina 1 que los toros con semen de menor calidad (Ganguly et al., 2013). Dogan et al., 2015, reportaron que toros de alta fertilidad tenían mayor contenido de protamina 1 que los de baja fertilidad y que la cantidad de protamina 1 se correlacionó positivamente con la fertilidad y negativamente con el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado y esto último coincide con los resultados de Fortes et al., 2014, quienes observaron una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado, medido con SCSA, y el porcentaje de espermatozoides protaminados, negativos a la tinción con cromomicina A3 (CMA3-), ( $r = -0,21, p < 0,05$ ) y una correlación positiva con el porcentaje de espermatozoides deprotaminados (positivos a la tinción con cromomicina A3; CMA3+), ( $r = 0,33, p < 0,05$ ). En búfalos, el porcentaje de espermatozoides deprotaminados (CMA3+) difirió significativamente entre los búfalos de alta ( $0,61 \pm 0,27\%$ ), media ( $3,05 \pm 0,37\%$ ) y baja fertilidad ( $2,20 \pm 0,24\%$ ), aunque no se observó una correlación entre el porcentaje de espermatozoides deprotaminados (CMA3+) y la fertilidad (Singh et al., 2016). Adicionalmente, se ha reportado una diferencia significativa en el nivel de espermatozoides con cromatina inmadura (teñidos con azul de anilina) entre toros de alta ( $1,73 \pm 0,55\%$ ) y baja fertilidad ( $0,67 \pm 0,17, p < 0,0001$ ) y una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina inmadura con la fertilidad ( $r = -0,90, p < 0,0001$ ) (Oliveira et al., 2013) y el desarrollo embrionario in vitro (Khalifa et al., 2008).

**Tabla 1. Reportes de correlaciones negativas entre el daño en la cromatina espermática y la fertilidad**

Referencia	Especie	Técnica	Semen*	r	P
Ahmad et al., 2016	Búfalo	COMET	D	-0,60	0,034
Anzar et al., 2002	Toro	TUNEL	F	-0,90	<0,05
Ballachey et al., 1987	Toro	SCSA	D	-0,40	<0,01
			D	-0,53	<0,05
			D	-0,50	<0,05
Bochenek et al., 2001	Toro	SCSA	D	-0,50	<0,05
Bollwein et al., 2008	Toro	SCSA	D	-0,575	<0,05
Dogan et al., 2015	Toro	Azul de toluidina	D	-0,618	<0,001
			Halomax	D	-0,68
Erickson et al., 2015	Toro	TUNEL	F	-0,62	<0,001
García-Macias et al., 2007	Toro	Halomax campo claro	D	-0,42	0,001
			Halomax fluorescente	D	-0,47
Januskauskas et al., 2001	Toro	SCSA	D	-0,53	<0,05
Januskauskas et al., 2003	Toro	SCSA	D	-0,33	<0,05
			D	-0,51	<0,05
Karoui et al., 2012	Toro	Halomax	D	-0,45	<0,0001
Khalifa & LyMBERopoulos, 2011	Ovejo	Naranja de acridina	D	-0,55	<0,05
Khalifa & LyMBERopoulos, 2013	Ovejo	Naranja de acridina	R	-0,62	<0,05
Oliveira et al., 2013	Toro	Anilina	D	-0,90	<0,0001
Puglisi et al., 2012	Toro	SCSA	D	-0,26	<0,001

\*D: descongelado; F: fresco; R: refrigerado.

En búfalos, Kumar et al., 2012, clasificaron a búfalos como de baja o alta fertilidad de acuerdo a la tasa de preñez, <35% y >55% respectivamente, y no observaron una diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides con DNA intacto utilizando la técnica de TUNEL ( $88,37 \pm 0,91\%$  vs  $90,24 \pm 0,94\%$ , respectivamente); sin embargo utilizando la técnica COMET, se ha reportado que los búfalos de baja fertilidad tenían mayor daño en el DNA espermático y también una correlación negativa entre el daño en el DNA y la tasa de morulas ( $r = -0,756$ ) y blastocitos ( $r = -0,643$ ) (Eid et al., 2011). Más recientemente se ha reportado que la longitud del cometa, pero no el porcentaje de espermatozoides con cromatina intacta medido con naranja de acridina, se correlacionó negativamente con la fertilidad in vivo de búfalos (Ahmed et al., 2016).

## DAÑO EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA: CONSECUENCIAS SOBRE LA PROGENIE

El daño en la cromatina espermática está asociado con la transmisión de enfermedades y la sobrevivencia de las crías y esto debido a que los espermatozoides con cromatina dañada conservan la capacidad fecundante y pueden generar preñeces (Fatehi et al., 2006; Ruiz-López et al., 2010a,b) pudiendo por tanto transmitir mutaciones o enfermedades genéticas a las crías, comprometiendo su salud y desarrollo (Fernández-González et al., 2008; Ruiz-López et al., 2010b; Gautam et al., 2015; Lewis & Kumar, 2015; Siklenka et al., 2015); aunque poca información sobre esto está disponible en rumiantes. En humanos, el riesgo de desarrollo de retinoblastoma en niños está asociado con un alto nivel de fragmentación del DNA espermático del padre, ya sea como un factor independiente o asociado con un alto nivel de estrés oxidativo (Gautam et al., 2015; Rima et al., 2016). Los padres con hijos con retinoblastoma tienen mayores niveles de DNA espermático fragmentado ( $31,50 \pm 6,67\%$ ) que los padres de hijos sin retinoblastoma ( $21,9 \pm 9,4\%$ ,  $p < 0,01$ ) (Rima et al., 2016).

En conejos, se ha reportado recientemente que la tasa de mortinatos fue mayor para los padres con mayor variación en la fragmentación del DNA durante la incubación del semen ( $>0,5$  unidades por hora) en comparación con la de aquellos con una variación menor a 0,5 unidades por hora y que además el riesgo de una cría mortinata fue más alto para los conejos con mayor fragmentación del DNA espermático durante la incubación del semen (Jhonston et al., 2016). Mientras que en ratones generados por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con DNA fragmentado se observó una mayor mortalidad a las 25 semanas de edad, síntomas de envejecimiento prematuro, obesidad, organomegalias, mayor frecuencia de tumores y alteraciones de la conducta y la memoria (Fernández-González et al., 2008) y también que los machos generados por ICSI con espermatozoides con DNA fragmentado produjeron menos espermatozoides, presentaron más células testiculares apoptóticas y fueron menos fértiles; así los machos generados por ICSI con espermatozoides con DNA fragmentado preñaron el  $49,9 \pm 5,2\%$  de las hembras servidas en comparación con el  $86,5 \pm 3,1\%$  ( $p < 0,05$ ) logrado por los machos originados por monta natural, observándose además mayor reabsorción embrionaria y momificaciones fetales en las hembras preñadas por machos originados por ICSI con espermatozoides con DNA fragmentado (Ramos-Ibeas et al., 2014). En la *Gazella cuviere*, se observó una mortalidad del 80% ( $p < 0,05$ ) en las crías provenientes de padres que tenía un nivel mayor al 15% de fragmentación del DNA espermático en comparación con el 26% en aquellas crías cuyos padres tenían menos del 15% de espermatozoides con DNA fragmentado (Ruiz-López et al., 2010b).

## ALTERNATIVAS PARA DISMINUIR EL DAÑO EN LA CROMATINA ESPERMÁTICA

Diferentes alternativas podrían plantearse a fin de disminuir la presencia de espermatozoides con cromatina dañada. Entre las consideraciones más importantes está la de garantizar la salud testicular y epididimaria, los animales deben disfrutar de condiciones adecuadas de alojamiento, salud y alimentación, además los esquemas de vacunaciones deberían ser revisados a fin de que se minimicen los efectos negativos sobre la calidad seminal, especialmente si las vacunaciones coinciden con las épocas calurosas del año. Adicional a esto, la evaluación frecuente de la cromatina espermática debe ser la regla y no la excepción, a fin de evidenciar la existencia de un problema y evaluar la influencia de factores climáticos y de manejo sobre la integridad de la cromatina y para esto un buen número de técnicas están disponibles; si bien varían en metodologías, costos y equipos necesarios; algunas técnicas como las tinciones con azul de toluidina, azul de anilina y Diff Quik, aunque con algunas limitantes, son alternativas económicas, rápidas y sencillas, aplicables tanto a nivel de campo como de laboratorio y que permiten a su vez la evaluación simultánea de la morfología y la morfometría espermática.

Dado el carácter heredable del daño en la cromatina (Karoui et al., 2012) y la relación positiva con la consanguinidad (Karoui et al., 2002; Ruiz-López et al., 2010a; Petrovic et al., 2013) la evaluación continua del daño en la cromatina permitiría tener indicios sobre su causa, si se debe a un evento externo puntual o un problema permanente, posiblemente de carácter genético, lo que facilitaría la exclusión de sementales con un nivel alto de daño. A su vez el diseño de un plan de cruzamientos que evite el apareamiento de animales emparentados a fin de disminuir la consanguinidad tendría un impacto importante en la calidad seminal de la progenie.

Seleccionar sementales y/o hijos de sementales con una buena circunferencia escrotal, según la edad, debería repercutir en una mejora de la calidad seminal como ha sido reportado, y también sobre la integridad de la cromatina. Fortes et al., 2014, observaron una correlación negativa entre la circunferencia escrotal en toros a los 18 y 24 meses de edad y el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado ( $r = -0,25$  y  $-0,19$ ,  $p < 0,05$ ) y con el porcentaje de espermatozoides deprotaminados ( $r = -0,18$  y  $-0,24$ ,  $p < 0,05$ ), y estos resultados refuerzan hallazgos previos en los que se ha observado una relación positiva entre la circunferencia escrotal, la producción y la calidad espermática (Vazquez et al., 2003; Kealey et al., 2006; Devkota et al., 2008).

El estrés oxidativo ha sido reportado como una causa importante de daño a la cromatina espermática, por lo que la medición de la producción de ROS y la capacidad antioxidante del semen o la resistencia al estrés oxidativo del semen y los sementales, podría permitir seleccionar mejores sementales y/o eyaculados. Simoes et al., 2013, reportaron que el semen con menos susceptibilidad de sufrir estrés oxidativo tuvo un menor nivel de espermatozoides con fragmentación del DNA y generó una mayor tasa de división embrionaria, observándose una correlación positiva entre la producción de ROS y el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado ( $r = 0,416$ ,  $p = 0,009$ ) y negativa con la tasa de división embrionaria ( $r = -0,417$ ,  $p = 0,009$ ) y la tasa de blastocistos ( $r = -0,367$ ,  $p = 0,023$ ). Además, se ha reportado que la época del año y la edad de los toros influyen la actividad antioxidante del plasma seminal, los espermatozoides y el plasma sanguíneo, con los toros más jóvenes teniendo menor capacidad antioxidante y en especial durante el verano (Balic et al., 2012). En conjunto, estos resultados son de gran interés ya que pueden permitir tomar decisiones sobre las épocas de colección de semen y los periodos de descanso a fin de maximizar las colecciones durante los meses menos estresantes; además, la identificación de sementales cuyo semen tenga mayor resistencia al estrés oxidativo podría disminuir el daño a la cromatina espermática. Gürler et al., 2015, observaron que la capacidad antioxidante total del plasma seminal varió entre toros, pero no entre los eyaculados del mismo toro, con el factor toro contribuyendo a más del 80% de la variabilidad de la capacidad antioxidante total y de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa; mientras que Hering et al., 2015, observaron que los toros con el genotipo TT en el gen ETFA (Electro-Transfer-Flavoprotein Alpha polypeptide) producen espermatozoides con mayor actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa lo que los podría proteger de forma más eficiente de las ROS. Adicionalmente, algunos tratamientos podrían aumentar la capacidad antioxidante de los animales. En ratones, la administración en el agua de bebida durante ocho semanas de una formulación antioxidante comercial (Fertilix<sup>®</sup>, CellOxess, Princenton, NJ, USA) compuesta principalmente por carnitina, ácido fólico, licopeno, selenio, vitamina C, vitamina E y zinc, disminuyó el efecto del estrés oxidativo y térmico sobre la integridad del DNA espermático y la fertilidad (Gharagozloo et al., 2016).

En rumiantes y especialmente en vacunos, el semen congelado es ampliamente usado a nivel mundial por lo que mejorar el proceso de criopreservación es crucial para mejorar la calidad del semen, disminuir la incidencia de espermatozoides con daño en la cromatina y por tanto mejorar la fertilidad, y esto cobra gran importancia teniendo en cuenta que el daño a la cromatina es un defecto no compensable, el cual genera una falla reproductiva que no puede ser solventada por el incremento en el número de espermatozoides inseminados (Kastelic, 2013; Saacke, 2013). Una mejora en la selección de los eyaculados se hace necesaria, y para esto se debería incluir la evaluación de la calidad de la cromatina como criterio para decidir si un eyaculado es congelable o no; además la evaluación de la capacidad del semental o de un eyaculado en particular, de promover un desarrollo embrionario normal hasta el estadio de blastocisto a través de la inseminación de hembras superovuladas o la fecundación in vitro, antes de la comercialización del semen, sería una alternativa para garantizar que ese semen posee pocos defectos no compensables.

Por otro lado, la elección del diluyente y el protocolo de criopreservación deberían adaptarse a cada individuo, a fin de mejorar la crioresistencia espermática. El efecto de la criopreservación sobre la integridad de la cromatina espermática es dependiente del diluyente y del crioprotector utilizado (Karabinus et al., 1991; Dobrinski et al., 1994; Celeghini et al., 2008; Waterhouse et al., 2010; Tasdemir et al., 2013; Büyükleblebici et al., 2014); además la curva de congelamiento podría afectar la integridad de la cromatina, así en semen caprino, la tasa de enfriamiento ha sido reportada por afectar la integridad de la cromatina, con las tasas de  $-10$  y  $-24$  °C por minuto generando el mayor daño (Ustener et al., 2015). Adicionalmente, diferentes aditivos han sido evaluados como una alternativa para mejorar la calidad del semen. La carnitina, el inositol y la metionina, previnieron el efecto dañino de la criopreservación sobre la integridad de la cromatina (Bucak et al., 2010). En semen de ovejo, la adición de rafinosa o hipotaurina disminuyó el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada (6,2% y 3,9%) en comparación con el control (9,1%,  $p < 0,05$ ) (Bucak et al., 2013) y esto también fue observado en semen caprino congelado en un diluyente suplementado con metionina o rafinosa (Tuncer et al., 2010). La congelación del semen de toro en un diluyente a base de TCM-199 suplementado con cisteína redujo el daño en el DNA en comparación con el control y otros antioxidantes (Sarıözkan et al., 2014) y de forma similar en semen de búfalos, la adición de L-cisteína (2 mM) en el diluyente de congelación, mejoró la capacidad antioxidante, la integridad de la cromatina e incrementó la fertilidad del semen (Iqbal et al., 2016b) y esto también fue observado cuando el diluyente se suplementó con trehalosa (Iqbal et al., 2016a), glutatión (Ansari et al., 2012) o ácido araquidónico (Ejaz et al., 2014).

En semen criopreservado de toros Holstein, el uso de fetuina y hialuronano, solos o combinados en el diluyente de congelación, disminuyó el porcentaje de espermatozoides con daño en el DNA (Sarıözkan et al., 2015a) y resultados similares fueron observados en semen de toros Brown Swiss con el uso de hialuronano, cisteamina, fetuina o ditioeritritol (Sarıözkan et al., 2015b). La adición de catalasa fue capaz de disminuir el incremento en la fragmentación del DNA durante la incubación, tanto del semen descongelado (Fernández-Santos et al., 2009) como fresco diluido (Krzyzosiak et al., 2000). El tratamiento del semen descongelado con una combinación de 10 µg/mL de zinc, 500 µg/mL D-aspartato y 40 µg/mL de coenzima Q10, previno el incremento en la fragmentación del DNA luego de 3 horas de incubación, mejoró la tasa de blastocistos al día 8 y redujo el porcentaje de blastomeras con DNA fragmentado (Gualtieri et al., 2014); mientras que la crocina, un extracto del azafrán con propiedades antioxidantes, a una concentración de 1 mM, ha sido reportada por evitar el incremento del daño en la cromatina

durante la incubación del semen, disminuir la producción de ROS e incrementar la tasa de blastocitos (Sapanidou et al., 2015).

Los espermatozoides utilizados para la producción in vitro de embriones (PIV), ya sea por fecundación in vitro o inyección intracitoplasmática, al no ser sometidos al proceso de selección natural durante su viaje a través del tracto reproductivo de la hembra que garantiza su calidad (Ardon et al., 2008; Suarez & Pacey, 2006; Hourcade et al., 2010) pueden portar cromatina dañada y comprometer la eficiencia de los sistemas de PIV. Por tanto, la utilización de métodos de selección podría disminuir la incidencia de estos espermatozoides a fin de seleccionar a la subpoblación espermática que garantiza la fecundación y promueva un correcto desarrollo embrionario, la cual estaría compuesta por espermatozoides vivos, motiles, con morfología normal y cromatina intacta (Morrell & Rodríguez-Martínez, 2009). Percoll y swim up han sido los métodos de selección espermática más empleados en rumiantes. Reckova et al., 2007 y Machado et al., 2009, observaron que la selección espermática mediante Percoll aumentó el porcentaje de espermatozoides con cromatina normal, sin embargo, otros han observado un efecto contrario. Urrego et al., 2008, reportaron que la selección mediante Percoll generó un incremento en el daño al DNA (medido con COMET) en comparación con el swim up; mientras que Oliveira et al., 2011, utilizando un protocolo con tres gradientes de Percoll observaron que este disminuyó la condensación de la cromatina en comparación con el control y de manera similar se ha observado en semen caprino que el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado fue mayor luego de la selección espermática a través de un gradiente discontinuo de Percoll (45/90) ( $3,90 \pm 0,85\%$ ) en comparación con el semen no seleccionado ( $1,95 \pm 0,40$ ,  $p = 0,032$ ) (García-Álvarez et al., 2010).

Ante esta situación, la selección espermática mediante la centrifugación en capa única del coloide, parece ser una alternativa para disminuir el daño a la cromatina. Valeanu et al., 2015, utilizando una sola capa de un coloide comercial (Bovipure<sup>®</sup>, Nidacom, Suecia) formulado específicamente para la separación y purificación de espermatozoides de toro reportaron una disminución del porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina en comparación con los espermatozoides no seleccionados; mientras que en semen caprino la selección espermática antes del congelamiento por centrifugación en capa única de un coloide igualmente formulado para semen de toro (Androcoll-B, patente pendiente) disminuyó significativamente el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado con respecto al semen no seleccionado (Jiménez-Rabadán et al., 2012). Otros métodos aplicados en humanos han sido reportados por mejorar la integridad de la cromatina espermática. Chan et al., 2006, observaron que tanto la integridad de la cromatina como la morfología normal y la madurez de la cromatina aumentaron significativamente luego de la selección a través del método zeta, el cual selecciona espermatozoides que conservan la carga negativa de la membrana plasmática. Kheirollahi-Kouhestani et al., 2009, observaron que el método zeta fue más eficiente en comparación con la centrifugación en gradientes de densidad en seleccionar espermatozoides con DNA intacto y que la selección espermática mediante la combinación de la centrifugación en gradientes de densidad con el método zeta, mejoró la tasa de fecundación luego de ICSI. Nosrati et al., 2014, diseñaron un dispositivo de microfluidos con el que lograron disminuir el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del DNA en semen humano hasta en un 83% y tal situación podría ser esperada en semen de toros, en el que se observó una mejora tanto de la motilidad como de la vitalidad luego de la selección con el mismo dispositivo.

## CONCLUSIONES

La evaluación de la cromatina espermática si bien ha cobrado importancia como un factor determinante de la calidad espermática y la fertilidad, no forma parte de las pruebas de rutina tanto a nivel de laboratorio como durante el examen andrológico de los sementales. Su incorporación permitiría la identificación de sementales superiores, así como el control de factores que afectan la integridad de la cromatina y en consecuencia la calidad del semen y la fertilidad en los rebaños, repercutiendo así en la rentabilidad de las empresas tanto productoras y comercializadoras de sementales y de semen congelado, como en los laboratorios de producción in vitro de embriones y las unidades de producción animal.

## REFERENCIAS

- Ahmed H., Andrabi SHM., Anwar M., Jahan S. 2016. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. **Andrologia** doi: 10.1111/and.12639.
- Aitken RJ., De Iulius GN., Baker MA. 2012. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape — oxidative stress DNA damage and apoptosis in the male germ line. **Reproduction in Domestic Animals** 47(Suppl 4):7-14.
- Ansari MS., Rakha BA., Andrabi SM., Ullah N., Iqbal R., Holt WV., Akhter S. 2012. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproductive Biology** 12(3):271-6.
- Anzar M., He L., Buhr MM., Kroetsch TG., Pauls KP. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction** 66:354-360.

- Ardón F., Helms D., Sahin E., Bollwein H., Töpfer-Petersen E., Waberski D. 2008. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. **Reproduction** 135(4):461-70.
- Balhorn R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology** 8:227 doi:10.1186/gb-2007-8-9-227.
- Balić IM., Milinković-Tur S., Samardžija M., Vince S. 2012. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology** 78(2):423-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.022.
- Ballachey BE., Hohenboken WD., Evenson DP. 1987. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction** 36:915-925.
- Bench GS., Friz AM., Corzett MH., Morse DH., Balhorn R. 1996. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. **Cytometry Part A** 23(4):263-271.
- Bissonnette N., Lévesque-Sergerie JP., Thibault C., Boissonneault G. 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. **Reproduction** 138:65-80.
- Bochenek M., Smorag Z., Pilch J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology** 56:557-567.
- Bollwein, H., Fuchs, I., Koess, C. 2008. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals** 43:189-195.
- Bucak MN., Keskin N., Taşpınar M., Çoyan K., Başpınar N., Cenariu MC., Bilgili A., Öztürk C., Kurşunlu AN. 2013. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. **Cryobiology** 67(1):34-9.
- Bucak MN., Tuncer PB., Sariözkan S., Başpınar N., Taşpınar M., Çoyan K., Bilgili A., Akalin PP., Büyükleblebici S., Aydos S., Ilgaz S., Sunguroğlu., Öztuna D. 2010. Effect of antioxidants on post-thawed bovine and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology** 61:248-453.
- Büyükleblebici S., Tuncer PB., Bucak MN., Eken A., Sariözkan S., Taşdemir U., Endirlik BÜ. 2014. Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science** 150(3-4):77-83.
- Carreira JT., Mingoti GZ., Rodrigues LH., Silva C., Perri SH., Koivisto MB. 2012. Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and in-vitro embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica** 54:1 doi: 10.1186/1751-0147-54-1.
- Carreira JT., Trevizan JT., Kipper BH., Perri SHV., Carvalho IR., Rodrigues LH., Silva C., Koivisto MB. 2015. Impaired protamination and sperm DNA damage in a Nellore bull with high percentages of morphological sperm defects in comparison to normospermic bulls. **Arquivo Brasileiro do Medicina Veterinaria e Zootecnia** 67(2):417-423.
- Castro R., Bustos E. 2012. Sperm variables along epididymal transit in pigs undergoing puberty. Proceedings IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction. **Animal Reproduction** 9(4):885.
- Castro LS., Hamilton TRS., Mendes CM., Nichi M., Barnabe VH., Visintin JA., Assumpção MEOA. 2016. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 7:17 doi 10.1186/s40104-016-0076-x.
- Celeghini ECC., De Arruda RP., De Andrade AFC., Nascimento J., Raphael CF., Mazza PH. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science** 104:119-131.
- Chan PJ., Jacobson JD., Corselli JU., Patton WC. 2006. A simple Zeta method for sperm selection based on membrane charge. **Fertility and Sterility** 85:481-486.
- Charles-Ostermeier G., Sargeant GA., Yandell BS., Evenson DP., Parrish JJ. 2001. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology** 22:595-603.
- Devkota B., Koseki T., Matsui M., Sasaki M., Kaneko E., Miyamoto A., Amaya MC., Miyake Y. 2008. Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and postpubertal Holstein bulls. **Journal of Veterinary Medical Science** 70:119-121.
- Dobrinski, I., Hughes, HP., Barth, AD. 1994. Flow cytometer and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility** 101:531-538.
- D'Occhio MJ., Hengstberger KJ., Tutt D., Holroyd RG., Fordyce G., Boe-Hansen GB., Johnston SD. 2013. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. **Theriogenology** 79(6):946-52.
- Dogan S., Mason MC., Govindaraju A., Belser L., Kaya A., Stokes J., Rowe D., Memili E. 2013. Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. **Journal of Reproduction and Development** 59(1):18-26.
- Dogan S., Vargovic P., Oliveira R., Belser LE., Kaya A., Moura A., Sutovsky P., Parrish J., Topper E., Memili E. 2015. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. **Biology of Reproduction** 92(4):92, 1-9
- Dorado J., Morales Cid, R., Molina A., Hidalgo M., Ariza J., Moreno-Millán M., Demyda-Peyrás S. 2015. Effect of inbreeding depression on bull sperm quality and field fertility. **Reproduction, Fertility and Development** doi: 10.1071/RD15324.
- Eid LN., Shamiah ShM., El-Regalaty HAM., El-Keraby FE. 2011. Sperm DNA damage and embryonic development as related to fertility potential of buffalo bulls. **Journal of Animal and Poultry Production Mansoura University** 2(5):65-74.
- Ejaz R., Ansari MS., Rakha BA., Ullah N., Husna AU., Iqbal R., Akhter S. 2014. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. **Reproduction in Domestic Animals** 49(1):122-5.
- Enciso M., Cisale H., Johnston SD., Sarasa J., Fernandez JL., Gosálvez J. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology** 76:23-32.
- Erickson L., Kroetsch T., Anzar M. 2015. Relationship between sperm apoptosis and bull fertility: in vivo and in vitro studies. **Reproduction, Fertility and Development** 28(9):1369-1375 doi:10.1071/RD14417.
- Fatehi AN., Bevers MM., Schoevers E., Roelen BAJ., Colenbrander B., Gadella BM. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology** 27:176-188.

- Fernandes CE., Dode MAN., Pereira D., Silva AEDF. 2008. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology** 70:1560-1568.
- Fernández-Gonzalez R., Moreira Nuno P., Pérez-Crespo M., Sánchez-Martín M., Ramirez MA., Pericuesta E., Bilbao A., Bermejo-Alvarez P., Hourcade J., Rodriguez De Fonseca F., Gutiérrez-Adán A. 2008. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-Fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction** 78:761-772.
- Fernández-Santos MR., Domínguez-Rebolledo AE., Esteso MC., Garde JJ., Martínez-Pastor F. 2009. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology** 32(4):353-359.
- Filho RM., Beletti ME., Oliveira F. 2015. Ultrastructure of bovine sperm chromatin. **Microscopy Research and Technique** 78(12):1117-1120.
- Fortes MRS., Satake N., Corbet DH., Corbet NJ., Burns BM., Moore SS., Boe-Hansen GB. 2014. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. **Andrology** 2:370-378.
- Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A. 2000. Sperm chromatin. **Archives of Andrology** 45:215-225.
- Ganguly I., Gaur GK., Kumar S., Mandal DK., Kumar M., Singh U., Kumar S., Sharma A. 2013. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF×Sahiwal) bulls. **Research in Veterinary Science** 94(2): 256-262.
- García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Ramon M., Del Olmo E., Montoro V., Domínguez-Rebolledo AE., Bisbal A., Jimenez-Rabadan P., Perez-Guzman MD., Soler AJ. 2010. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation night aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology** 74:979-988.
- García-Macías V., De Paz P., Martínez-Pastor F., Álvarez M., Gomes-Alves S., Bernardo J., Anel E., Anel L. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm—Bos—Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology** 30:88-98.
- Gatewood JM., Cook GR., Balhorn R., Bradbury EM., Schmid CW. 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. **Science** 263(4804):962-964.
- Gautam S., Chawla B., Kumar SB., Bisht A., Dada R. 2015. Sperm DNA damage in non-familial sporadic heritable retinoblastoma (NFSHRb). **Clinical Epidemiology and Global Health** 3(Suppl 1):S20-S25.
- Gharagooloo P., Gutiérrez-Adán A., Champroux A., Noblanc A., Kocer A., Calle A., Perez-Cerezales S., Pericuesta E., Polhemus A., Moazamian A., Drevet JR., Aitken RJ. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. **Human Reproduction** 31(2):262-262.
- Gillan L., Kroetsch T., Chis Maxwell WM., Evans G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science** 103:201-214.
- Gonzalez-Marin C., Roy R., Lopez-Fernandez C., Diez B., Carabaño MJ., Fernandez JL., Kjelland ME., Moreno JF., Gozalvez J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: a kinetic experimental approach. **Animal Reproduction Science** 123:139-148.
- Gosálvez J., Vázquez JM., Enciso M., Fernández JL., Gosálbez A., Bridle JR., López-Fernández C. 2008. Sperm DNA Fragmentation in Rams Vaccinated with Miloxan. **The Open Veterinary Science Journal** 2:7-10.
- Gualtieri R., Barbato V., Fiorentino I., Braun S., Rizo D., Longobardi S., Talevi R. 2014. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. **Theriogenology** 82(4):592-8.
- Gürler H., Calisici O., Bollwein H. 2015. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Animal Reproduction Science** 155:99-105.
- Gürler H., Malama E., Heppelmann M., Calisici O., Leiding C., Kastelic JP., Bollwein H. 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology** 86(2):562-571.
- Hallap T., Nagy S., Haard M., Jaakma U., Johannisson A., Rodríguez-Martínez H. 2005. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen in maintained over age in AI bulls. **Theriogenology** 63:1752-1763.
- Hering DM., Lecewicz M., Kordan W., Kamiński S. 2015. Association between ETFA genotype and activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cryopreserved sperm of Holstein—Friesian bulls. **Reproduction in Domestic Animals** 50:168-171.
- Hourcade JD., Pérez-Crespo M., Fernández-González R., Pintado B., Gutiérrez-Adán A. 2010. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends in the type of damage. **Reproductive Biology and Endocrinology** 8:9 doi: 10.1186/1477-7827-8-9.
- Iqbal S., Andrabi SM., Riaz A., Durrani AZ., Ahmad N. 2016a. Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology** 85(5):954-959. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.004.
- Iqbal S., Riaz A., Andrabi SM., Shahzad Q., Durrani AZ., Ahmad N. 2016b. L-Cysteine improves antioxidant enzyme activity, post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Andrologia** doi:10.1111/and.12520.
- Januskauskas A., Johannisson A., Rodríguez-Martínez H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology** 55:947-961.
- Januskauskas A., Johannisson A., Rodríguez-Martínez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology** 60:743-758.
- Jimenez-Rabadan P., Morrell JM., Johannisson A., Ramon M., Garcia-Alvarez O., Maroto-Morales A., Alvaro-García PJ., Perez-Guzman MD., Fernandez-Santos MR., Garde JJ., Soler AJ. 2012. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. **Animal Reproduction Science** 136:47-54.
- Johnston SD., López-Fernández C., Arroyo F., Gosálbez A., Cortés Gutiérrez EI., Fernández JL., Gosálvez J. 2016. Reduced sperm DNA longevity is associated with an increased incidence of still born; evidence from a multi-ovulating sequential artificial insemination animal model. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** doi:10.1007/s10815-016-0754-9

- Johnson G., Lalancette C., Linnemann AK., Leduc F., Boissonneault G., Krawetz SA. 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction** 141:21-36.
- Kadirvel G., Kumar S., Kumaresan A. 2009. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science** 114:125-134.
- Kadirvel G., Periasamy S., Kumar S. 2012. Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. **Reproduction in Domestic Animals** 47:143-150.
- Karabinus DS., Evenson DP., Jost LK., Baer RK., Kaproth MT. 1990. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. **Journal of Dairy Science** 73:2364-2371.
- Karabinus DS., Evenson DP., Kaproth MT. 1991. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull semen. **Journal of Dairy Science** 74:3836-3848.
- Karabinus DS., Vogler CJ., Saacke RG., Evenson DP. 1997. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein Bulls. **Journal of Andrology** 18: 549-555.
- Karoui S., Diaz C., Gonzalez-Marin C., Amenabar ME., Serrano M., Ugarte E., Gosalvez J., Roy R., Lopez-Fernandez C., Carabaño MJ. 2012. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility?. **Journal of Animal Science** 90:2437-2449.
- Karunakan M., Devanathan TG. 2016. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **Journal of Applied Animal Research** doi: 10.1080/09712119.2015.1129343.
- Kastelic JP. 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in Bulls. **Animal Frontiers** 3(4):20-25.
- Kealey CG., MacNeil MD., Tess MW., Geary TW., Bellows RA. 2006. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. **Journal of Animal Science** 84: 283-290
- Khalifa TAA., Rekkas CA., Lymberopoulos AG., Sioga A., Dimitriadis I., Papanikolaou T. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 104:143-163.
- Khalifa T., Lymberopoulos AG. 2011. Chromatin integrity and fertility in frozen ram spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals** 46(Suppl 3):118 (Abstract P140).
- Khalifa T., Lymberopoulos A. 2013. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. **Cell and Tissue Banking** 14(4):687-698.
- Kheirollahi-Kouhestani M., Razavi S., Tavalae M., Deemeh MR., Mardani M., Moshtaghian J., Nasr-Esfahani MH. 2009. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. **Human Reproduction** 24(10):2409-2416.
- Kipper BH., Trevizan JT., Carreira JT., Carvalho IR., Mingoti GZ., Beletti ME., Perri SHV., Franciscato DA., Pierucci JC., Koivisto MB. 2016. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology** <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.017>
- Koonjaenak S., Johannisson A., Pongpeng P., Wirojwuthikuls., Kunavongkrit A., Rodriguez-Martinez H. 2007. Seasonal variation in nuclear DNA integrity of frozen-thawed spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of Veterinary Medicine Series A** 54:377-383.
- Kosower, NS., Katayose, H., Yanagimachi, R. 1992. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. **Journal of Andrology** 13:342-348.
- Krzyzosiak J., Evenson D., Pitt C., Jost L., Molan P., Vishwanath R. 2000. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction Fertility and Development** 12(5-6):251-61.
- Kumar R., Jagan Mohanarao G., Arvind, Atreja SK. 2011. Freeze-thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. **Molecular Biology Reports** 38:1499-1506.
- Kumar D., Kumar P., Singh P., Yadav SP., Yadav PS. 2012. Buffalo-bull semen-fertility evaluation in relation to motility and integrity of acrosome, plasma membrane, and sperm DNA. **Reproduction, Fertility and Development** 25(1):180-180 (Abstract 66).
- Kumar D., Kumar P., Singh P., Yadav SP., Yadav PS. 2016. Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. **Cytotechnology** 68(3):451-458.
- Kumar D., Upadhy D., Salián SR., Rao SBS., Kalthur G. 2013. The extend of paternal sperm DNA damage influences early post-natal survival of first generation mouse offspring. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 166(2):164-167.
- Kutchy NA., Mukhopadhyay CS., Brah GS., Arora JS. Identifying molecular and spermatological markers to detect sperm chromatin fragmentation. **Indian Journal of Animal Science** 84(3):267-270.
- Lalancette C., Thibault C., Bachand I., Caron N., Bissonnette N. 2008. Transcriptome Analysis of Bull Semen with Extreme Nonreturn Rate: Use of Suppression-Subtractive Hybridization to Identify Functional Markers for Fertility. **Biology of Reproduction** 78:618-635.
- Lewis SE., Aitken RJ. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research** 322:33-41.
- Lewis SEM., Kumar K. 2015. The paternal genome and the health of the assisted reproductive technology child. **Asian Journal of Andrology** 17:1-7.
- Machado GM., Carvalho JO., Siqueira Filho E., Caixeta ES., Franco MM., Rumpf R., Dode MAN. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology** :1289-1297.
- Madrid-Bury N., Pérez-Gutiérrez JF., Pérez-Garnelo S., Moreira P., Pintado Sanjuanbenito B., Gutiérrez-Adán A., De La Fuente Martínez J. 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of Deep frozen bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 64:232-241.
- Mahmoud KGHM., El-Sokary AAE., Abdel-Ghaffar AE., Abou El-Roos MEA., Ahmed YF. 2015 analysis of chromatin integrity and DNA damage of buffalo spermatozoa. **Iranian Journal of Veterinary Research** 16(2):161-166.
- Malama E., Kioussis E., Theodosiou T., Boscos C., Bollwein H. Lag effect of microclimatic conditions on DNA integrity of frozen-thawed bovine sperm. **Animal Reproduction Science** 136(1-2):33-41.

- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. 2004. Cryopreservation induces an apoptotic-like mechanism in bull sperm. **Biology of Reproduction** 71:28-37.
- Morrell JM., Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal** 1:1-9.
- Mukhopadhyay CS., Gupta AK., Yadav BR., Chauhan IS., Aparna G., Mohanty TK., Raina V.S. 2011. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Livestock Science** 136:114-121.
- Nagy S., Johannisson A., Wahlsten T., Ijäs R., Andersson M., Rodriguez-Martinez H. 2013. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology** 79:1153-1161.
- Nandre R., Derashri H., Joshi C. 2011. Evaluation of buffalo bull spermatozoa DNA damage using single cell gel electrophoresis. **International Journal of Life Science & Pharma Research** 1(1): 38-43.
- Nava-Trujillo H., Hernández-Fernández A., Quintero-Moreno A. 2012. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Revista Científica FCV-LUZ** 22(3):211-216.
- Nava-Trujillo H., Quintero-Moreno A., Hernández-Fernández A., Vilchez-Siu V., Osorio-Meléndez C., Rubio-Guillen J., González-Villalobos D., Finol-Parra G. 2013. Efecto de la integridad de la cromatina sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide de toro. **Revista Científica FCV-LUZ** 23(1):67-72.
- Nava-Trujillo H., Quintero-Moreno A. 2013. Los espermatozoides bovinos con cromatina alterada están distribuidos morfométricamente en distintas subpoblaciones. **AIDA (XV Jornadas sobre Producción Animal) Tomo I:419-421**
- Nava-Trujillo H., Quintero-Moreno A., Finol-Parra G., Vilchez-Siu V., Osorio-Meléndez C., Rubio-Guillen J., Valeris-Chacin R. 2011. Relationship among the damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved semen from Brahman bulls. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias** 24:116-122.
- Noblanc A., Kocer A., Derevet JR. 2014. Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge. **Basic and Clinical Andrology** 24:6.
- Nosrati R., Vollmer M., Eamer L., San Gabriel MC., Zeidan K., Zini A., Sinton D. 2014. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. **Lab on a Chip** 14(6):1142-50.
- Nur Z., Zik B., Ustener B., Sagirkaya H., Ozguden CG. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. **Theriogenology** 73:1267-1275.
- Nur Z., Zik B., Ustener B., Tutuncu S., Sagirkaya H., Ozguden CG., Gunay U., Dogan I. 2011. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 58:267-272.
- Oliva R. 2006. Protamines and male fertility. **Human Reproduction Update** 12:417-435.
- Oliva R., Dixon GH. 1991. Vertebrate protamine genes and the histone-protamine replacement reaction. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology** 40:25-94.
- Oliveira LZ., Dos Santos MR., Hossepian De Lima VF., Paes de Arruda R., De Andrade AFC., Junior VG., Beletti ME. 2011. Chromatin and morphometry alterations of bovine sperm head after Percoll™ density gradient centrifugation. **Livestock Science** 141:267-271
- Oliveira RV., Dogan S., Belser LE., Kaya A., Topper E., Moura A., Thibaudeau G., Memili E. 2013. Molecular morphology and function of bull sperm linked to histones and associated with fertility. **Reproduction** 146:263-272.
- Osorio C., Quintero Moreno A., Nava-Trujillo H., Rubio-Guillen J., Madrid-Bury N., González R. 2011. Determinación de la integridad de la cromatina espermática en semen fresco de búfalos utilizando la tinción con azul de toluidina. **Memorias IV Jornadas Nacionales de Investigación en Reproducción Animal, FCV-UCV. Maracay Venezuela.**
- Panigrahi SK., Yadav BR. 2010. Polymorphism in TNP-1 gene of Murrah buffalo bulls. **African Journal of Biotechnology** 9(43):7224-7229.
- Pawar K., Kaul G. 2011. Assesment of buffalo (Bubalus bubalis) sperm DNA fragmentation using a sperm chromatin dispersion test. **Reproduction in Domestic Animals** 46:964-969.
- Pérez-Cereales S., Miranda A., Gutiérrez-Adán A. 2012. Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis. **Asian Journal of Andrology** 14:335-337.
- Peris SI., Morrier A., Dufour M., Bailey J. 2004. Cryopreservation of ram sperm facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology** 25:224-233.
- Petrovic VC., Maksimovic N., Petrovic MP., Petrovic MM., Ilic ZZ., Muslic R., Mikulec DP. 2013. Effect of inbreeding on body growth traits and sperm DNA fragmentation level in rams. **Animal Science Papers and Reports** 31(1):27-33.
- Poccia D. 1986. Remodeling of nucleoproteins during spermatogenesis fertilization and early development. **International Review of Cytology**. 105:1-65.
- Puglisi R., Pozzi A., Foglio L., Spano M., Eleuteri P., Grollino MG., Bongioni G., Galli A. 2012. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimate in vivo. **Animal Reproduction Science** 132:17-28.
- Rahman MB., Vandaele L., Rijsselaere T., Maes D., Hoogewijs M., Frijters A., Noodman J., Gradanos A., Dernelle E., Shamsuddin M., Parrish JJ., Van Soom A. 2011. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology** 76:1246-1257.
- Ramon M., Salces-Ortiz J., Gonzalez C., Perez-Guzman MD., Garde J., Garcia-Alvarez O., Maroto-Morales A., Calvo JH., Serrano MM. 2014. Influence of the temperature and the genotype of the HSP90AA1 gene over sperm chromatin stability in manchega rams. **Plos One** 9(1): e86107 doi:10.1371/journal.pone.0086107.
- Ramos-Ibeas P., Calle A., Fernández-González R., Laguna-Barraza R., Pericuesta E., Calero A., Ramírez MA., Gutiérrez-Adán A. 2014. Intracytoplasmic sperm injection using DNA-fragmented sperm in mice negatively affects embryo-derived embryonic stem cells, reduces the fertility of male offspring and induces heritable changes in epialleles. **Plos One** 9(4): e95625. doi: 10.1371/journal.pone.0095625.
- Revay T., Nagy S., Kopp C., Flyckt A., Rens W., Rath D., Hidas A., Kovacs A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H., Andersson M. 2009. Macrocephaly in bulls spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation. 2009. **Cytogenetic and Genome Research** 126:202-209.
- Rečková Z., Machatková M., Rybář R., Máchal L. 2007. Monitoring of chromatin integrity changes in the population of motile bovine sperm capacitated in vitro. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis** 15(2):65-70.

- Rima D., Shiv BK., Bhavna Ch., Shilpa B., Saima Kh. 2016. Oxidative Stress Induced Damage to Paternal Genome and Impact of Meditation and Yoga - Can it Reduce Incidence of Childhood Cancer?. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** 17(9):4517-4525.
- Rubio-Guillén J., Quintero-Moreno A., González-Villalobos D. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. **Revista Científica FCV-LUZ**. XIX:382-389.
- Ruiz-Lopez MJ., Evenson D.P., Espeso G., Gomendio M., Roldan ERS. 2010a. High levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. **Biology of Reproduction** 83:332-338.
- Ruiz-Lopez M.J., Espeso G., Evenson DP., Roldan ERS., Gomendio M. 2010b. Paternal levels of DNA damage in spermatozoa and maternal parity influence offspring mortality in an endangered ungulate. **Proceedings of the Royal Society** 277:2541-2546.
- Saacke RG. 2013. Insemination related factors affecting fertilization in estrous synchronized cattle. In: **Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle** pp 105-118. October 15-16, 2013. Staunton, VA, USA
- Sailer B., Jost L., Evenson D. 1995. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **Journal of Andrology** 16:80-87.
- Salces-Ortiz J., Ramon M., Gonzalez C., Perez-Guzman MD., Garde JJ., Garcia-Alvarez O., Maroto-Morales A., Calvo JH., Serrano MM. 2015. Differences in the ovine HSP90AA1 gene expression rates caused by two linked polymorphisms at its promoter affect rams sperm DNA fragmentation under environmental heat stress conditions. **Plos One** 10(1):e0116360 doi: 10.1371/journal.pone.0116360.
- Sapanidou V., Taitzoglou I., Tsakmakidis I., Kourtzelis I., Fletouris D., Theodoridis A., Zervos I., Tsantarliotou M. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. **Theriogenology** 84(8):1273-1282.
- Sariözkan S., Bucak Numan M., Tuncer Barbarous P., Büyükleblebici S., Eken A., Akay C. 2015a. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen. **Cryobiology** 71:119-124.
- Sariözkan S., Tuncer PB., Büyükleblebici S., Bucak MN., Cantürk F., Eken A. 2015b. Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull. **Andrologia**. 2015 Mar;47(2):138-47.
- Sariözkan S., Bucak NM., Tuncer PB., Büyükleblebici S., Cantürk F. 2014. Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. **Cryobiology** 68:129-133.
- Selvaraju S., Somashekar L., Krishnan BB., Parthipan S., Pushparani G., Arangasamy A., Rajendran D., Ravindra JP. 2015. Relationship between seminal plasma tuberoinfundibular peptide of 39 residues and sperm functional attributes in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction, Fertility and Development** doi.org/10.1071/RD15008
- Shoaib M., Ahmad N., Ahmad M., Ahmad I., Iqbal S., Akhter S. 2014. Effects of storage duration on the quality and DNA integrity of Nili-Ravi bull spermatozoa frozen and stored in liquid nitrogen. **Pakistan Veterinary Journal** 34(2):205-208.
- Siklenka K., Erkek S., Godmann M., Lambrot R., McGraw S., Laffleur C., Cohen T., Xia J., Suderman M., Hallett M., Trasler J., Peters A.H., Kimmins S. 2015. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. **Science** 6;350(6261):aab2006. doi: 10.1126/science.aab2006
- Simoães R., Feitosa WB., Perez Siqueira AF., Nichi M., Paula-Lopes FF., Marques MG., Peres MA., Barnabe VH., Visintin JA., Assumpção MEO. 2013. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction** 146:433-441.
- Singh RK., Kumaresan A., Shivani C., Rajak SK., Tripathi UK., Nayak S., Datta TK., Mohanty TK., Malhotra R. 2016. Identification of suitable combinations of in vitro sperm function test for the prediction of fertility in buffalo bull. **Theriogenology** doi 10.1016/j.theriogenology.2016.07.022.
- Sotolongo B., Lino E., Ward WS. 2003. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. **Biology of Reproduction** 69:2029-2035.
- Suarez SS., Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update** 12(1):23-37.
- Tanphaichitr N., Sobhon P., Taluppeth N., Chalermisarachai P. 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. **Experimental Cell Research** 117(2): 347-356.
- Taşdemir U., Büyükleblebici S., Tuncer PB., Coşkun E., Özgürtaş T., Aydın FN., Büyükleblebici O., Gürkan İS. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. **Cryobiology** 66(1):38-42.
- Tuncer PB., Bucak NM., Sariözkan S., Sakin F., Yeni D., Çiğerci İH., Ateşşahin A., Avdatek F., Gündoğan M., Büyükleblebici O. 2010. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. **Cryobiology** 61: 89-93.
- Urrego R., Ríos A., Olivera Ángel M., Camargo O. 2008. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias** 21:19-26.
- Ushewa A., Avramova Z., Tsanev R. 1982. Tightly bound somatic histones in mature ram sperm nuclei. **FEBS LETTERS** 138(1):50-54.
- Ustener B., Nur Z., Alcay S., Toker MB., Sagirkaya H., Soylu MK. 2015. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 39:110-114.
- Valeanu S., Drugociu D., Rosca P. 2015. Effect of Single layer centrifugation using Bovipure on frozen-thawed bovine sperm during a 6 hours survival test. **Romanian Biotechnological Letters** 20(2):10327-10333
- Vásquez L., Vera O., Arango J. 2003. Testicular growth and semen quality in peripuberal Brahman bulls. **Livestock Research for Rural Development** 15(Article 76) Retrieved August 9, 2016. From <http://www.lrrd.org/lrrd15/10/vasq1510.htm>
- Ward WS. 1993. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction** 48:1193-1201.
- Ward WS. 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction** 16(1):30-36.
- Ward WS., Coffey DS. 1991. DNA packaging & organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**. 44:569-74.
- Waterhouse KE., Haugan T., Kommisrud E., Tverdal A., Flatberg G., Farstad W., Evenson DP., De Angelis PM. 2006. Sperm DNA damage is related to field fertility

of semen from young Norwegian red bulls. **Reproduction Fertility and Development** 18:781-788.

Waterhouse KE., Gjeldnes A., Tverdal A., De Angelis PM., Farstad W., Håarde M., Kommisrud E. 2010. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science** 117:34-42.

Zini A., Bielcki R., Phang D., Zenzes MT. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility** 75:674-671.