

TÉCNICAS DE ESTUDIO PARA LA EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

STUDY TECHNIQUES FOR THE EVALUATION OF DNA DAMAGE AND ITS APPLICATION IN ANIMAL PRODUCTION

Cristina Viviana Álvarez Gonçalvez, Flavia Elisa Arellano y Alejo Leopoldo Pérez Carrera
(Instituto de Investigaciones en Producción Animal [INPA - UBA – CONICET],
Centro de Estudios Transdisciplinarios del agua [CETA – UBA]) - Argentina

Resumen

Los animales de producción en muchas ocasiones se encuentran expuestos a diversos tipos de contaminantes de origen natural como antrópico. Se ha comprobado que muchos de estos compuestos presentan efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Estudiar el impacto de la exposición de los animales a concentraciones elevadas de contaminantes y su acumulación en diferentes tejidos y secreciones es de suma importancia debido a que podría tener implicancias en la salud animal, pérdida de rentabilidad para el productor y riesgo para los consumidores. Uno de los parámetros que puede estudiarse es el daño al ADN. A lo largo de los años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten evaluar de modo directo o indirecto cómo afectan distintas sustancias al material genético. Sin embargo, a pesar de que muchas de ellas se encuentran ampliamente utilizadas tanto para la investigación en células humanas y animales así como en clínica humana, su aplicación en el marco de la producción animal es más reducida, se centra en el estudio de células germinales. El objetivo de esta revisión es ofrecer una compilación de técnicas que pueden utilizarse para el estudio del daño al ADN, y mostrar cómo estas han sido usadas en el ámbito de la producción animal para la evaluación del impacto de distintas sustancias y otros factores en especies tradicionales y no tradicionales.

Palabras clave: producción animal, toxicogenética, daño en ADN.

Abstract

Production animals often are exposed to many types of natural and anthropogenic contaminants origin. Many of these compounds exhibit mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects. Study the impact of the exhibition to high concentrations of pollutants and their accumulation in different animals tissues and secretions is critical.

It could have implications for animal health, low profitability for producers and risk consumers. One of the parameters that can be studied is DNA damage. Over the years numerous techniques have been developed that allow direct or indirect assessment of several substances as affecting genetic material mode. However, although many of them are widely used for both research on human cells and animal model and in human clinical application in the context of animal production is reduced by focusing on the study of stem cells. The objective of this review is to provide a compilation of techniques that can be used to study DNA damage, and show how they have been used in the field of animal production for assessing the impact of different substances and other traditional and nontraditional species.

Keywords: animal production, toxicogenetic, DAN damage.

Introducción

Los animales de producción en muchas ocasiones se encuentran expuestos a diversos tipos de contaminantes tanto de origen natural como antrópico. Se ha comprobado que muchos de estos compuestos presentan efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (Li *et al.*, 2006; Samal y Mishra, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Ermler *et al.*, 2013; Shekhar *et al.*, 2014; Vulić *et al.*, 2015). Un ejemplo de relevancia en la Argentina es el caso del arsénico (As), presente de forma natural en el agua de bebida del ganado en diferentes regiones del país (Pérez Carrera *et al.*, 2005). Los efectos y el daño al ADN que los diversos compuestos producen se hallan, en algunos casos, bien estudiados. Sin embargo, la mayoría de estas experiencias no se han enfocado en especies de producción (bovinos, porcinos, ovinos, caprinos).

Se hace importante entonces considerar que la exposición de los animales a concentraciones elevadas de contaminantes y su acumulación en diferentes tejidos y secreciones (como la leche) podría tener implicancias en la salud animal y, además, ser un riesgo para la persona que lo consume (Arellano *et al.*, 2014). Los compuestos genotóxicos, por su parte, pueden dañar a los animales a corto y largo plazo, lo que se traduce en una baja de la producción y sus consecuentes pérdidas económicas. Estudiar los efectos de compuestos genotóxicos en los animales de producción y evaluar el daño al ADN que estos implican es fundamental para ayudar a entender la acción de estas sustancias sobre el material genético y su relación con distintas alteraciones metabólicas y enfermedades, y también como información de base a la hora de diseñar estrategias que mejoren la rentabilidad, minimizando así los efectos adversos sobre la salud y la producción animal.

Para evaluar el impacto de una sustancia sobre la salud animal se usan biomarcadores de varios tipos: de efecto, de susceptibilidad y de exposición. Los primeros indican cuando se producen efectos genotóxicos por los xenobióticos y, entre ellos, encontramos el grado de daño al ADN. Existen diversos eventos que conducen al daño: la exposición a elementos traza inorgánicos, diversos procesos fisiológicos durante la replicación del ADN por fallos en la actividad de las enzimas o por reacciones hidrolíticas, metilaciones no enzimáticas y reacciones de óxido-reducción. Se ha demostrado, por ejemplo, que las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las del nitrógeno (RNS) pueden conducir a la producción de daños en el ADN (Valko *et al.*, 2006). Cualquier elemento traza que produzca estrés oxidativo en el organismo podría, en principio, perjudicar el material genético. Existen evidencias sobre la relación entre algunos elementos traza, a los que los animales de producción se encuentran expuestos de modo natural, tales como V y As, y el estrés oxidativo (Rana *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2012; Dash *et al.*, 2015).

El objetivo de esta revisión es ofrecer una compilación de aquellas técnicas que pueden utilizarse para el estudio del daño al ADN, y mostrar cómo han sido utilizadas en distintas especies tradicionales de producción animal, como la porcina, bovina, ovina, caprina, entre

otras. Se ha tenido en cuenta la complejidad de cada una de ellas, sus principales ventajas y desventajas. Asimismo, se intentará profundizar en el estudio de la genotoxicidad en la producción animal, con especial énfasis en los daños al ADN relacionados con elementos traza inorgánicos. Conocer más profundamente los tipos y la prevalencia de daño al ADN por diversos elementos traza que son incorporados con mediante la ingesta de alimentos o agua de bebida es esencial para comprender los procesos y la influencia del daño de origen exógeno en la inducción de enfermedades y su relación con la productividad.

Aplicaciones de la genética toxicológica en la producción animal

El estudio sobre el daño al ADN ocasionado por factores químicos, físicos y biológicos en células somáticas y germinales, que permite entender los procesos de mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis, entre otros, es de especial interés para la producción animal. La Genética Toxicológica es la rama de la ciencia que estudia el impacto de los distintos contaminantes y su interacción con el ADN (Guachalla y Ascarrunz, 2003). En el contexto pecuario, este estudio se ha centrado principalmente en el análisis de los efectos en células germinales, utilizándose frecuentemente en el área de reproducción asistida, donde la calidad de los espermatozoides usados para inseminar a las hembras debe elegirse con sumo cuidado (Rincón *et al.*, 2002). Sin embargo, estas técnicas pueden ser utilizadas en la evaluación del daño cromosómico en células somáticas, relacionado con procesos como la carcinogénesis, enfermedades infecciosas, metabólicas, etcétera (Picco *et al.*, 2006).

Metodologías para la evaluación del daño al ADN

En principio, no todas las estrategias para abordar el estudio del daño al ADN son aplicables a todos los tipos celulares, pero son de gran utilidad en el momento de determinar el impacto de diversas sustancias a las cuales se hallan expuestos los animales, brindando así información valiosa a la hora de diseñar estrategias y

recomendaciones de manejo que permitan maximizar la producción, asegurando tanto la sustentabilidad de las producciones como la calidad y la inocuidad de los alimentos.

A continuación presentamos las principales características, ventajas y desventajas de algunas técnicas de variado costo y complejidad que pueden usarse para evaluar el daño al ADN producido por la exposición a diferentes contaminantes en los sistemas de producción animal. Asimismo, recopilamos trabajos que ejemplifican su utilización en diversas especies de producción y evidencian la escasez de estudios y aplicación de algunas técnicas en el sector pecuario, que son ampliamente usadas en el estudio de los efectos de distintas sustancias y agentes en el ser humano.

Test de Azul de Toluidina (AT)

Este test permite detectar daño potencial y susceptibilidad a la desnaturalización, al diferenciar entre dos empaquetamientos del ADN. Uno con histonas, más laxo; y el otro con protaminas, más condensado. Se utiliza típicamente para estudios espermáticos, ya que durante la maduración de los espermatozoides, el ADN se condensa más de lo normal gracias a las protaminas. La técnica implica la tinción de las células con azul de toluidina y la observación de los preparados resultantes en el microscopio óptico. El azul de toluidina, un colorante metacromático, interacciona con la cromatina, con abundancia de lisina, dando lugar a una coloración púrpura o azul intensa. En cambio, cuando interacciona con cromatina rica en protaminas, la coloración se vuelve azul pálida o verdosa (Andretta *et al.*, 1995).

Si bien directamente la técnica nos habla del nivel de compactación del ADN, indirectamente nos da una idea de su susceptibilidad a los daños, dado que los espermatozoides con cromatina más laxa podrían presentar mayor daño. Esta técnica tiene como ventaja su bajo costo y fácil elaboración, y como principal desventaja, la baja reproducibilidad y la difícil valoración de las coloraciones intermedias. Ha sido usada en varias especies de producción tradicional, como el caballo (*Equus caballus*) (Naves *et al.*, 2004; Sardoy *et al.*, 2008), el conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

(Beletti y Mello, 2004) y la vaca (*Bos taurus*) (Beletti *et al.*, 2005), y en especies de producción no tradicional, como la llama (*Lama lama*) (Carretero *et al.*, 2012a; Carretero *et al.*, 2012b; Da Luz *et al.*, 2012), el guanaco (*Lama guanicoe*) (Carretero *et al.*, 2010a) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Carretero *et al.*, 2010b). Se ha usado también para detectar el daño al ADN producido por diversas sustancias y para testear el efecto de agentes físicos (Felipe-Pérez *et al.*, 2009). En el trabajo realizado por Carretero *et al.* (2012c), la prueba fue aplicada para el estudio de los efectos del enfriamiento y de la adición de colagenasa en la condensación del ADN de esperma de llama. Se observó un aumento en la descondensación del ADN por efecto del congelamiento, pero no por la colagenasa.

Test de Azul de Anilina (AA)

Es similar al de azul de toluidina tanto en sus ventajas y como desventajas. El azul de anilina es un colorante de tipo básico que reacciona con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), los grupos sulfatos de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilos de las proteínas. Esta tinción discrimina entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína, teniendo afinidad por la primera (Dadoune *et al.*, 1988), por lo que se puede utilizar para detectar defectos en la compactación o inmadurez cromatínica (Hammadeh *et al.*, 1996). Este test es utilizado para determinar la calidad de los espermatozoides en humanos luego de la criopreservación (Hamidi *et al.*, 2014) y en la producción avícola durante un proceso de selección de semen para la formación de un banco de esperma (Soares y Beletti, 2006; Santiago-Moreno *et al.*, 2009). Otro caso de estudio, realizado por Ferrari *et al.* (1998) en bovinos evaluó el estado general de los espermatozoides y se observó que, a pesar de que los espermatozoides dañados tenían similar tamaño a los normales, presentaban una alta tasa de deformación de la cromatina compacta. En una práctica similar se observó que según el estado de condensación de la cromatina espermática se veía afectada la fertilidad del toro (de Oliveira *et al.*, 2013).

Test de Naranja de Acridina (NA)

Este test se utiliza para evaluar la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización. El NA es un fluorocromo metacromático y puede utilizarse en tinción nativa o desnaturalizada. El test se basa en someter a la célula a un agente desnaturalizante y posteriormente realizar una tinción con NA. El espectro de emisión del fluorocromo (verde o naranja) depende del estado de la hebra de ADN. Si el colorante se intercala con la doble hélice intacta del ADN, emite una fluorescencia verde. En cambio, cuando el ADN se encuentra desnaturalizado, la unión del fluorocromo con la hebra simple genera una fluorescencia naranja (Ortega López *et al.*, 2010). En algunos casos, se usa la tinción conjunta con bromuro de etidio o yoduro de propidio para analizar viabilidad celular y así discriminar entre células apoptóticas, viables y necróticas según la coloración adquirida y la morfología observada. Al igual que el test de azul de toluidina, este test tiene una baja reproducibilidad, ya que su aplicación genera la destrucción eventual del ADN que conlleva una variación en los resultados a medida que pasa el tiempo, y una difícil valoración de las tonalidades intermedias (Curti, 2010). Por otro lado, no es un ensayo de tan bajo costo como el anterior, debido a que implica el uso de un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. La ventaja que tiene es que es un método relativamente rápido. En la actualidad, se utiliza en producción animal principalmente para determinar la vitalidad de los espermatozoides aunque aporta limitada información de su estado (Ortega López *et al.*, 2010). Este test se ha usado para evaluar la calidad espermática previa y posteriormente a la criopreservación tanto en bovinos (Martins *et al.*, 2007; Rubio Guillen, 2008; Papa *et al.*, 2015), como en equinos (Mosqueira Podestá, 2012), aves (Senan *et al.*, 2013) y porcinos (González Villalobos, 2008). En otros estudios se buscó poner a prueba la resistencia a infecciones generadas por agentes patogénicos (Rey *et al.*, 2003; Bolívar, 2013).

Test de Cromomicina A₃ (CMA₃)

La cromomicina es un fluorocromo que es usado tanto para teñir el ADN –pues sirve para la confección de cariotipos al formar un patrón de bandas R en los cromosomas (Fritschi y Stranzinger, 1985)–, como para diferenciar el ADN unido a histonas del ADN

unido a protaminas. La CMA₃ se acopla a regiones ricas en guanina-citosina del ADN y compete con las protaminas por los mismos sitios. Por ello, a mayor protaminación del ADN, menor unión de CMA₃ y menor intensidad en la coloración (Iranpour *et al.*, 2014). Es una técnica que requiere del uso de un microscopio de fluorescencia, cuya aplicación para detectar daño potencial en el ADN espermático de animales de producción no ha sido muy practicada. Sin embargo, se encuentran algunos estudios en toros (*Bos taurus*), aunque no ligados al efecto de una sustancia en particular, sino como un estudio de caracterización de la viabilidad espermática y en busca de algún tipo de deformación en el nivel cromosómico (Simões *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2013; Satake *et al.*, 2014).

Test de Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos (MN) son pequeños cuerpos esféricos formados a partir de material genético que queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo, quedando así uno de menor tamaño (MN) con relación al primario (Fenech, 1993 y 2007; Mudry y Carballo, 2006). Estos se forman a partir de una ruptura directa del ADN, una replicación del ADN defectuosa o la inhibición de la síntesis del ADN, originándose así tanto a partir de cromosomas enteros rezagados como de fragmentos cromosómicos. El aumento de la frecuencia de micronúcleos frente a la exposición a un determinado agente es un indicador de la genotoxicidad de este. Las frecuencias basales de micronúcleos han sido calculadas para varios de los vertebrados (De Lemos *et al.*, 2001; Cristaldi *et al.*, 2004). El recuento de micronúcleos en animales de producción se ha utilizado para evaluar los efectos de diversas sustancias como cloruros (Šutiaková *et al.*, 2004), benceno (Piešova y Šiviková, 2003), bisfenol (Šutiaková *et al.*, 2014), glifosato (Piešova 2004; Piešova, 2005), endosulfán (Pistl *et al.*, 2001), glicerol (Rodas *et al.*, 2008), roxarzona (Zhang *et al.*, 2012) tebuconazol (Šiviková *et al.*, 2013) o tolifluanida (Šutiaková *et al.*, 2006). También se ha usado para evaluar alimentos (Saleh y Sarhan, 2007) y matrices ambientales (Šutiaková *et al.*, 2000) y para testear el daño ocasionado por agentes físicos como la radiación (Flores *et al.*, 1996; Hasanbašić y Rukavina, 2007; Malladi *et al.*, 2007; Rukavina *et al.*, 2012) y agentes

biológicos como virus (Elston y Stenkvis, 1965). Asimismo, se empleó para la evaluación *in vitro* del efecto del glifosato sobre los linfocitos bovinos (Piešova, 2004). Se observaron elevaciones significativas en la inducción de micronúcleos tras la exposición de las células a dosis de 280 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ y 560 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Además, se observó que el tratamiento con glifosato durante 48 horas indujo una disminución en los porcentajes de células mononucleadas y un aumento de los porcentajes de las células bi-, tri- y tetranucleadas en comparación con tratamientos de 24 horas de duración.

Test de Aberraciones Cromosómicas (AC)

Este test se utiliza para detectar alteraciones numéricas o estructurales, determinando si hay un efecto clastogénico y/o aneunógeno en el agente estudiado. Es normal confundir aberraciones cromosómicas o retardo de anafase con el test de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), si bien este tipo de alteración puede generar variación en el índice mitótico (IM) o índice de fases (IF). Estas clases de test nos permiten diferenciar entre pequeñas deleciones o fragmentos cromosómicos dañados (ICH) y anomalías estructurales cromatídicas o cromosomales (AC), tales como huecos o roturas en los cromosomas (Udroiu, 2007, Arencibia Arrebola *et al.*, 2010): Se trata de un test muy utilizado en la medicina para el estudio del cáncer por exposición a diversas fuentes de contaminación (Arencibia Arrebola *et al.*, 2010). Un ejemplo estudiado en linfocitos porcinos con alto porcentaje de AC en zonas fabriles menciona que podría resultar útil como marcador ambiental (Udroiu, 2007). En otro trabajo (Shekhar *et al.*, 2014) se aplicó para determinar el impacto del As sobre los cromosomas de bovinos afectados en el este de Bengala. Los resultados de esta investigación reportaron la existencia de efectos genotóxicos y variación en los largos relativos de los brazos cromosómicos de los pares 1, 2 y 3, aunque no se evidenció diferencia en el número de cromosomas, la razón de brazos o el índice centromérico. Esta experiencia muestra la utilidad de los exámenes citogenéticos para el monitoreo y estudio del impacto real de la exposición del ganado a diferentes sustancias y factores que pudieran afectar de manera directa o indirecta al ADN.

Test de Retardo en Anafase-Telofase (RAT)

Este test permite detectar la inducción tanto de lesiones en el cromosoma como de segregación defectuosa de este, revelando alteraciones relacionadas con aberraciones cromosómicas, anomalías numéricas, alteraciones del aparato mitótico, aneuploidías y alteraciones en el nivel del centrómero. A diferencia de los ensayos en células de la metafase, el costo es más reducido y la ejecución, más rápida. Hay que tener en cuenta que esta técnica es de baja sensibilidad en comparación con el resto. En un estudio para determinar los efectos del uso de antiparasitarios en cultivos celulares de ovario de hámster y linfocitos de sangre humana, esta técnica en complementación con el test de MN, demostraron que en concentraciones de dosis normales para Tiabendazol, Metronidarol y Mebendazol aumenta el daño en el material genético de los organismos expuestos (Mudry *et al.*, 1995). Es importante destacar que, en la búsqueda bibliográfica, no encontramos que se haya aplicado en el país, en producción animal, a pesar de los beneficios mencionados.

Test de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Este ensayo es de gran importancia para evaluar la inestabilidad cromosómica (Maravilla-Galván *et al.*, 2001), la inducción de ICH es distinta de aberraciones genéticas por exposición a genotóxicos, presentando así mayor sensibilidad frente a determinados agentes químicos (Lampurlanés y Hernández Malo, 1995). Este test consiste en la obtención de cromosomas con cromátidas químicamente diferentes por medio de la incorporación *in vitro* de una base análoga a la timidina, la bromodoxina-uridina (brdU), que unida a algún fluorocromo o colorante puede ser detectada mediante el uso de microscopía (Maravilla-Galván *et al.*, 2001). El aumento de la frecuencia del ICH nos indica un incremento en la inestabilidad cromosómica (Lampurlanés y Hernández Malo, 1995). También ha sido utilizado en pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal (ovino, bovino y porcino). Se observó en varias manadas de ovejas expuestas a altos niveles de dioxina en sus zonas de pastoreo un alto nivel de ICH (Udroiu, 2007).

Ensayo TUNEL

El ensayo de marcación del extremo terminal con dUTP por medio de la deoxinucleotidil transferasa, más conocido como TUNEL, permite identificar daño real en la hebra de ADN. La técnica se basa en la adición de una deoxiuridina marcada con un fluorocromo al extremo 3'-OH de la cadena afectada. La señal se incrementa a mayor número de roturas en la cadena de ADN (Negoescu *et al.*, 1996 y puede llevarse a cabo tanto por citometría de flujo como por fluorescencia (Darzynkiewicz *et al.*, 2008; Loo, 2011). El ensayo TUNEL fue utilizado en células de diferentes especies de producción para detectar el daño al ADN producido por sustancias inorgánicas, orgánicas y otros factores. Un caso estudiado por Zhan *et al.* (2006) demostró que la exposición crónica a fluoruros es perjudicial para la estructura y funcionamiento de los riñones en cerdos. Otros ejemplos corresponden al efecto inmunotóxico y genotóxico del arsénico en cabras (Patra *et al.*, 2013). Otros casos han estudiado el nonifenol (Ergün *et al.*, 2014), manganeso (Shao *et al.*, 2012), selenio (Liu *et al.*, 2014), cadmio (Li *et al.*, 2013), y factores físicos tales como la hipotermia (Gong *et al.*, 2013).

Ensayo de ISNT (*In situ nick translation*)

Esta técnica –junto a otras– es utilizada principalmente en reproducción asistida para el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Se basa en la utilización de enzimas exógenas que permiten incorporar porciones de nucleótidos específicas y así reconocer células cuyos núcleos están en estado de necrosis (Manicardi *et al.*, 1998; Portella y Soledad, 2011), mediante el uso de microscopía fluorescente. Es aplicada en la determinación de células somáticas apoptóticas (Salas, 2001) y de vitalidad espermática para reproducción asistida, tanto en humanos como en bovinos (Portella y Soledad, 2011, Nava-Trujillo *et al.*, 2012). También se han realizado estudios en alpaca para la evaluación de la integridad de los espermatozoides luego de la criopreservación (Santiani *et al.*, 2012), entre otros.

Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula se lleva a cabo mediante la inclusión de los distintos tipos celulares en un microgel de agarosa situado sobre un portaobjetos y aplicándoles una lisis alcalina. Los núcleos se someten a electroforesis y se tiñen generalmente con bromuro de etidio. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico y ofrece una imagen similar a la cola de un cometa que puede ser observada por microscopía de fluorescencia. Las células que no presentan fragmentación, no generan esta imagen (HUMANA, 2007). Es un test de alta sensibilidad que detecta muy bajos niveles de daño en el ADN, requiere un bajo número de células, es rápido y fácil de aplicar. Entre las desventajas podemos mencionar que no diferencia roturas de una cadena simple de las dobles, y también detecta sitios alcalinos lábiles, *crosslinkings*, etcétera. Este estudio es muy utilizado en reproducción asistida para determinar la viabilidad de los espermatozoides, además resulta habitual para la evaluación de diversos agentes (físicos o exposición a xenobióticos) en los distintos tipos celulares, tanto en producción animal de tipo tradicional (Rodrigo *et al.*, 2005; Udrouiu, 2007), como no tradicional (Carretero *et al.*, 2012b). Un caso de estudio desarrollado en la Argentina es la evaluación del daño al ADN asociado al contenido de arsénico urinario en una población de jóvenes expuesta a la sustancia por el agua de bebida (Novani *et al.*, 2006). Los resultados mostraron que la población estudiada presentaba mayor probabilidad de desarrollar patologías relacionadas con este elemento. Otro caso de estudio sobre As en la Argentina es el realizado por Hick *et al.* (2007), en el que se compararon dos poblaciones de individuos expuestos a distintos niveles de As por el agua de bebida, una de la provincia de Santiago del Estero y otra de la Santa Fe, cuyos resultados demostraron que la población que se hallaba expuesta a este elemento presentaba mayores casos de células de mucosa y sangre con daños en el ADN.

DBD-FISH

La técnica de DBD-FISH (Double) permite detectar y cuantificar las roturas de ADN y los sitios alcalino lábiles en células individuales (Cortés-Gutiérrez *et*

al., 2014a). Se basa en la detección y cuantificación de roturas en todo el genoma y también en secuencias específicas del ADN (Fernández y Gosálvez, 2002). Puede realizarse asociada al ensayo Cometa en el estudio de las hebras de ADN en doble hélice o bien desnaturalizadas en todo tipo de células (Fernández *et al.*, 2001). En producción animal, se utiliza en estudios de calidad espermática en ovinos (Cortés-Gutiérrez, 2008; Dávila-Rodríguez *et al.*, 2008) y equinos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2014b). También se usó en el estudio de calidad reproductiva en *Lama lama* (Carretero *et al.* 2012b).

SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*)

Evalúa la susceptibilidad del ADN al someter la hebra a desnaturalización luego de la tinción con NA y dependiendo de si la hebra es bicatenaria o monocatenaria emite una fluorescencia distinta (verde o naranja, respectivamente). Las células son discriminadas en un citómetro. Este test es muy utilizado en producción bovina (Evenson *et al.*, 1993; Bochenek *et al.*, 2001; Boe-Hansen *et al.*, 2005) y en otras especies de animales de producción no tradicional como el venado (García-Macias *et al.*, 2006). Otro caso de utilización es para el análisis de las células germinales de toros, como consta en el trabajo de Carreira (2012), en el que se evaluó el daño al ADN causado por radicales libres en función de la edad de los animales y la susceptibilidad a la desnaturalización de la cromatina mediante los ensayos SCSA, NA y TUNEL. Los resultados mostraron que los ejemplares más jóvenes presentaban una mayor calidad espermática, seguidos por el grupo de animales adultos y, finalmente, una disminución en la calidad para el grupo senil. Respecto de la integridad de la cromatina, los resultados indican que los grupos jóvenes y seniles son más susceptibles a daños de doble cadena de ADN, aunque no por las mismas causas. En el caso de los jóvenes este sería por efecto de la deficiencia de protamina, mientras que en los animales ancianos sería causado por el ataque de radicales libres.

Test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*)

Esta técnica nos permite diferenciar entre los espermatozoides cuya cromatina está condensada e intacta de los que tienen su ADN fragmentado. Consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina, mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteínización. Como resultado, los espermatozoides con ADN intacto dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN, mientras que aquellos con fragmentación no (Humana, 2007). Este tipo de test ha sido utilizado en camélidos (Carretero *et al.*, 2012a, Carretero *et al.*, 2012b), bovinos (Acuña *et al.*, 2001; Vieytes *et al.*, 2005; Nava-Trujillo *et al.*, 2011), ovinos (Rodríguez *et al.*, 1985, Nezhad *et al.*, 2013) y también en producción avícola (Soares y Beletti, 2006). Además, se han realizado algunos estudios en conejos para evaluar la evolución morfológica de los espermatozoides posterior a la criopreservación (Beletti y Mello, 2004). Este test tiene alta especificidad para la evaluación de la calidad espermática y es utilizado en diversos tipos de animales de producción tradicional y no tradicional.

| Metodología | Ventajas | Desventajas | Costo | Observaciones | Ejemplo de uso en animales de producción |
|---|--|---|-------|---|--|
| <i>Test de Azul de Toluidina (AT)</i> | Metodología simple | Baja reproducibilidad | Bajo | Microscopio de campo claro | Sardoy <i>et al.</i> , 2008; Beletti <i>et al.</i> , 2005; Carretero <i>et al.</i> , 2012a |
| <i>Test de Azul de Anilina (AA)</i> | Metodología simple | Baja reproducibilidad | Bajo | Microscopio de campo claro | Soares y Beletti, 2006; Santiago-Moreno <i>et al.</i> , 2009; de Oliveira <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Test de Naranja de Acridina (NA)</i> | Metodología simple | Baja reproducibilidad Interpretación subjetiva | Medio | Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo. No distingue entre pacientes fértiles e infértiles | Rubio Guillen, 2008; Senan <i>et al.</i> , 2013 González Villalobos, 2008; Martins <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Test de Cromomicina A₃ (CMA3)</i> | Metodología simple | Baja reproducibilidad | Medio | Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo | Simões <i>et al.</i> , 2009; Simões <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Test de Micronúcleos (MN)</i> | Metodología simple. Validado mundialmente. Indicador indirecto de rotura cromosómica | Sólo para células proliferativas. Se necesita conocer cinética de división celular | Bajo | Microscopio de campo claro | Šutiaková <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2012; Šiviková <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Test de Aberraciones Cromosómicas (AC)</i> | Metodología simple | Requiere observador experimentado | Bajo | Microscopio de campo claro | Udroiu 2007; Shekhar <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Test de Retardo en Anafase-Telofase (RAT)</i> | Metodología simple | Requiere observador experimentado. Baja sensibilidad | Bajo | Microscopio de campo claro | Mudry <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Test de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)</i> | Metodología simple | Requiere observador experimentado. | Bajo | Microscopio de campo claro | Udroiu, 2007 |
| TUNEL | Metodología validada. Detecta daño directamente | Baja reproducibilidad. Requiere operador experimentado | Alto | Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo | Patra <i>et al.</i> , 2013; Zhan <i>et al.</i> , 2006; Shao <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>In situ nick translation assay (ISNT)</i> | Detecta daño directamente. | Baja reproducibilidad. Requiere operador experimentado | | Microscopio de campo claro. Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo | Nava-Trujillo <i>et al.</i> , 2012; Santiani <i>et al.</i> , 2012 |

| | | | | | |
|---|--|---|------|--|--|
| <i>Ensayo Cometa</i> | Requiere bajo número de células. Células proliferativas y no proliferativas | Baja reproducibilidad. Técnica laboriosa. Requiere observador experimentado. No detecta efectos aneugénicos. No estandarizado | | Cuba de electroforesis. Microscopio de fluorescencia. Provee información de células individuales | Rodrigo <i>et al.</i> , 2005; Udriou, 2007; Belletti y Mello, 2009 |
| DBD-FISH | Evalúa el daño en células individuales <i>in situ</i> , en secuencias específicas de DNA | Técnica laboriosa. Requiere operador experimentado | Alto | Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo | Dávila Rodríguez, 2008; Cortés Gutiérrez, 2012; Carretero <i>et al.</i> , 2012b |
| <i>Sperm Chromatin Structure Assay</i> (SCSA) | Utilidad clínica | Baja reproducibilidad. Requiere operador experimentado | | Citometría de flujo | Boe-Hansen <i>et al.</i> , 2005; Bochenek <i>et al.</i> , 2001; García-Macias <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Sperm Chromatin Dispersion Test</i> (SCD) | Metodología simple. No se necesita medir color o intensidad de fluorescencia | Baja reproducibilidad. Interpretación subjetiva | | Microscopio de fluorescencia. Microscopio de campo claro | Carretero <i>et al.</i> , 2012a; Soares y Beletti, 2006 Nava-Trujillo <i>et al.</i> , 2011 |

Tabla 1: Comparación de las principales características de las técnicas mencionadas y ejemplos de su utilización en especies de producción pecuaria.

Consideraciones finales

La presencia de compuestos nocivos en la dieta de los animales de producción representa un importante factor de riesgo para la salud humana por una posible transferencia de contaminantes a los productos de consumo. Además de la detección de las concentraciones de esas sustancias en los productos animales, los ensayos citogenéticos pueden representar un método útil para evaluar sus efectos (Udriou, 2007). En este contexto, es de vital importancia el uso de estas técnicas para evaluar el impacto que pueden tener distintas sustancias presentes en el ambiente, como medicamentos (Chinelato y Froes, 2002), plaguicidas (Pistl *et al.*, 2001; Piešová y Šiviková, 2003; Ermler *et al.*, 2013), desechos de fábricas o curtiembres (Piešová, 2004; Udriou, 2007) o incluso la exposición a elementos traza de origen natural u antrópico, como el arsénico, selenio, vanadio, etcétera (Udriou, 2007, Rana *et al.*, 2010; Patra *et al.*, 2013; Dash *et al.*, 2015) sobre las especies, sobre las que se pueden observar cambios cromosómicos, tanto en células somáticas como en células germinales. Estos factores pueden incidir de manera sustancial en la productividad (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2014) por la formación de células carcinogénicas o aberraciones cromosómicas y por la disminución de la fertilidad. Por esto, los ensayos toxicogenéticos pueden ser utilizados como instrumentos de baja complejidad técnica para supervisar la productividad y los alimentos de origen animal, con la ventaja de poder observar los efectos toxicológicos producidos por los distintos tipos de xenobióticos o elementos traza inorgánicos antes de la aparición de patologías en los ejemplares.

Si bien los estudios detallados tienen una amplia variedad de aplicaciones, en las últimas décadas, su uso se ha acotado principalmente al perfeccionamiento de la filogenética. Esto se debe a la continua búsqueda de perfeccionar las especies según la finalidad con la que se las cría para mejorar la calidad de la leche, la carne o, simplemente, en busca del espécimen con mayor rapidez o agilidad (Acuña *et al.*, 2001; Beletti *et al.*, 2005; Carretero *et al.*, 2012a).

Bibliografía

- Acuña, C. M.; De Dominicis, O. H.; Narbaitz, J. M.; De Apellániz, A.; Cabodevila, J.; Callejas, S. y H. Cisale (2001), "Evaluación de toros en rodeos de cría: es necesario el examen de semen", *Taurus* 9, pp. 16-20.
- Andretta, A. M.; Stockert, J. C. y C. Barrera (1995), "A simple method to detect sperm chromatin abnormalities: cytochemical mechanism and possible value and predicting semen quality in assisted", *International Journal of Andrology*, 18 (1), pp. 23-28.
- Arellano, F. E.; Álvarez Gonçalves, C. V.; Pérez Carrera, A. L.; Calzetta Resio, A. N. y A. Fernández Cirelli (2014), "Presencia de Elementos Traza Inorgánicos de Importancia Nutricional en Leche de Rumiantes", *Revista sns* 5-6, pp. 1-8.
- Arencibia Arrebola, D. F.; Rosario Fernández, L. A. y Y. Hernández Rodríguez (2010), "Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6J/cenp", *Revista Cubana de Farmacia*, 44 (4), pp. 503-511.
- Beletti, M. E. y M. L. S. Mello (2004), "Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology", *Theriogenology* 62, pp. 398-402.
- Beletti, M. E.; da Fontoura-Costa, L. y M. Mendes-Guardieiro (2005), "Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa", *Braz. J. Morphol. Sci.* 22 (2), pp. 85-90.
- Bochenek, M.; Smorag, Z. y J. Pilch (2001), "Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination", *Theriogenology*, 56 (4), pp. 557-567.
- Boe-Hansen, G. B.; Morris, I. D.; Ersbøll, A. K.; Greve, T. y P. Christensen (2005), "DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay", *Theriogenology*, 63 (6), pp. 1789-1802.
- Bolívar, A. M. (2013), "Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple", *Revista de Salud Animal* 35 (1), pp. 1-9.
- Carreira, J. T. (2012), "Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides criopreservados de touros Nelore jovens, adultos e senis" [en línea]. Disponible en: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105909/carreira_jt_dr_jabo.pdf?sequence=1>.
- Carretero, M. I.; Giuliano, S. M.; Agüero, A.; Pinto, M.; Miragaya, M.; Trasorras, V.; Egey, J.; von Thungen, J. y D. Neild (2010a), "Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue", *Reprod. Fertil. Dev.*, 22 (1), p. 310.
- Carretero, M. I.; Arraztoa, C. C.; Casaretto, C. I.; Huanca, W.; Neild, D. M. y S. M. Giuliano (2010b), "Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue", en Boersma Lieke (eds), *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*, Wageningen Academic Publishers, p. 4.
- Carretero, M. I.; Arraztoa, C. C.; Ferrante, A.; Caldevilla, M.; Santa Cruz, R. y D. Neild (2012a), "Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test", *Journal of Equine Veterinary Science*, 32 (8), p. 480.
- Carretero, M. I.; Lombardo, D.; Arraztoa, C. C.; Giuliano, S. M.; Gambarotta, M. C. y D. M. Neild (2012b), "Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test", *Animal Reproduction Science*, 131 (1), pp. 63-71.
- Carretero, M. I.; Giuliano, S. M.; Casaretto, C. I.; Gambarotta, M. C. y D. M. Neild, (2012c), "Evaluation of the effect of cooling and of the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue", *Andrologia*, 44 (s1), pp. 239-247.

- Chinelato, A. R. y N. D. T. C. Froes (2002), “Efeitos genotóxicos em profissionais expostos aos anestésicos inalatórios”, *Rev Bras Anesthesiol* 52, pp. 79-85.
- Cortés-Gutiérrez, E. I.; Dávila Rodríguez, M. I. López Fernández, C.; Fernández, J. L. y J. Gosálvez (2008), “Alkali labile sites in sperm cells from Sus and Ovis species”, *International journal of andrology* 31 (3), pp. 354-363.
- Cortés-Gutiérrez, E. I.; Dávila-Rodríguez, M. I.; Cerda-Flores, R. M.; Fernández, J. L.; López-Fernández, C. y J. Gosálvez (2014a), “Use of the DBD-FISH technique for detecting DNA breakage in response to high doses of X-rays”, *Radiation and environmental biophysics* 53 (4), pp. 713-718.
- Cortés-Gutiérrez, E. I.; Dávila-Rodríguez, M. I.; López-Fernández, C.; Fernández, J. L.; Crespo, F. y J. Gosálvez (2014b).), “Localization of alkali-labile sites in donkey (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*) spermatozoa”, *Theriogenology* 81 (2), pp. 321-325.
- Cristaldi, M.; Ieradi, L. A.; Udriou, I. y R. Zilli (2004), “Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 559 (1-2), pp. 1-9.
- Curti, G. (2010), “Estudio del daño del ADN espermático en pacientes infértiles”, Tesis de Grado [en línea]. Disponible en: <www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1618/1/uy24-14841.pdf>.
- Da Luz, P. A. C.; Andrighetto, C.; Santos, P. R. S.; Jorge, A.; Constantino, M. V. P.; Pereira, F. T. V.; Mess, A. y A. C. Assis Neto (2012), “Daily sperm production and evaluation of morphological reproductive parameters of Murrah buffaloes in an extensive breeding system”, *Spermatogenesis* 2 (2), pp. 88-93.
- Dadoune, J. P.; Mayaux, M. J. y M. L. Guidhard-Moscoto (1988), “Correlation between defects of chromatin condensation of human spermatozoa staining by aniline and semen characteristics”, *Andrologia* 20, pp. 211-217.
- Darzynkiewicz, Z.; Galkowski, D. y H. Zhao (2008), “Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay”, *Methods* 44 (3), pp. 250-254.
- Dash, J. R.; Datta, B. K.; Sarkar, S. y T. K. Mandal (2015), “Chronic Arsenicosis Induced Oxidative Stress in Cattle: Role of Zn and Se”, *Management of Water, Energy and Bio-resources in the Era of Climate Change: Emerging Issues and Challenges*, Springer International Publishing, p. 7.
- Dávila-Rodríguez, M. I.; Cortés-Gutiérrez, E. I.; López-Fernández, C.; Pita, M.; Mezzanotte, R. y J. Gosálvez (2008), “Whole-comparative genomic hybridization in domestic sheep (*Ovis aries*) breeds”, *Cytogenetic and genome research* 124 (1), pp. 19-26.
- De Lemos, C. T.; Rodel, P. M.; Terra, N. R. y B. Erdtmann (2001), “Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes”, *Environ Toxicol Chem* 20, pp. 1320-1324.
- De Oliveira, R. V.; Dogan, S.; Belser, L. E.; Kaya, A.; Topper, E.; Moura, A. y E. Memili (2013), Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility, *Reproduction* 146 (3), pp. 263-272.
- Deng, Y.; Cui, H.; Peng, X.; Fang, J.; Wang, K.; Cui, W. y X. Liu (2012), “Dietary vanadium induces oxidative stress in the intestine of broilers”, *Biological trace element research* 145 (1), pp. 52-58.
- Elston, R. N. y B. Stenkvist (1965), “Quantitative estimation of nuclear buds and micronuclei in bovine cells transformed by rous sarcoma and SV 40 viruses”, *Zeitschrift für Zellforschung* 68, pp. 543-549.
- Ergün, S. S.; Üstüner, B.; Alçay, S.; Sağırkaya, H. y C. Uğuz (2014), “The Effects of Nonylphenol on Gamete Physiology in Bovine”, *Journal of Applied Biological Sciences* 8 (2), pp. 32-38.

- Ermiler, S.; Scholze, M. y A. Kortenkamp (2013), "Seven benzimidazole pesticides combined at sub-threshold levels induce micronuclei in vitro", *Mutagenesis* 28 (4), pp. 417-426.
- Evenson, D. P.; Parks, J. E.; Kaproth, M. T. y L. K. Jost (1993), "Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry", *Journal of dairy science* 76 (1), pp. 86-94.
- Fenech, M. (1993), "The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.* 285, pp. 35-44.
- Fenech, M. (2007), "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay", *Nat Protoc.* 2(5), pp.1084-1104.
- Felipe-Pérez, Y. E.; de Lourdes Juárez-Mosqueda, M.; Hernández-González, E. O. y J. de Jesús (2009), "Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques", *Acta Veterinaria Brasilica* 2 (4), pp. 123-130.
- Fernández, J. L.; Vázquez-Gundí, F.; Rivero, M. T.; Genescá, A.; Gosálvez, J. y V. Goyanes (2001), "DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single-and double-strand breaks in individual cells", *Experimental cell research* 270 (1), pp. 102-109.
- Fernández, J. L. y J. Gosálvez (2002), "Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH)", *Methods Mol. Biol.* 203, pp. 203-216.
- Ferrari, M. R.; Spirito, S. E.; Giuliano, S. M. y H. A. Fernández (1998), "Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa", *Andrologia* 30 (2), pp. 85-89.
- Flores, M. J.; Pifero, J.; Ortiz, T.; Pastor, N.; Mateos, J. C. y F. Cortes (1996), "Both bovine and rabbit lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide show an adaptive response to radiation damage", *Mutation Research* 372, pp. 9-15.
- Fritschi, S. y G. Stranzinger (1985), "Fluorescent chromosome banding in inbred chicken: quinacrine bands, sequential chromomycin and DAPI bands", *Theoretical and applied genetics* 71 (3), pp. 408-412.
- García-Macias, V.; Martínez-Pastor, F.; Alvarez, M.; Garde, J. J.; Anel, E.; Anel, L. y P. de Paz (2006), "Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog", *Theriogenology* 66 (8), pp. 1921-1930.
- Gong, P.; Hua, R.; Zhang, Y.; Zhao, H.; Tang, Z.; Mei, X.; Zhang, M.; Cui, J. y C. Li (2013), "Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest", *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33 (6), pp. 928-934.
- González Villalobos, D. (2008), "Evaluación de los parámetros morfométricos de los espermatozoides como herramienta para determinar la calidad seminal de machos porcinos", Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción e Industria Animal.
- Guachalla, L. y M. E. Ascarrunz (2003), "La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo", *Biofarbo* 9, pp. 75-82.
- Hammadeh, M. E.; Al-Hasani, S.; Stieber, M.; Rosenbaum, P.; Kúpker, D.; Diedrich, K. y W. Schmidt (1996), "Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme", *Human Reproduction* 11 (11), pp. 2468-2471.
- Hamidi, J.; Frainais, C.; Amar, E.; Bailly, E.; Clément, P. y Y. Ménézo (2014), "A double-blinded comparison of in situ TUNEL and aniline blue versus flow cytometry acridine orange for the determination of sperm DNA fragmentation and nucleus decondensation state index", *Zygote*, Cambridge, pp. 1-7.

- Hasanbašić, D. y D. Rukavina (2007), "Micronuclei in lymphocytes of horses and pigs after in vitro irradiation", *Acta Veterinaria (Beograd)* 57(4), pp. 341-350.
- Hick A. S.; Paczkowski M. G.; Gadano A. B. y M. A. Carballo (2007), "Biomarcadores de genotoxicidad en individuos expuestos al arsénico", *Lat. Am. J. Pharm.* 26, pp. 691-699.
- Humana, C. C. D. R. (2007), "Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad", *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 24 (5), pp. 305-313.
- Iranpour, F. G. (2014), "The effects of protamine deficiency on ultrastructure of human sperm nucleus", *Adv Biomed Res.* 3, p. 24.
- Lampurlanés, X. S. y M. R. Hernández Malo (1995), NTP 354: *Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas* [en línea]. Disponible en: <http://cso.go.cr/normativa/notas%20tecnicas%20preventivas%20-%20i.n.s.h.t/ntp_3354.pdf>.
- Li, Z. L.; Chen, H. G.; Xu, Y. y M. Z. Kong (2006), "Toxicological effects of three veterinary drugs and feed additives on fish", *J Ecol Rural Environ*, 22 (1), pp. 84-86.
- Li, J. L.; Jiang, C. Y.; Li, S. y S. W. Xu (2013), "Cadmium induced hepatotoxicity in chickens (*Gallus domesticus*) and ameliorative effect by selenium", *Ecotoxicology and environmental safety* 96, pp. 103-109.
- Liu, L. L.; Zhang, J. L.; Zhang, Z. W.; Yao, H. D.; Sun, G. y S. W. Xu (2014), "Protective roles of selenium on nitric oxide-mediated apoptosis of immune organs induced by cadmium in chickens", *Biological trace element research* 159 (1-3), pp.199-209.
- Loo, D. T. (2011), "In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques", *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo*, Humana Press, p. 10.
- López-Fernández, C.; Fernández, J. L.; Gosálbez, A.; Arroyo, F.; Vázquez, J. M.; Holt, W. V. y J. Gosálbez (2008), "Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram", *Theriogenology* 70 (6), pp. 898-908.
- Malladi, S. M.; Bhilwade, H. N.; Khan, M. Z. y R. C. Chaubey (2007), "Gamma ray induced genetic changes in different organs of chick embryo using peripheral blood micronucleus test and comet assay", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 630 (1-2), pp. 20-27.
- Manicardi, G. C.; Tombacco, A.; Bizzaro, D.; Bianchi, U.; Bianchi, P. G. y D. Sakkas (1998), "DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays", *The Histochemical Journal* 30 (1), pp. 33-39.
- Maravilla-Galván, R.; Gómez Arroyo, S.; Villalobos-Pietrini, R. y O. Amador-Muñoz (2001), "Intercambios de Cromátidas hermanas en *Vicia faba* como bioindicador del efecto del agua de lluvia de la Ciudad de México", *Rev. Int. Contam. Ambient* 17 (3), pp. 157-164.
- Martins, C. F.; Dode, M. N.; Bao, S. N. y R. Rumpf (2007), "The used of acridine orange test and the tunnel assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA", *Genet. Molres* 6 (1), pp. 94-104.
- Mosqueira Podestá, T. J. (2012), "Evaluación de los efectos de diluyentes de congelación de semen sobre la capacidad de unión de espermatozoides equinos a zona pelúcida de ovocitos bovinos", Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencia Animal, p. 27.
- Mudry, M.; Gadano, A.; González, M. y M. Carballo (1995), "Mutagénesis química: riesgo y beneficio en el consumo de antiparasitarios", *Interciencia* 20 (4), pp. 204-211.
- Mudry, M. y M. Carballo (2006), *Genética toxicológica*, Buenos Aires, Editorial de los Cuatro Vientos.

- Nava-Trujillo, H.; Quintero-Moreno, A.; Finol-Parra, G.; Carruyo, G.; Vilchez-Siu, V.; Osorio-Meléndez, C. y R. Valeris-Chacín (2011), "Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24 (2), pp. 116-122.
- Nava-Trujillo, H.; Hernández-Fernández, A. y A. Quintero-Moreno (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*, 22 (003).
- Naves, C. S.; Beletti, M. E.; Duarte, M. B.; Vieira, R. C.; Diniz, E. G. y J. O. Jacomini (2004), "Evaluation of equine spermatid chromatin with toluidine blue and acridine orange", *Biosci. J.* 20 (3).
- Negoescu, A.; Lorimier, P.; Labat-Moleur, F.; Drouet, C.; Robert, C.; Guillermet, C.; Brambilla, C. y E. Brambilla (1996), "In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations", *J Histochem Cytochem* 44 (9), pp. 959-968.
- Nezhad, F. S.; Lavvaf, A. y S. Karimi (2013), "Influence of Heat Stress on DNA Damage on Sheep 'S Sertoli Cells", *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 6 (10), pp. 1396-1400.
- Navoni, J. A.; González Cid, M.; Olivera, M.; Tschambler, J.; Bovi Mitre, G.; Larripa, I. y E. Villaamil Lepori (2006), "Daño al ADN asociado al contenido de arsénico urinario en una población de jóvenes expuesta al arsénico por el agua de bebida", *Acta toxicol. argent* 14 (supl), pp. 48-51.
- Ortega López, L.; Olaya Vila, E.; López Domínguez, P.; Segovia, A. G.; Orozco Gómez, I.; Núñez Calonge, R. y P. Caballero Peregrín (2010), "Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina", *Rev Int Androl.* 8 (3), pp. 114-121.
- Papa, P. M.; Maziero, R. D.; Guasti, P. N.; Junqueira, C. R.; Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Papa, F. O. y J. A. Dell'Aqua (2015), "Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen", *Theriogenology* 83 (1), pp. 107-113.
- Patra, P. H.; Bandyopadhyay, S.; Bandyopadhyay, M. C. y T. K. Mandal (2013), "Immunotoxic and genotoxic potential of arsenic and its chemical species in goats", *Toxicology international* 20 (1), p. 6.
- Pérez Carrera, A. y A. Fernández Cirelli (2005), "Arsenic concentration in water and bovine milk in Cordoba, Argentina. Preliminary results", *Journal of Dairy Research* 72, pp. 122-124.
- Picco, S. J.; Fazzio, L. E.; Rosa, D. E.; Pintos, M. E.; Cecilia, F.; Dulout, F. y G. A. Mattioli (2006), "Alteraciones oxidativas y daño en el ADN en bovinos con hipocuprosis", *Analecta Veterinaria* 26.
- Piešova, E. y K. Šiviková (2003), "The induction of micronuclei in bovine lymphocytes by exposure to benzene and S-9 mix", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10 (2), pp. 261-263.
- Piešova, E. (2004), "The influence of different treatment length on the induction of micronuclei in bovine lymphocytes after exposure to glyphosate". *Folia veterinaria*, 48 (3), pp. 130-134.
- Piešova, E. (2005), "Efekti glifozata na frekvenciju pojavljivanja mikronukleusa u limfocitima goveda *in vitro*". *Acta veterinaria*, 55 (2-3), pp. 101-109.
- Pistl, J.; Kovalkovicova, N.; Kacmar, P.; Kusova, I.; Mikula, I. y I. Sutiakova (2001), "Efecto de endosulfán en los leucocitos periféricos de oveja *in vitro*", *Veterinaria y toxicología humana*, 43 (2), p. 78.
- Portella, D. J. y D. Soledad (2011), "Evaluación del factor masculino en reproducción asistida: nuevas tecnologías". *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 57 (1), pp. 21-27.

- Rana, T.; Bera, A. K.; Das, S.; Bhattacharya, D.; Bandyopadhyay, S.; Pan, D. y S. K. Das (2010), "Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on blood oxidative stress indices in cattle in an arsenic-affected zone", *Ecotoxicology and environmental safety*, 73 (6), pp. 1327-1332.
- Rey, C.; Aso, P. M. y A. Coronado (2003), "Evaluación de la anaplasmosis en becerros mestizos Holstein naturalmente infectados y desafiados con aislados homólogos y heterólogos de anaplasma marginale", *Revista Científica*, 13 (4).
- Rincón, G.; Kelly, L.; D'Angelo, M.; Castellano, A.; Guevara, K.; Laviña, M. V. A. y M. B. Núñez (2002), "Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay: Análisis con marcadores moleculares", *Archivos de zootecnia*, 51 (193), 21.
- Rodas, A. C. D.; Maizato, M. J. S., Leirner; A. A.; Pitombo, R. N. M.; Polakiewicz, B.; Beppu, M. M. y O. Z. Higa (2008), "Cytotoxicity and Genotoxicity of Bovine Pericardium Preserved in Glycerol", *Artificial Organs*, 32 (4), pp. 272-276.
- Rodrigo, U.; Pareja, A.; Vásquez, N. A. y M. E. Márquez (2005), "El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18 (3), pp. 222-227.
- Rodríguez, H.; Ohanian, C. y E. Bustos Obregon (1985), "Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen". *International journal of andrology*, 8 (2), pp. 147-158.
- Rubio Guillen, J. L. (2008), "Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros Holstein, Brahmán y sus mestizos", Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción e Industria animal, Maracaibo, Edo Zulia, p. 103.
- Rukavina, D.; Hasanbašić, D.; Sofradžija, A.; Haverić, A.; Haverić, S.; Ajanovic, A. y Z. Gilic (2012), "Frequency of chromosomal aberrations and micronuclei in horse lymphocytes following in vitro exposure to low dose ionising radiation", *Veterinaria América del Norte* 61 (1-2), pp. 51-62.
- Santiago-Moreno, J.; López-Sebastián, A.; Castaño, C.; Coloma, M. A.; Gómez-Brunet, A.; Toledano-Díaz, A.; Prieto, M. T. y J. L. Campo (2009), "Sperm variables as predictors of fertility in Black Castellana roosters: use in the selection of sperm donors for genome resource banking purposes", *Spanish Journal of Agricultural Research* 7 (3), pp. 555-562.
- Santiani, A.; Evangelista, S.; Cheuquemán, C.; von Baer, A.; Risopatrón, J. y R. Sánchez (2012), "Evaluación de la integridad de ADN mediante citometría de flujo en espermatozoides de alpaca criopreservados con análogos de superóxido dismutasa", *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23 (2), pp. 182-191.
- Salas, M. A. (2001), "Apoptosis en el sistema cardiovascular: un camino hacia nuevas estrategias terapéuticas", *Rev Fed Arg Cardiol.* 30, pp. 523-532.
- Saleh, K. y M. A. A. Sarhan, (2007), "Clastogenic Analysis of Chicken Farms Using Micronucleus Test in Peripheral Blood", *Journal of Applied Sciences Research* 3 (12), pp. 1646-1649.
- Samal, L. y C. Mishra (2011), "Significance of nickel in livestock health and production", *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences* 5 (3), pp. 349-361.
- Sardoy, M. C.; Carretero, M. I. y D. Neild (2008), "Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue", *Anim. Reprod. Sci.* 107, pp. 349-350.
- Satake, N.; Fortes, M. y G. Boe-Hansen (2014), "Assessment of protamine deficiency in bovine sperm utilizing CMA3 dual spectra flow cytometry", *Association for Applied Animal Andrology*, Biennial Meeting.

- Senan, V. P.; Sherief, P. M. y J. R. Nair (2013), "Cytotoxic effect of ink extracts of cuttlefish and squid on chick embryo fibroblasts", *Int J Phar Sci Res.* 4, pp. 1893-1896.
- Shao, J. J.; Yao, H. D.; Zhang, Z. W.; Li, S. Y S. W. Xu (2012), "The disruption of mitochondrial metabolism and ion homeostasis in chicken hearts exposed to manganese", *Toxicology letters* 214 (2), pp. 99-108.
- Shekhar, S.; Sahoo, A. K.; Dalai, N.; Chaudhary, P.; Praveen, P. K.; Saikhom, R. y R. Rai (2014), "Chromosome analysis of arsenic affected cattle", *Veterinary World* 7 (10), pp. 859-862.
- Simões, R. C.; Feitosa, W. B.; Mendes, C. M.; Marques, M. G.; Nicacio, A.; de Barros, F. R. O. y J. A. Visintin (2009), "Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency", *Biotechnic & Histochemistry* 84 (3), pp. 79-83.
- Simões, R.; Nicacio, A. C.; Binelli, M.; de Paula-Lopes, F. F.; Milazzotto, M. P.; J. A. Visintin, y M. E. O. D'Ávila Assumpção (2013), "Sperm-mediated gene transfer: effect on bovine in vitro embryo production", *Zygote* 21 (04), pp. 325-329.
- Šiviková, K.; Dianovsky, J.; Holecková, B.; Galdíková, M. y V. Kolesárová (2013), "Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide", *Chemosphere* 92, pp. 555-562.
- Soares, J. M. y M. E. Beletti (2006), "Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades", *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 43 (4), pp. 543-553.
- Šutiaková, I.; Sulik, E.; Rimková, S.; Sakalikova, A. y V. Šutia (2000), "Micronucleus Frequency in Cytokinesis-Blocked Bovine Lymphocytes from Regions with Different Pollution Levels in Slovakia", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, pp. 449-455.
- Šutiaková, I.; Šutiak, V.; Rimková, S. y J. Poráčová (2004), "Chromosome damage in peripheral lymphocytes of sheep induced by chlorine in drinking water", *International journal of environmental health research* 14 (5), pp. 381-390.
- Šutiaková, I.; Kovalkovičová, N.; Pisl, J.; Novotný, J.; Legáth, J.; Kováč, G. y V. Šutiak (2006), "Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in sheep subchronically exposed to the fungicide Euparen Multi (tolylfluanid)", *Ecotoxicology and environmental safety* 64 (3), pp. 312-320.
- Šutiaková, I.; Kovalkovičová, N. y V. Šutiak (2014), "Micronucleus assay in bovine lymphocytes after exposure to bisphenol A in vitro", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 1, pp. 1071-2690.
- Udroiu, I. (2007), "Pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal. Citogenética y control de alimentos", *Rev. vet.* 18 (1), pp. 62-64
- Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M. M. y M. Mazur (2006), "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-biological interactions* 160 (1), pp. 1-40.
- Vieytes, A. L.; Cisale, H. O. y M. R. Ferrari (2005), "Prueba de descondensación de la cromatina espermática: su aplicación en semen bovino congelado", *Revista de medicina veterinaria, Buenos Aires*, 86 (4), p. 139.
- Vulić, A.; Durgo, K.; Pleadin, J.; Herceg, L. y N. Kopjar (2015), "Mutagenicity and DNA-damaging potential of clenbuterol and its metabolite 4-amino-3, 5-dichlorobenzoic acid *in vitro*", *Food and Chemical Toxicology*, doi:10.1016/j.fct.2014.12.023.
- Wei, C.; Hengmin, C.; Xi, P.; Jing, F.; Zhicai, Z.; Xiaodong, L. y W. Bangyuan (2012), "Dietary vanadium induces decrease in antioxidant enzyme activities and oxidative stress in the spleens of broilers", *Med Chem* 2 (2), pp. 033-037.

Zhan, X. A.; Wang, M.; Xu, Z. R.; Li, J. X. y J. X. Li (2006), “Toxic effects of fluoride on kidney function and histological structure in young pigs”, *Fluoride* 39 (1), pp. 22-26.

Zhang, Y.; Ying, J.; Chen, J. y C. Hu (2012), “Assessing the genotoxic potentials of roxarsone in V79 cells using the alkaline Comet assay and micronucleus test”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 741 (1), pp. 65-69.