

# INTEGRIDAD DE LA CROMATINA Y FORMA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE TORO: EVALUACIÓN SIMULTÁNEA CON LA TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA

## Chromatin Integrity and Shape Head of Bull Sperm: Simultaneous Assessment with Toluidine Blue Stain

Héctor Nava-Trujillo<sup>1,3</sup>, Adirno Hernández-Fernández<sup>2</sup> y Armando Quintero-Moreno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apdo. 15252. Maracaibo 4005-A, Edo. Zulia, Venezuela.

<sup>2</sup>Producción Agropecuaria, Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR), Santa Bárbara, Edo. Zulia, Venezuela.

<sup>3</sup>Investigación y Desarrollo, Fundo La Rosita, El Guayabo, Edo. Zulia, Venezuela. \*armando.quintero@fcv.luz.edu.ve.

### RESUMEN

La relación entre la integridad de la cromatina y las morfoanomalías de la cabeza espermática fue estudiada utilizando la tinción de azul de toluidina para la evaluación simultánea de ambos parámetros. Para ello se utilizó semen descongelado de cinco toros Brahman. Los espermatozoides fueron teñidos y se agruparon según el estado de la cromatina, en normal (teñidos de azul o verde claro) y en cromatina dañada (teñidos de azul oscuro o violeta), para luego determinar el efecto de la integridad de la cromatina sobre el porcentaje de morfoanomalías. Los espermatozoides con cromatina normal presentaron un porcentaje significativamente menor ( $P < 0,0001$ ) de morfoanomalías de la cabeza ( $2,13 \pm 3,11\%$ ) que aquellos espermios que presentaron cromatina dañada ( $30,42 \pm 2,84\%$ ). Algunas morfoanomalías de la cabeza fueron casi exclusivas de los espermatozoides con cromatina dañada, como son cabeza suelta ( $13,09 \pm 2,44\%$ ), cabeza piriforme ( $6,96 \pm 0,93\%$ ), cabezas vacuoladas ( $5,04 \pm 0,85\%$ ) y macrocabezas ( $4,32 \pm 0,64\%$ ) y en todos los casos difirieron significativamente de los espermatozoides con cromatina normal, en los que la morfoanomalía más abundante fue la cabeza piriforme ( $1,81 \pm 1,02\%$ ). En conclusión, la integridad de la cromatina y la morfología espermática están estrechamente relacionadas y los espermatozoides con cromatina dañada presentan más anomalías de la cabeza que los espermatozoides con cromatina normal.

**Palabras clave:** Azul de toluidina, cromatina espermática, morfología, cabeza espermática, toro.

### ABSTRACT

The relationship between chromatin integrity and sperm head morphoanomalies was studied using the toluidine blue stain for the simultaneous assessment of both parameters. Thawed semen from five Brahman bulls was used. Sperm were stained and grouped into normal chromatin (stained light blue) and damaged chromatin (stained dark blue or violet) and effect of chromatin integrity on the percentage of head morphoanomalies was determined. Sperm with normal chromatin showed a significantly ( $P < 0.0001$ ) lower percentage of head morphoanomalies ( $2.13 \pm 3.11\%$ ) that sperm with damaged chromatin ( $30.42 \pm 2.84\%$ ). Some head morphoanomalies were almost exclusive of sperm with damaged chromatin, such as loose head ( $13.09 \pm 2.44\%$ ), pyriform heads ( $6.96 \pm 0.93\%$ ), vacuolated heads ( $5.04 \pm 0.85\%$ ) and macrocephalic ( $4.32 \pm 0.64\%$ ), in all cases, significantly differences were observed with sperm with normal chromatin, which the most abundant morphoanomaly was the pyriform head ( $1.81 \pm 1.02\%$ ). In conclusion, chromatin integrity and sperm morphology are closely related and sperm with damaged chromatin have more head morphoanomalies than sperm with normal chromatin.

**Key words:** Toluidine blue, sperm chromatin, morphology, sperm head, bull.

### INTRODUCCIÓN

La evaluación del potencial reproductivo de un toro (*Bos taurus-Bos indicus*) (BSE) es un procedimiento relativamente rápido y económicamente prudente, e implica una valoración

completa de todos los factores que están involucrados para que el animal logre alcanzar "hipotéticamente" su capacidad para lograr una preñez efectiva. Las normas para BSE fueron aprobadas por la Sociedad de Teriogenología [24] y consiste en 3 pasos: un examen físico generalizado que incluya las partes externas e internas del sistema reproductivo, una medición de la circunferencia escrotal y la evaluación de la calidad seminal.

Tradicionalmente en Venezuela, los centros de criopreservación de semen de toros monitorean la calidad seminal mediante la evaluación de parámetros individuales, como la motilidad espermática, y los que hacen pruebas complementarias realizan, con menor periodicidad, la evaluación de la viabilidad espermática y de sus anomalías morfológicas, lo cual incluye la integridad acrosómica [17]. Sin embargo, este análisis uniparamétrico está siendo sustituido por evaluaciones simultáneas de varios parámetros, lo que permite estimar con más precisión el potencial reproductivo de los toros [15].

Entre los parámetros tradicionales del análisis de calidad espermática, el estudio morfológico tiene gran importancia dada su relación con el potencial reproductivo [2,6]. Particularmente, el estudio de la cabeza espermática, que porta el material genético en forma de cromatina (cromosomas condensados asociados a protaminas), ya sea mediante la evaluación de su forma a través de diferentes tinciones o de las medidas morfométricas, a través de los sistemas computarizados de análisis seminal, tiene gran interés dado que, tanto la alteraciones de la forma, de las medidas morfométricas, así como de la integridad de la cromatina, han sido relacionadas con el potencial reproductivo de los toros [14, 18, 19]. Los espermatozoides con alteraciones morfológicas de la cabeza no participan del proceso de fecundación [20], mientras que los espermatozoides con cromatina dañada, si bien no pierden la capacidad fecundante, no son capaces de promover un desarrollo embrionario normal [11].

La integridad de la cromatina puede ser evaluada mediante técnicas reconocidas, tales como: *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL), *In Situ Nick Translation* (INST), *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization* (DBD-FISH) Ensayo Cometa y *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD) [7], muchas de ellas laboriosas y costosas, lo que limita la adopción de forma rutinaria de esta evaluación en los laboratorios. En cambio, la solución de azul de toluidina (AT) es un colorante nuclear que genera reacciones metacromáticas cuando se asocia a la cromatina, lo cual ocurre cuando el colorante se incorpora en la cromatina rica en histonas, con abundancia de lisina, presenta una coloración violeta-azulada intensa, mientras que cuando lo hace a cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul-pálida [3]. Se trata de una prueba de maduración-condensación nuclear y los espermatozoides con cromatina inmadura tendrían habitualmente más roturas del ADN [7]. Se ha utilizado para evaluar la integridad de la cromatina en semen de diferentes especies, incluyendo el semen de toro [4, 17].

Las alteraciones de la integridad de la cromatina están relacionadas con alteraciones en la forma de la cabeza [1, 10, 21]. Algunos estudios han reportado una correlación negativa entre los espermatozoides con cromatina dañada y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, pero midiendo ambos parámetros por separado [9, 16] y correlacionando dicha información. Pocos trabajos han estudiado la relación entre la integridad de la cromatina y forma de la cabeza espermática, midiendo ambos parámetros en el mismo espermatozoide. Acevedo [1], evaluó la estructura de la cromatina espermática con SCSA, Enciso y col. [7] utilizaron la prueba de SCD y Beletti y col. [4] al igual que este ensayo utilizaron la tinción de AT. En todos estos trabajos se describió, que tanto los espermatozoides con cromatina normal como dañada podían poseer alteraciones o no en la forma de la cabeza; no obstante, solo Acevedo [1] realizó la investigación sobre una población de espermios y no individualizó cada espermatozoide.

En esta investigación, la novedad es que la evaluación de la integridad de la cromatina y la forma de la cabeza espermática se realizó simultáneamente a cada espermatozoide, mediante la tinción de AT, lo cual podría representar una alternativa más rápida y de bajo costo, que refuerzan los resultados de la evaluación espermática, además de precisar la estimación del potencial reproductivo de toros. Esta evaluación permite identificar aquellos espermatozoides con morfología normal y cromatina dañada, lo cual no es posible mediante el análisis morfológico rutinario. En base a esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar de manera simultánea la integridad de la cromatina y la forma de la cabeza del espermatozoide de toro y así determinar si existe una asociación entre la integridad de la cromatina y la presencia de anomalías morfológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección y procesamiento del semen

Para la realización del experimento se utilizó semen descongelado de tres eyaculados de cinco toros (n=15) de raza Brahman, con edades comprendidas entre 5 y 8 años. Las pajuelas con semen criopreservado se obtuvieron de un centro especializado en la producción de semen de toro, ubicado en la población de La Villa del Rosario, municipio Rosario de Perijá, estado Zulia. Los eyaculados fueron colectados entre las 5:00 y 7:00 de la mañana mediante vagina artificial. Después de la evaluación seminal de rutina, las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron diluidas, identificadas y envasadas en forma automática en pajuelas de 0,54 mL, a una concentración espermática mínima de 30 millones de espermatozoides por dosis. El diluyente de congelación estaba constituido por leche descremada (83%), yema de huevo (8%), glicerol (8%), fructosa (1%), lincospectina (4 mL), penicilina (1.000.000 UI) y estreptomycin (1 g). Luego las pajuelas fueron congeladas en tanques que contenían nitrógeno líquido

(MVE® Millenium 2000, XC20, Minnesota, EUA) a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Una semana después de la congelación, las muestras fueron evaluadas nuevamente para verificar la calidad del semen criopreservado. La evaluación de la integridad de la cromatina espermática y la morfometría en forma conjunta se realizó en el laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Zulia, Venezuela.

#### Determinación de la integridad de la cromatina

La integridad de la cromatina espermática se determinó mediante la coloración con AT [3,4]. Las pajuelas de semen se descongelaron en baño María (Gemmy® modelo YCW-03S, Taipei, Taiwán) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, una vez descongeladas se procedió a realizar dos frotis por pajuela, los cuales se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1 v/v) por 1 min. y etanol al 70% por 3 min. Luego, cada frotis se hidrolizó por 25 min en 4 N de ácido clorhídrico, se lavó en agua destilada y se secó al aire. Para realizar la tinción se agregó sobre el frotis una gota de 30  $\mu\text{L}$  del colorante (AT al 0,025% en buffer McIlvaine a pH 4) y se colocó un cubreobjetos. Los frotis se observaron con un microscopio de campo claro (Globe®, LEM 1600, Alemania) con un aumento de 1000X y se clasificaron como espermatozoides con cromatina normal, aquellos teñidos de color azul claro, mientras que los teñidos de color azul oscuro o violeta, se consideraron como células con cromatina dañada, además, las células con cromatina dañada generalmente tienen una apariencia granular fina, lo que facilita su identificación.

#### Análisis morfológico de la cabeza espermática

Para evaluar los frotis teñidos previamente con AT se utilizó el ASMA, genéricamente denominado "Automated Semen Morphology Analysis" a través del módulo de morfología de un programa disponible comercialmente (Spem-class Analyzer, Update SCA® v.3.4, versión 2008, Microptic, Barcelona, España). El sistema consta de un microscopio triocular (Olympus® Bx41, Tokio, Japón) provisto de una cámara de video (Basler® A312f, Serial DA00067801CCD, Ahrensburg, Alemania) conectada a un procesador Intel® Core Duo (California, EUA). La configuración del sistema de la computadora incluía un digitalizador de imágenes de video PIP-1024 B (Matrox Electronic Sistem Ltd.®, Québec, Canadá) un software de análisis y un monitor de alta resolución pantalla plana de 17" (Compaq®, Texas, EUA), las imágenes fueron grabadas en formato de video  $512 \times 512 \times 8$  bits, digitalizadas a 262,144 píxeles (elementos de fotografía) y 256 niveles de grises. La resolución de las imágenes fue 0,11 y 0,15  $\mu\text{m}$  por píxel en el plano horizontal y vertical, respectivamente y la intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fue igual para todas las muestras. Estas imágenes son transmitidas al computador en cuyo software se pueden realizar la medición lineal básica sobre el espermatozoide además de clasificar su forma.

#### Evaluación simultánea de la integridad de la cromatina y la morfología espermática

Los frotis teñidos con AT se observaron con un aumento de 400X y se evaluó en forma simultánea la integridad de la cromatina y la forma de la cabeza de cada espermatozoide. En el diseño experimental se estableció contabilizar como mínimo 500 espermatozoides con cromatina dañada y normal y establecer de igual manera la morfología de cada uno, sin embargo, como se observa en los resultados, el número de espermios contados es mayor, sobre todo los que tienen cromatina normal ( $n=1.599$ ). Por cada pajuela descongelada ( $n=15$ ) se contabilizaron al menos 1000 espermatozoides digitalizados; esta cifra se estableció basándose en los resultados de una investigación previa [17], donde se determinó que el porcentaje de espermios con cromatina dañada para toros Brahman se encuentra alrededor del 4%; lo cual obliga a contabilizar muchos espermatozoides para obtener una muestra representativa de éstos con daño en su cromatina, lo cual permite también obtener un valor numérico de cromatina normal muy superior al de cromatina dañada.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS [25]. El efecto de la integridad de cromatina (normal vs dañada) sobre los porcentajes de morfoanomalías de la cabeza se analizó con el modelo lineal general de análisis de varianza (procedimiento GLM) mientras que el procedimiento LSMEANS fue usado para determinar las diferencias de medias, luego de la transformación de la data a través del método del arcoseno cuadrado. Todos los valores se presentan como medias corregidas  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los espermatozoides contabilizados se valoraron 674 con cromatina dañada y 1599 con cromatina normal (TABLA I). El análisis de los resultados demuestra que existe una relación entre la integridad de la cromatina y el porcentaje de morfoanomalías de la cabeza espermática y que, tanto los espermatozoides con cromatina normal como dañada pueden tener o no alteraciones en la forma de la cabeza, lo cual coincide con hallazgos previos [1, 4,10]. Los porcentajes se calcularon separadamente sobre el total de espermatozoides con cromatina normal que estén morfológicamente normales o anormales (a + b) y sobre el total de espermatozoides con cromatina dañada que estén morfológicamente normales o anormales (c + d), agrupando las cabezas estudiadas en dos poblaciones que se subdividen a su vez en dos subpoblaciones. El porcentaje de morfoanomalías de cabeza fue significativamente mayor ( $P<0,0001$ ) en los espermatozoides con cromatina dañada ( $30,42 \pm 2,84\%$ ), que en los espermatozoides con cromatina normal ( $2,13 \pm 3,11\%$ ). Tanto la forma de la cabeza como la integridad de la cromatina tienen un efecto significativo sobre

el potencial reproductivo de los toros y teniendo en cuenta que la cabeza del espermatozoide está conformada prácticamente por el material genético, una relación entre estos dos parámetros espermáticos, podría esperarse. Del mismo modo, es importante señalar que el 23% (469/2034, TABLA I) de los espermatozoides clasificados como morfológicamente normal tenían su cromatina dañada, valor este un tanto elevado, se considera que son células con buena motilidad y que podrían fecundar un óvulo de manera efectiva, derivando posteriormente en desarrollo embrionario inadecuado [11].

En el presente estudio, la evaluación morfológica se restringió a la cabeza del espermatozoide, sin embargo Enciso y col. [10], quienes evaluaron la relación entre la integridad de la cromatina y las diferentes morfoanomalías espermáticas observaron que, los espermios con cromatina dañada poseían un mayor porcentaje de alteraciones morfológicas que los espermatozoides con cromatina normal y que este porcentaje presentó mayor relación con las morfoanomalías clasificadas como mayores.

Cuando se valora el efecto de la criopreservación sobre la integridad del ADN, la mayoría de las investigaciones afirman que la estructura de la cromatina espermática no se afecta durante el proceso de congelación-descongelación [23, 26], debido a que el ADN espermático resiste la criopreservación [10].

En la TABLA II se detallan los porcentajes para cada una de las morfoanomalías observadas. En los espermatozoides con cromatina dañada, la morfoanomalía más común fue la cabeza suelta y la menos abundante fue la microcabeza. Mientras que en los espermatozoides con cromatina normal, la morfoanomalía más abundante fue la cabeza piriforme.

Los resultados del presente trabajo evidencian que la integridad de la cromatina y la morfología están relacionadas de manera estrecha, hecho que coincide con la investigación de Acevedo [1]. En humanos, algunos estudios afirman que la morfología anormal está asociada con daño en la cromatina [5, 13] y esto ha sido sugerido previamente para el semen de toro [12, 22]. Los espermatozoides con alteraciones en la forma de la cabeza poseen diferencias significativas en el área y en la condensación y/o distribución de la cromatina en comparación con los espermatozoides con cabeza normal [12].

Los espermatozoides con morfoanomalías son fácilmente detectables durante la evaluación microscópica. Sin embargo, los espermatozoides con cromatina dañada y morfología normal no son reconocibles con el análisis microscópico rutinario y por tanto, la eliminación de eyaculados en base a este criterio no es tan fácil y la no identificación de este grupo de espermatozoides podría estar sobreestimando el potencial reproductivo de los toros [10]. Además, teniendo en cuenta que los espermatozoides con alteraciones en la forma de la cabeza no participan en el proceso de fecundación [20] es probable que los espermatozoides que causan pérdida embrionaria precoz son espermatozoides que no tienen alteraciones en la forma de la cabeza, y por ende, el origen de la falla estaría en alteraciones de la cromatina [1] y de allí la necesidad de evaluar de forma simultánea la integridad de la cromatina y la forma de la cabeza espermática.

Existen muchas hipótesis que explican porque existe una población de espermios morfológicamente anormales y con daño en su ADN, sin embargo, las posibles explicaciones apuntan a una posible apoptosis abortiva, o podría potencial-

**TABLA I**  
**VALORACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE ACUERDO A LA INTEGRIDAD DE SU CROMATINA (NORMAL/DAÑADA) EN SEMEN DE TORO CRIOPRESERVADO**

Cromatina	Morfología*, %		
	Normal	Anormal	Total
Normal	97,87 ± 3,49 (1565)	2,13 ± 3,11 (34)	100 (1599)
Dañada	69,58 ± 3,14 (469)	30,42 ± 2,84 (205)	100 (674)

\*P<0,05. ( ): Valor entre paréntesis corresponde al número de espermatozoides evaluados.

**TABLA II**  
**EFFECTO DE LA INTEGRIDAD DE LA CROMATINA SOBRE EL PORCENTAJE DE ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE TORO EN SEMEN CRIOPRESERVADO**

Forma de la cabeza	Cromatina normal	Cromatina dañada
Microcabeza	0,13 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,44 <sup>a</sup>
Macrocabeza	0,10 ± 0,70 <sup>a</sup>	4,32 ± 0,64 <sup>b</sup>
Piriforme	1,18 ± 1,02 <sup>a</sup>	6,96 ± 0,93 <sup>b</sup>
Cabeza suelta	0,626 ± 2,67 <sup>a</sup>	13,09 ± 2,44 <sup>b</sup>
Vacuolada	0,094 ± 0,93 <sup>a</sup>	5,04 ± 0,85 <sup>b</sup>

a,b: Valores con letras diferentes en la misma fila, difieren significativamente, P<0,05.

mente tener un origen genético [10]. No obstante, se podría afirmar que espermatozoides con fragmentación del ADN expresan alguna alteración morfológica. Algunos estudios confirman que ciertos aspectos inherentes a la fertilidad del toro, incluyendo las anomalías morfológicas dependen del control genético [8], lo cual confirma que derivan mayoritariamente del proceso de espermatogénesis.

## CONCLUSIONES

La integridad de la cromatina y la morfología espermática están estrechamente relacionadas y los espermatozoides con cromatina dañada presentan un mayor porcentaje de anomalías en la forma de la cabeza que los espermatozoides con cromatina normal, no obstante, un porcentaje (23%) apreciable de espermatozoides morfológicamente normal, tienen su cromatina dañada.

La incorporación de este tipo de evaluaciones en el examen rutinario de la calidad espermática aporta información relevante al seminograma y podría mejorar la estimación del potencial reproductivo de los toros.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ, proyecto CC-0439-11) y al Fundo La Rosita (El Guayabo, Edo. Zulia, Venezuela) por el financiamiento de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACEVEDO, N. Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine. Virginia State University. Grade Thesis. 84 pp. 2001.
- [2] AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenol.** 70(4):682-691. 2008.
- [3] ANDREETTA, A.M.; STOCKERT, J.C.; BARRERA, C. A. A simple method to detect sperm chromatin abnormalities: cytochemical mechanism and possible value in predicting semen quality in assisted reproductive procedures. **Int. J. Androl.** 18 (Suppl 1): 23-28. 1995.
- [4] BELETTI, M.E.; COSTA, L.; MENDES, M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morphol. Sci.** 22(2):85-90. 2005.
- [5] CELIK-OZENCI, C.; JAKAB, A.; KOVACS, T.; CATALA-NOTTI, J.; DEMIR, R.; BRAY-WARD, P.; WARD, D.; HUSZAR, G. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. **Human Reprod.** 19:2052-2059. 2004.
- [6] CORREA, J.R.; HEERSCHKE, G.; ZAVOS, P.M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenol.** 47:715-729. 1997.
- [7] CORTES-GUTIÉRREZ, E.L.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J.L.; GONSÁLVEZ, J. Evaluación del daño en el DNA espermático. **Actas Urol. Esp.** 31(2):120-131. 2007.
- [8] CHENOWETH, P.J. Genetic sperm defects. **Theriogenol.** 64:457-468. 2005.
- [9] DOBRINSKI, I.; HUGHES, H.P.; BARTH, A.D. Flow cytometer and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **J. Reprod. Fertil.** 101:531-538. 1994.
- [10] ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenol.** 76:23-32. 2011.
- [11] FATEHI, A.N.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J. Androl.** 27(2):176-188. 2006.
- [12] FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M.; FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Androl.** 30:85-89. 1998.
- [13] KUBO-IRIE, M.; MATSUMIYA, K.; IWAMOTO, T.; KANEKO, S.; ISHIJIMA, S. Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. **Mol. Reprod. Dev.** 70:70-81. 2005.
- [14] MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; PINTADO-SANJUAN-BENITO, B.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; DE LA FUENTE MARTÍNEZ, J. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenol.** 64:232-241. 2005.
- [15] MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Anim. Reprod. Sci.** 105(1-2):104-118. 2008.
- [16] MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet. Scand.** 50:2. 2008.
- [17] NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; FINOL-PARRA, G.; VÍLCHEZ-SIU, V.; OSORIO-

- MELÉNDEZ, C.; RUBIO-GUILLÉN, J.; VALERIS-CHACÍN, R. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 24:116-122. 2011.
- [18] OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **J. Androl.** 22(4):595-603. 2001.
- [19] RUBIO-GUILLÉN, J. Efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Trabajo de Ascenso. 97 pp. 2008.
- [20] SAACKE, R.G.; De JARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S. Can spermatozoa with abnormal head gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle?. **Theriogenol.** 51:117-128. 1998.
- [21] SAILER, B.; JOST, L.; EVENSON, D. Mammalian sperm DNA susceptibility to *in situ* denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **J. Androl.** 16:80-87. 1995.
- [22] SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry.** 24(2):167-173. 1996.
- [23] SLOWINSKA, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. **Cryobiol.** 56(1):100-102. 2008.
- [24] SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY (STF). Guidelines for the bull breeding soundness evaluation as recommended by the society for Theriogenology. 1993. On Line: [http:// www.beefimprovement.org/guidelines/App6-1.PDF](http://www.beefimprovement.org/guidelines/App6-1.PDF). 27/02/2012.
- [25] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide. Version 8.2. Cary, NC. 2001.
- [26] VAN DER SCHANS, G.P.; HARING, R.; VAN DIJK-KNIJNENBURG, H.C.; BRUIJNZEEL, P.L.; DEN DAAS, N.H. An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. **J. Androl.** 21(2):250-257. 2000.