

EFECTO DE LA INTEGRIDAD DE LA CROMATINA SOBRE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE TORO

Effect of Chromatin Integrity on Bull Sperm Head Morphometry

Héctor Nava-Trujillo^{1,2}, Armando Quintero-Moreno^{2,6*}, Adirno Hernández-Fernández³, Venuslira Vilchez-Siu⁴, Carla Osorio-Meléndez², Jorge Rubio-Guillén^{2,6}, Decio González-Villalobos^{2,6} y Geovanny Finol-Parra⁵

¹ Investigación y Desarrollo, Fundo La Rosita, El Guayabo, Edo. Zulia, Venezuela. ²Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. ³Producción Agropecuaria, Universidad Experimental del Sur del Lago, Santa Bárbara, estado Zulia, Venezuela. ⁴Departamento de Enfermedades Transmisibles, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. ⁵Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. ⁶Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *armando-quintero@fcv.luz.edu.ve

RESUMEN

Con el propósito de determinar el efecto de la integridad de la cromatina sobre las dimensiones morfométricas (largo, ancho, área, perímetro, elipticidad) de la cabeza espermática, se evaluaron mediante un sistema computarizado de análisis de morfometría espermática, 2273 cabezas de espermatozoides de toros Brahman, las cuales fueron teñidas con azul de toluidina para determinar el estatus de la cromatina, resultando 1599 con cromatina normal y 674 con cromatina dañada. La integridad de la cromatina afectó significativamente tres de los parámetros evaluados. Los espermatozoides con cromatina dañada presentaron mayor ancho ($4,32 \pm 0,009\mu\text{m}$, $P < 0,05$) y área ($29,91 \pm 0,009 \mu\text{m}^2$, $P < 0,05$) que los espermatozoides con cromatina normal (ancho: $4,22 \pm 0,006 \mu\text{m}$; área: $29,23 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$). No se observaron diferencias significativas en la longitud y el perímetro, sin embargo, la elipticidad fue menor en los espermatozoides con cromatina dañada ($1,83 \pm 0,004$, $P < 0,05$) que en los espermatozoides con cromatina normal ($1,87 \pm 0,003$). Los resultados del presente estudio sugieren que la cromatina dañada genera un pequeño incremento en el tamaño de la cabeza espermática haciéndola más redondeada. Mayores investigaciones son necesarias a fin de determinar la implicación de estos hallazgos sobre el potencial reproductivo de toros.

Palabras clave: Cabeza espermática, cromatina, morfometría, azul de toluidina.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of chromatin integrity on the morphometric dimensions (length, width, area, perimeter, ellipticity) of the bull sperm head, 2273 sperm heads from Brahman bulls were evaluated by using a computerized system to sperm morphometry analysis. Sperms were stained with toluidine blue to determine the chromatin status, resulting in 1599 heads with normal chromatin and 674 heads with damaged chromatin. Chromatin integrity affected significantly three of five parameters evaluated. Sperm with damaged chromatin had more width ($4.32 \pm 0.009\mu\text{m}$, $P < 0.05$) and area ($29.91 \pm 0.09\mu\text{m}^2$, $P < 0.05$) than sperm with normal chromatin (width: $4.22 \pm 0.006\mu\text{m}$; area: $29.23 \pm 0.06\mu\text{m}^2$). No significant differences in the length and perimeter were observed, while ellipticity were decreased in sperm with damaged chromatin (1.83 ± 0.004 , $P < 0.05$) in comparison with sperm with normal chromatin (1.87 ± 0.003). Results of this study demonstrate that damaged chromatin results in a subtle increase of sperm head size making this more rounded and that simultaneous evaluation of chromatin integrity and sperm head morphometry is possible. Further research is needed to determine the implications of these findings on the reproductive potential of bulls.

Key words: Sperm head, chromatin, morphometry, toluidine blue.

INTRODUCCIÓN

La cabeza del espermatozoide tiene una longitud de entre 8 y 10 μm y un ancho de 4 a 5 μm [34] y las variaciones en

estas mediciones y/o los productos de sus combinaciones (área, perímetro, elipticidad) podrían ser un indicador de cromatina dañada [33], ya que la cabeza del espermatozoide está compuesta básicamente por la cromatina (ADN asociado a protaminas).

La integridad de la cromatina y las dimensiones de la cabeza espermática están relacionadas con el potencial reproductivo del toro (*Bos taurus-Bos indicus*) [13, 37] y factores como la criopreservación, individuo evaluado, eyaculado y genotipo han sido reportados por afectar, tanto la integridad de la cromatina como la morfometría de la cabeza espermática [12, 19, 23, 32, 33, 37]. Además, teniendo en cuenta que los espermatozoides con cromatina dañada tienen más alteraciones morfológicas [7, 25], y que las morfoanomalías de la cabeza espermática están relacionadas con alteraciones en el área [8], un efecto de la integridad de la cromatina (normal vs. dañada) sobre la morfometría de la cabeza espermática podría esperarse.

La evaluación de la cromatina ha cobrado gran interés, ya que varios trabajos han reportado correlaciones negativas entre la integridad de la cromatina, la calidad espermática, el desarrollo embrionario y la fertilidad [10, 17-19, 23, 24], y aunque existen varios métodos para su estudio, en su mayoría son costosos. Actualmente el azul de toluidina (AT), un colorante nuclear, se utiliza tanto para la evaluación de la cromatina, como para la determinación de la morfometría de la cabeza espermática mediante el uso de sistemas computarizados [3-5, 24, 25, 29], lo cual disminuye el efecto de las replicas y las lecturas del personal técnico [12, 28].

El AT se une a los grupos fosfatos libres del ADN que quedan expuestos cuando se pierde la unión con las protaminas [22]. En espermatozoides con cromatina normal, la mayoría de los fosfatos están bloqueados por las protaminas y pocas moléculas del colorante se unen al ADN, lo que resulta en una coloración que varía de azul a verde claro, mientras que en espermatozoides con cromatina dañada, que tienen mayor número de sitios de unión para el colorante, el color resultante varía de azul oscuro a morado [3,22].

Pocos estudios sobre el efecto de la integridad de la cromatina sobre la morfometría de la cabeza espermática han sido publicados. Beletti y col. [4] utilizando la tinción de azul de toluidina, no observaron diferencias significativas entre espermatozoides con cromatina normal y dañada, mientras que en espermatozoides de perro (*Canis familiaris*) se ha reportado una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides elípticos y el daño en la cromatina [20]. La evaluación en el mismo espermatozoide de la integridad de la cromatina y la morfometría de la cabeza con una técnica sencilla y económica, como la tinción de azul de toluidina asociada a un sistema de medición objetivo, representaría una alternativa para mejorar la evaluación espermática y la estimación del potencial reproductivo de los toros, ya que se podrían identificar aquellos toros y/o eyaculados cuyos espermatozoides poseen alteraciones morfométricas y cromatina dañada, ya que ambas situa-

ciones han sido relacionadas con subfertilidad [6, 17, 18, 37] y no son fácilmente detectables con el análisis microscópico rutinario. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la presencia o no de daño en la cromatina afecta las dimensiones de la cabeza espermática en semen criopreservado de toros Brahman.

MATERIALES Y MÉTODOS

El semen criopreservado se obtuvo de un centro especializado en la producción de semen de toro (VIATECA®), ubicado en la población de la Villa del Rosario, municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela, mientras que las evaluaciones se realizaron en el laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia. Para la realización del estudio se utilizó semen congelado de tres eyaculados de cinco toros de raza Brahman y colectados en la misma época, con edades comprendidas entre 5 y 8 años. 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 estreptomomicina (1 g). Luego del envasado, las pajuelas fueron congeladas en tanques que contenían nitrógeno líquido (MVE® Mille-nium 2000, XC20, Minnesota, EUA) a -196°C .

Determinación de la integridad de la cromatina

El porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada se determinó mediante la coloración con azul de toluidina [4]. Las pajuelas de semen se descongelaron en baño María (Gemmy® modelo YCW-03S, Taipei, Taiwán) a 37°C por 30 segundos, una vez descongeladas se procedió a realizar tres extendidos espermáticos 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 extendido espermático 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 extendido espermático una gota de 30 μL del colorante (azul de toluidina al 0,025% en buffer McIlvaine a pH 4) y se colocó un cubreobjetos.

Determinación de la morfometría de la cabeza espermática

El análisis se realizó con el módulo de morfometría de un software disponible comercialmente ASMA (Sperm-classAnalyze 2008®, Microptic, Barcelona, España). El sistema consta de un microscopio Olympus BX41TF (Tokio, Japón) con un objetivo de campo claro y una cámara de vídeo Basler (CCD AVC-D7CE, Sony Corporation, Tokio, Japón), conectado a un procesador Pentium de 950 MHz. La intensidad de la fuente

de iluminación y el desplazamiento de la cámara es igual para todas las muestras. La configuración del sistema de la computadora incluye un digitalizador de imágenes de vídeo PIP-1024 B (MatroxElectronicSistem Ltd., Quebec, Canadá), un software de análisis y un monitor de alta resolución Sony Triniton PVM-1443MD (Sony Corporation, Tokio, Japón). Las imágenes fueron grabadas en formato de vídeo 512 x 512 x 8 bits, digitalizadas a 262,144 píxeles (elementos de la fotografía).

Para evaluar los parámetros morfométricos se utilizaron los extendidos espermáticos de cada muestra teñidos con AT. Éstos se observaron con el microscopio de campo claro a un aumento de 400X y los espermatozoides 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 [4]; además, las células con cromatina dañada generalmente tienen una apariencia granular fina, lo que facilita su identificación [2]. De manera simultánea, las medidas (longitud, ancho, área, perímetro y elipticidad) de cada cabeza espermática individual y de acuerdo a la integridad de la cromatina espermática (normal o dañada) fueron guardadas en el programa Excel® (Microsoft®, Corporation, Redmond, Washington, EUA) compatible con las bases de datos del software.

Metodología estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS [35]. El efecto de la integridad de la cromatina sobre los parámetros morfométricos de la cabeza espermática (longitud, ancho, área, perímetro, elipticidad) se analizó con el modelo lineal general de análisis de varianza (procedimiento GLM) mientras que el procedimiento LSMEANS fue usado para determinar las diferencias entre medias. Todos los valores se presentan como medias corregidas \pm E.E.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de estudiar el efecto de la integridad de la cromatina sobre la morfometría de la cabeza espermática, en el presente estudio se utilizó la tinción de azul de toluidina asociada a la evaluación morfométrica computarizada, para ello se analizaron 2.273 cabezas de espermatozoides descongelados de toros de raza Brahman, de las cuales 1.599 se clasificaron con cromatina normal y 674 con cromatina dañada.

Las dimensiones de la cabeza espermática obtenidas en el presente estudio se detallan en la TABLA I. Estas fueron menores a las observadas para toros de la misma raza por Rubio-Guillen y col. [32], lo cual podría deberse a que en ese estudio se empleó la tinción de Hemacolor®, mientras que en el presente se utilizó la tinción de azul de toluidina, que ha sido reportada por generar menores dimensiones de la cabeza espermática [29]. Este hecho puede deberse a que el azul de toluidina es un colorante nuclear, y una situación similar se observó para otra tinción de este tipo como lo es la tinción de

TABLA I
DIMENSIONES DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES DE SEMEN CONGELADO DE TORO
(MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR)

Parámetro	N total de cabezas evaluadas
Nº de observaciones	2273
Longitud (μm)	7,90 \pm 0,009
Ancho (μm)	4,25 \pm 0,005
Área (μm^2)	29,43 \pm 0,05
Perímetro (μm)	21,44 \pm 0,03
Elipticidad	1,86 \pm 0,02

Feulgen [9]. En general, los protocolos de tinción de espermatozoides afectan sutilmente el tamaño de la cabeza por los cambios osmóticos y los pasos de deshidratación [15] y el impacto del uso de varias tinciones para la determinación de la morfometría de la cabeza espermática en mamíferos utilizando sistemas computarizados, han sido referidos en diferentes trabajos [11,14-16,29,36].

En el presente estudio se determinó que la integridad de la cromatina afectó significativamente tres de los cinco parámetros estudiados (TABLA II). Los espermatozoides con cromatina dañada presentaron mayores dimensiones para el ancho y el área, con menores valores para la elipticidad, sin embargo no se observaron diferencias significativas en la longitud y el perímetro, mientras que la fue en los espermatozoides con cromatina dañada, lo cual indica que estos espermatozoides son un poco más redondeados, y estos resultados coinciden con los reportados por Peña y col. [27] quienes observaron en semen canino, que un alto nivel de daño en el ADN estuvo relacionado con las cabezas espermáticas más cortas y anchas.

TABLA II
EFFECTO DEL DAÑO EN LA CROMATINA SOBRE LAS DIMENSIONES DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES DE TORO (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR)

Parámetro	Cabezas espermáticas evaluadas con	
	Cromatina Normal	Cromatina Dañada
Nº de observaciones	1599	674
Longitud (μm)	7,91 \pm 0,011 ^a	7,89 \pm 0,017 ^a
Anchura (μm)	4,22 \pm 0,006 ^a	4,32 \pm 0,009 ^b
Área (μm^2)	29,23 \pm 0,06 ^a	29,91 \pm 0,09 ^b
Perímetro (μm)	21,45 \pm 0,03 ^a	21,42 \pm 0,05 ^a
Elipticidad	1,87 \pm 0,003 ^a	1,83 \pm 0,004 ^b

Valores con letras diferentes en la misma fila difieren, $P < 0,05$.

Es importante resaltar que las diferencias observadas en el presente estudio fueron numéricamente pequeñas, pero estadísticamente significativas, hecho que se atribuye a la sensibilidad de los sistemas computarizados de análisis morfométrico.

cos para detectar diferencias mínimas en las mediciones morfométricas, las cuales son valores homogéneos y con coeficientes de variación muy bajos. También es importante destacar que, en el caso del semen bovino las alteraciones de la cromatina son heterogéneas y pueden afectar diferentes regiones de la cabeza, generando ya sea una reducción en su tamaño, ningún cambio en este o un ligero incremento [4], lo cual fue observado en el presente estudio.

Los resultados aquí mostrados contrastan con los descritos por Beletti y col. [4], quienes aunque no observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados utilizando al igual que en el presente estudio la tinción con azul de toluidina, si reportaron una correlación negativa entre el nivel de descondensación de la cromatina, el área y el perímetro de la cabeza espermática. Además, recientemente, Beletti y col. [5] observaron que las cabezas espermáticas con cromatina menos compacta tenían menor área que aquellas con cromatina normal. Probablemente estas diferencias se deban al hecho de que en esos estudios [4,5] se utilizó semen de toros Simmental (*Bos taurus*), mientras que en el presente estudio el semen provenía de toros Brahman. Existen evidencias que demuestran las diferencias significativas entre la morfometría de la cabeza de los espermatozoides de estos dos grupos genéticos, siendo en los toros *Bos indicus* las cabezas más pequeñas [5]. Estas diferencias también se han observado entre los espermatozoides de toros de la raza Brahman y los de toros mestizos Holstein-Brahman [32].

Varios factores han sido reportados por afectar las dimensiones de la cabeza espermática. La criopreservación genera una reducción del tamaño de la cabeza [11, 32] posiblemente debido a los cambios osmóticos durante el proceso de criopreservación, al daño acrosomal o a la sobrecondensación de la cromatina [1, 11, 21, 31]. También las dimensiones de la cabeza del espermatozoide de toro están influenciadas por la integridad de la membrana plasmática; así se ha observado que el área de la cabeza de espermatozoides vivos fue menor que la de los espermatozoides muertos [30]. Pocos estudios han evaluado el efecto de la integridad de la cromatina sobre la morfometría de la cabeza espermática. Algunos se han hecho indirectamente utilizando el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) para evaluar la integridad de la cromatina [26, 33] lo que no permite la determinación simultánea de la morfometría, cosa que si se puede hacer con la tinción de azul de toluidina, como se ha demostrado previamente [4] y en el presente estudio.

CONCLUSIÓN

La asociación de la tinción de azul de toluidina y el análisis computarizado de la morfometría espermática permite la evaluación en el mismo espermatozoide de la integridad de la cromatina y la morfometría de la cabeza. La integridad de la cromatina afectó sutil pero significativamente la morfometría

de la cabeza del espermatozoide de toro, teniendo los espermatozoides con cromatina dañada más ancho y área y menor elipticidad, por lo cual son un poco más redondeados.

AGRADECIMIENTO

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol. Reprod.** 66:354-360. 2002.
- [2] BARTH, A.D.; OKO, R.J. Defects of the sperm head. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press. Pp 130-192. 1989.
- [3] BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bullspermatozoa. **Braz. J. Gen.** 19:97-103.1996.
- [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.** 22:85-90. 2005.
- [5] BELETTI, M.E.; COSTA, L.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.** 85(1-2):105-116. 2005.
- [6] CASEY, P.J.; GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O.; CHABOT, D.D.; LIU, I.K.M. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenol.** 47:575-582. 1997.
- [7] 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.
- [8] FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M.; FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Androl.** 30:85-89. 1998.
- [9] FOOTE, H. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. **Theriogenol.** 59:1765-1773. 2003.
- [10] GARCÍA-MACÍAS, V.; DE PAZ, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation as-

- assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **Int. J. Androl.** 30:88-98. 2007.
- [11] GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J. Androl.** 19:704-709. 1998.
- [12] GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; PITT, C.; VISHWANATH, R.; SAX-GRAVANCE, S.K.; CASEY, P.J. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). **Int. J. Androl.** 2:77-82. 1999.
- [13] GRAVANCE, C.G.; CASEY, M.E.; CASEY, P.J. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. **Anim. Reprod. Sci.** 114(1-3):81-88. 2009.
- [14] HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of simple size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Vet. Met-Czech.** 50:24-32. 2005.
- [15] HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenol.** 66:996-1003. 2006.
- [16] HENKEL, R.; SCHREIBER, G.; STURMHOFEL, A.; HIPLER, U.C.; HENRIK-ZERMANN, D.; MENKVED, R. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. **Fertil&Steril.** 89:449-455. 2008.
- [17] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenol.** 55:947-961. 2001.
- [18] JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenol.** 60:743-758. 2003.
- [19] KHALIFA, T.A.A.; REKKAS, C.A.; LYMBERPOULOS, A.G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, T. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 104:143-163. 2008.
- [20] LANGE-CONSIGLIO, A.; ANTONUCCI, N.; MANES, S.; CORRADETTI, B.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. Morphometric characteristics and chromatin integrity of spermatozoa in three Italian dog breeds. **J. Small Anim. Pract.** 51(12):624-627. 2010.
- [21] MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol. Reprod.** 71:28-37. 2004.
- [22] MELLO, M.S.L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochem.** 74:387-392. 1982.
- [23] MUKHOPADHYAY, C.S.; GUPTA, A.K.; YADAV, B.R.; CHAUHAN, I.S.; GUPTA, A.; MOHANTY, T.K.; RAINA, V.S. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Live-stock Sci.** 136(2): 114-121. 2011.
- [24] NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; FINOL-PARRA, G.; VILCHEZ-SIU, V.; OSORIO-MELENDEZ, C.; RUBIO-GUILLEN, J.; VALERIS-CHACIN, R. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 24:116-122. 2011.
- [25] NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XXII (3):211-216. 2012.
- [26] 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.** 22:595-603. 2001.
- [27] NUÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.M.; PEÑA, F.J. Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? **Zygote** 15(3):257-266. 2007.
- [28] QUINTERO-MORENO, A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballos, cerdos y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Tesis de Grado. 164 pp. 2003.
- [29] RAMÍREZ, M. Comparación de tres técnicas de tinción para la evaluación de la biometría de la cabeza espermática en semen criopreservado de toro. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Tesis de Especialización. 53 pp. 2010.
- [30] RÉVAY, T.; NAGY, S.; KOPP, C.; FLYCKT, A.; RENS, W.; RATH, D.; HIDAS, A.; KOVÁCS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ANDERSSON, M. Macrocephaly in bull spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation. **Cytogenet. Genome Res.** 126:202-209. 2009.
- [31] ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J.C.; BARTHELEMY, C.; LANSAC, J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. **Gamete Res.** 21:51-57. 1988.
- [32] RUBIO-GUILLEN, J.; GARDE, J.J.; ESTESO, M.C.; FERNANDEZ-SANTOS, M.; GONZALEZ, D.; PALOMARES-NAVEDA, R.; VELARDE, J.; MADRID-BURY, N.; SOTO-BELLOSO, E.; QUINTERO-MORENO, A.

- Head dimensions of Brahman and their crossbred bull spermatozoa are affected by cryopreservation. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XVII (5):508-513. 2007.
- [33] SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**. 24:167-173. 1996.
- [34] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide. Version 8.2 edition. Cary, NC. 2001.
- [35] SOLER, C.; GADEA, B.; SOLER, A.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; ESTESO, M.C.; NÚÑEZ, J.; MOREIRA, P.N.; NÚÑEZ, M.; GUTIÉRREZ, R.; SANCHO, M.; GARDE, J.J. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red der sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. **Theriogenol**. 64:1236-1243. 2005.
- [36] SULLIVAN, J.J. Morphology and motility of spermatozoa. In: SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N. L.; LODGE, R. (Eds) **Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle**. 2nd Ed. San Francisco, W. H. Freeman and Co. Pp 286-328.1978.
- [37] WATERHOUSE, K.E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D.P.; DE ANGELIS, P.M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian red bulls. **Reprod. Fertil. Dev**. 18:781-788. 2006.