

**Artículo original:**

**EVALUACIÓN DEL ADN EN ESPERMATOZOIDES DE LLAMA**

**DNA evaluation in llama spermatozoa**

Carretero, M.I. (1,3); S.M. Giuliano(1,2,3);  
C.C. Arraztoa(1,3); D.M. Neild(1,3).

**INTRODUCCIÓN**

En los últimos años la importancia de incluir la evaluación del ADN espermático dentro de las características seminales de rutina ha incrementado debido a reportes que correlacionan el grado de daño del ADN con varios índices de fertilidad como, tasas de fertilización, clivaje embrionario, implantación, preñez y nacidos vivos (Tomsu *et al.*, 2002; Agarwal y Allamaneni, 2004; Henkel *et al.*, 2004). Por otra parte, las características de rutina que se utilizan para evaluar el semen (movilidad espermática, concentración, viabilidad, funcionalidad de membranas y morfología) no reflejan la calidad del ADN espermático.

(1) Cátedra de Teriogenología  
(2) Cátedra de Física Biológica  
(3) Instituto de Investigación y Tecnología en  
Reproducción Animal (INITRA), Facultad de  
Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

**Palabras Clave:**  
ADN, espermatozoide, evaluación

**TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE ADN**

Varias técnicas han sido utilizadas para estudiar los defectos del ADN. A modo general las técnicas de evaluación de ADN pueden ser divididas en 2 grupos: aquellas que evalúan el grado de condensación o compactación de la cromatina y aquellas que miden el grado de fragmentación del ADN. Dentro de las primeras se encuentran las tinciones con Azul de Anilina, Azul de Toluidina (AT) y Cromomicina A3. Las técnicas que evalúan la fragmentación del ADN espermático han sido subclasificadas por Cortés-Gutiérrez *et al.* (2007) en dos grupos. El primer grupo incluye aquellas metodologías utilizadas para marcar rupturas de hebras simples y dobles, por ejemplo cuando se utilizan enzimas para incorporar nucleótidos marcados *in situ* como Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) o In situ Nick Translation (ISNT). Considerando que las rupturas del ADN incrementan la susceptibilidad a la desnaturalización, el segundo grupo de estrategias incluye aquellas técnicas que miden la predisposición de la cromatina a desnaturalizarse luego de un tratamiento. En este grupo se incluyen el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH), Single-Cell-Gel-Electrophoresis (SCGE) o Comet assay y el Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. La tinción con AT y la técnica de SCD son técnicas simples, rápidas y económicas.

**EVALUACIÓN DE LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA**

El colorante AT es un colorante catiónico cuya unión al ADN, que da lugar al color metacromático azul-violeta, corresponde a agregados de AT interactuando iónicamente con los fosfatos

negativos. La coloración celeste (ortocromática) se debe a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al ADN, mediante intercalación o por unión iónica. Por otro lado, la reducción de los grupos disulfuro mediante agentes reductores como ditioneitol (DTT) o mercaptoetanol (ME), permite que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del ADN queden disponibles y accesibles a la unión de los colorantes (Barrera *et al.*, 1993). Esto permite, utilizar el DTT o el ME como controles positivos de la tinción con AT. En nuestro laboratorio pusimos a punto la técnica de AT en llama (Carretero *et al.*, 2009), guanaco (Carretero *et al.*, 2010a) y alpaca (Carretero *et al.*, 2010b) observando 3 patrones de coloración de las cabezas espermáticas teñidas con AT, que se encuentran relacionados al grado de condensación de la cromatina: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, moderado grado de descondensación), violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación), figura 1.

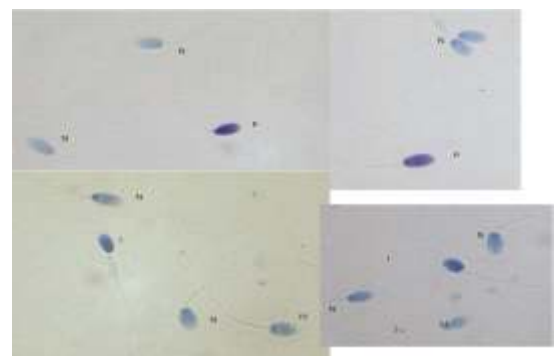


Figura 1. Patrones de espermatozoides de llama teñidos con azul de toluidina: N) negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina, I) intermedios, moderado grado de descondensación P) positivos, alto grado de descondensación. (1000X).



Estas mismas coloraciones fueron observadas en equino (Naves *et al.*, 2004; Sardoy *et al.*, 2008), conejo (Beletti y Melo, 2004), toro (Beletti y Mello, 1996; Beletti *et al.*, 2005) y humano (Barrera *et al.*, 1993; Erenpreiss *et al.*, 2001; 2004; Erenpreisa *et al.*, 2003). Las categorías AT positivos y AT intermedios son considerados espermatozoides con alteración en la condensación de la cromatina. Los porcentajes de espermatozoides AT positivos fueron:  $4,5 \pm 4,6$ ;  $8,90 \pm 3,17$ ;  $7,55 \pm 5,22$ ; para la llama, guanaco y alpaca respectivamente. Mientras que el porcentaje de AT intermedios fueron:  $6,44 \pm 5,12$ ;  $29,90 \pm 6,67$ ;  $21,67 \pm 6,81$  para la llama, guanaco y alpaca; respectivamente. En ambas categorías de AT se observa que el porcentaje es superior en la alpaca y el guanaco que en la llama. Estas diferencias podrían deberse a los distintos ambientes, a la época del año en que se encontraban las diferentes especies y/o a la frecuencia de extracción/eyaculación entre las especies domésticas y silvestres. Durante el estudio, las llamas estuvieron ubicadas en la facultad de Ciencias Veterinarias en la ciudad de Buenos Aires, Argentina y al igual que las alpacas que se encontraban en la Universidad de San Marcos, Perú presentaban una buena condición corporal. Los guanacos por su parte se encontraban en semicautiverio en un criadero del sur argentino donde los nutrientes fueron más escasos. Con respecto a la época del año los porcentajes de AT positivos + intermedios en alpaca observados en verano fueron  $29,21 \pm 10,79$ . Estos valores fueron superiores a los observados en llama durante el invierno (AT positivos + intermedios:  $13,18 \pm 8,02$ ), pero fueron similares a los espermatozoides AT positivos + intermedios observados en la llama durante el verano ( $25,82 \pm 13$ ). De hecho, estos valores fueron significativamente diferentes entre las estaciones de verano e invierno en semen fresco de llama (Carretero *et al.*, 2008). Con respecto a la frecuencia de extracción/eyaculación, las especies silvestres podrían tener una frecuencia de eyaculación inferior a la frecuencia de recolección de semen de las especies domésticas y este acúmulo de reservas espermáticas podría llevar a que los espermatozoides se vayan degenerando y/o dañando su ADN. También se determinó que es posible utilizar el DTT al 1% como control positivo de la tinción observándose dos categorías principales de espermatozoides incubados con este agente reductor: reaccionados y no reaccionados con el DTT (positivos y negativos al AT, respectivamente). Dentro de los reaccionados se pudieron observar 3 subcategorías: (i) cabezas muy descondensadas (muy agrandadas, con presencia de un gran número de vacuolas), (ii) cabezas deformadas (agrandadas, con un número moderado de vacuolas) y (iii) cabezas manteniendo la forma. Dentro de las subcategorías (i, ii y iii) de espermatozoides reaccionados con el DTT, se encontró un aumento significativo de los tipos (i) y (ii) ( $P = 0,05$ ) en el tiempo de 3 minutos con respecto al de 30 segundos de incubación con el DTT (Carretero *et al.*, 2009), figura 2.

Similares patrones, aunque en distinta proporción, fueron observados en otras especies (conejo: Beil y Graves, 1977; humano: Barrera *et al.*, 1993; carnero: Rodríguez *et al.*, 1985; toro: Beil y Graves, 1977; Vieytes *et al.*, 2008). En estos ensayos utilizaron tiempos mayores de incubación que en nuestro estudio, en algunos de ellos utilizaron una concentración menor de DTT (Beil y Graves, 1977; Rodríguez *et al.*, 1985) y en otros la misma concentración que en nuestro trabajo (Barrera *et al.*, 1993; Vieytes *et al.*, 2008). Esto parecería indicar que el uso de agentes reductores de puentes disulfuro, como el DTT, debe ser adaptado para cada especie y que aparentemente los espermatozoides de llama demostrarían una susceptibilidad mayor al DTT que otras especies evaluadas hasta el momento.

Incluso, observamos que la llama es más susceptible a la descondensación que el guanaco, en el que se observó un menor porcentaje de espermatozoides reaccionados en el tiempo de 3 minutos de incubación con DTT con respecto a la llama. Por otra parte, con el objetivo de simplificar la técnica, se compararon 2 tiempos de fijación (2 y 30 minutos) para la tinción con AT en semen de llama. No se encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides positivos e intermedios al AT entre las muestras fijadas durante 2 y 30 minutos ( $P > 0,05$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides reaccionados (con sus 3 subcategorías) y no reaccionados con el DTT entre los dos tiempos de fijación.

## EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

En la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD), los espermatozoides son incluidos en una matriz de agarosa en un portaobjeto, tratados con una solución ácida para desnaturalizar el ADN que contiene rupturas, y luego son tratados con una solución de lisis para remover las membranas y proteínas. La remoción de las proteínas resulta en la formación de "loops" de ADN que forman un halo periférico alrededor de una estructura nuclear residual o "core". Los espermatozoides con elevada fragmentación de la cromatina no producen o producen un halo muy pequeño de dispersión de la cromatina, mientras que los espermatozoides con ADN intacto forman halos extensos.

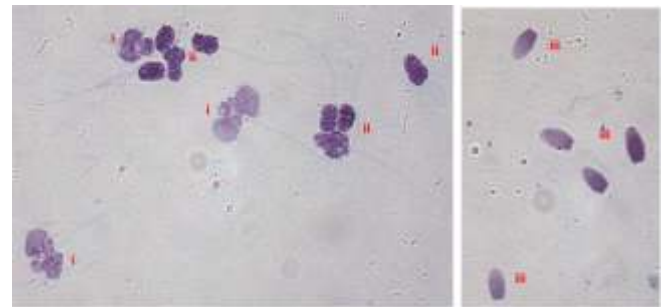


Figura 2. Espermatozoides de llama reaccionados con Dithiothreitol (1%): (i) cabezas muy descondensadas (muy agrandadas, con presencia de un gran número de vacuolas), (ii) cabezas deformadas (agrandadas, con un número moderado de vacuolas) y (iii) cabezas con mantenimiento de la forma. 1000X.

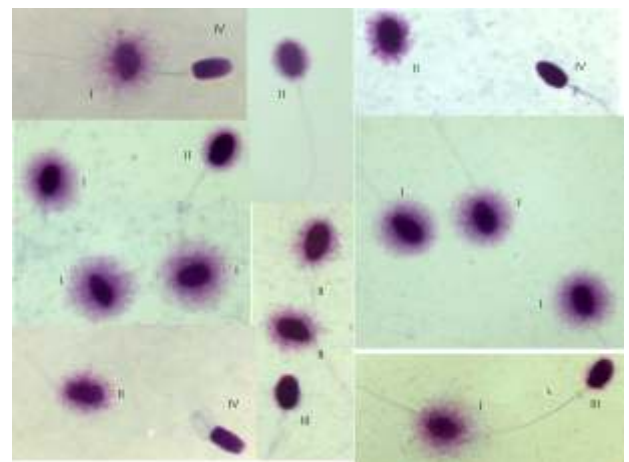


Figura 3. Patrones de espermatozoides de llama observados con la técnica de SCD: (I) núcleos con halos grandes de dispersión de la cromatina (II) núcleos con halos medianos; (III) núcleos con halos muy pequeños y (IV) núcleos sin halos. Los dos primeros patrones (I y II) son considerados espermatozoides sin fragmentación de su ADN y los otros dos (III y IV) espermatozoides con fragmentación de su ADN (magnificación 1000 x .05).



Con el objetivo de lograr controles positivos para la técnica de SCD, nuestro laboratorio realizó diferentes tratamientos: 1) incubación del semen a 100° C durante 30 minutos, 2) incubación del semen con NaOH 0,3 M durante 30 minutos a temperatura ambiente y 3) exposición del semen a luz UV durante 2 horas. Todos estos tratamientos fueron efectivos para producir fragmentación del ADN espermático (ausencia de halo en todos los espermatozoides). En otras especies existen reportes en los que la integridad de la cromatina fue alterada por estrés calórico (Banks *et al.*, 2005), NaOH (Fernández *et al.*, 2003) y luz UV (Ciereszko *et al.*, 2005; Dietrich *et al.*, 2005). En lo que respecta a la puesta a punto de la técnica de SCD se probaron 3 concentraciones diferentes (2,5%, 5% y 10%) de 2-mercaptoetanol (ME) para ser utilizada en la solución de lisis 1 (Carretero *et al.*, 2012a). Para seleccionar la concentración de ME más adecuada se capturaron 600 imágenes/eyaculado (200 para cada solución de lisis 1) mediante un analizador de imágenes. Dos imágenes binarias diferentes fueron obtenidas de cada espermatozoide: del "core" (núcleo residual) y del halo. Luego las áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de ambos fueron automáticamente detectadas y medidas mediante el programa Leica QwinV3 (Leica Microsystems Co., Wetzlar, Alemania). Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo al tamaño del halo ( $\mu\text{m}^2$ ). Utilizando los datos obtenidos se calculó el tamaño del halo relativo: superficie del halo/superficie total (halo + core) \* 100 ( $\mu\text{m}^2$ ). Este último aspecto es importante porque las células espermáticas pueden tener diferentes tamaños nucleares y este parámetro relativo evita la distorsión que se podría producir si solo el tamaño absoluto fuera considerado. No se encontraron diferencias significativas entre las áreas del "core" de los espermatozoides incubados en la Solución de lisis 1 con concentraciones de 2,5% y 5% ME, mientras que se observó un aumento significativo del "core" cuando se empleó 10% ME en la Solución de lisis 1 ( $P = 0,002$ ). Con respecto al área del halo, se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,0002$ ) entre todas las concentraciones de ME utilizadas, aumentando el área desde la de 2,5% hacia la de 10%. Por lo tanto, la concentración seleccionada para utilizar en la Solución de lisis 1 de la técnica de SCD fue la del 5% ME, porque provocó el mayor halo conservando la estructura del "core". El tamaño del halo relativo, fue significativamente menor en la concentración de 2,5% ME con respecto a las otras concentraciones ( $P = 0,002$ ). A pesar que no se hallaron diferencias significativas entre 5% y 10% ME para el tamaño del halo relativo, la concentración de 5% ME fue la que presentó mayor tamaño promedio. Cuando se analizaron los espermatozoides procesados con la técnica de SCD, se observaron, 4 patrones: (i) núcleos con halos grandes de dispersión de la cromatina, (ii) núcleos con halos medianos, (iii) núcleos con halos muy pequeños y (iv) núcleos sin halo. Los primeros dos patrones (i y ii) han sido considerados por Fernández *et al.* (2003, 2005) espermatozoides con ADN intacto (sin fragmentación), mientras que los otros patrones (iii y iv) representan espermatozoides con ADN fragmentado, figura 3.

Los cuatro patrones observados en el presente experimento fueron semejantes a los observados en el padrillo equino (Carretero *et al.*, 2010c). En semen humano, los mismos cuatro patrones también fueron descriptos e incluso describieron una quinta categoría, reportada como espermatozoide sin halo y "degradado" (similar al espermatozoide sin halo pero teñido irregular y débilmente) (Fernández *et al.*, 2003; 2005). Estos autores observaron esta última categoría más frecuentemente cuando emplearon el kit Halosperm® que cuando utilizaron el protocolo original. En nuestro estudio, esta quinta categoría no fue observada con ninguna de las concentraciones de ME ensayadas, posiblemente porque el

protocolo utilizado es similar al método original de Fernández *et al.* (donde los autores también observaron pocos espermatozoides degradados) o porque se usó mercaptoetanol en lugar de ditiotreitol en la solución de lisis. Cuando se compararon los porcentajes promedio de los patrones de SCD observados con las diferentes concentraciones de ME, se observaron diferencias significativas en los porcentajes promedio de halos grandes ( $P = 0,0005$ ) y medianos ( $P = 0,0001$ ) entre 5% ME y el resto de las concentraciones (2,5% y 10% ME), con el mayor número de halos grandes observados en la concentración de 5% ME. No se observaron diferencias significativas en los patrones de halos muy pequeños y sin halo ( $P > 0,05$ ) entre ninguna de las concentraciones de ME (2,5%; 5% and 10%). Este resultado refuerza la selección de la concentración de 5% ME para ser utilizada en la Solución de lisis 1. En conclusión, la selección de 5% de ME se realizó en base a 3 factores: 1) los espermatozoides incubados con 5% ME mantuvieron el área del "core" produciendo un halo extenso alrededor del espermatozoide, 2) la concentración de 5% ME produjo el mayor porcentaje de halos grandes, 3) los espermatozoides incubados con 5% ME presentaron el mayor halo relativo. En nuestro laboratorio obtuvimos resultados similares en espermatozoides equinos, en los que las mismas tres concentraciones de ME fueron probadas (Carretero *et al.*, 2010c).

#### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE COLAGENASA al 0.1% AL SEMEN FRESCO SOBRE LA CONDENSACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Los camélidos sudamericanos tienen características seminales particulares que dificultan la manipulación del semen e impiden la realización de varios estudios simultáneamente. Estas particularidades son: semen muy filante y viscoso, bajo volumen, baja concentración espermática y ausencia de movilidad progresiva (Fernández-Baca, 1993; Vaughan *et al.*, 2003; Mirgaya *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010). Varias enzimas como colagenasa, tripsina, hialuronidasa y fribriolisina han sido utilizadas con el objetivo de disminuir la viscosidad de los eyaculados (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010). Nuestro laboratorio, ha utilizado exitosamente colagenasa al 0,1% logrando separar los espermatozoides del plasma seminal y mejorando la movilidad progresiva (Giuliano *et al.*, 2010).

Por otra parte, evaluamos el efecto de la adición de colagenasa al 0,1% al semen fresco sobre la condensación (Carretero *et al.*, 2012b) y la fragmentación (datos no publicados) del ADN espermático de llama. No se hallaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) cuando se comparó el porcentaje de espermatozoides AT positivos e intermedios entre el semen incubado y no incubado con 0,1% de colagenasa en llama (AT positivos con y sin colagenasa:  $4,7 \pm 4,5$  y  $6,2 \pm 5,4$  respectivamente; AT intermedios con y sin colagenasa:  $5,0 \pm 3,2$  y  $6,4 \pm 3,6$  respectivamente) ni en guanaco (AT positivos con y sin colagenasa:  $8,9 \pm 3,17$  y  $8,9 \pm 3,22$ ; respectivamente; AT intermedios con y sin colagenasa:  $29,9 \pm 46,67$  y  $28,25 \pm 6,33$  respectivamente) (promedio  $\pm$  DS). Con respecto al efecto de la colagenasa sobre la acción del DTT, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides de llama DTT-reaccionados (AT positivos) entre las muestras incubadas y no incubadas con colagenasa al 0,1% en los diferentes tiempos (30 segundos; 1,5 y 3 minutos con colagenasa:  $85,8 \pm 14,2$ ,  $82,4 \pm 33,8$  y  $92,5 \pm 8,0$  respectivamente; 30 segundos; 1,5 y 3 minutos



sin colagenasa:  $85,0 \pm 16,6$ ,  $84,0 \pm 16$  and  $88,0 \pm 7,1$  respectivamente) (promedio  $\pm$  DS). Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los diferentes patrones de SCD entre el semen incubado y no incubado con colagenasa (halo grande con y sin colagenasa:  $2,02 \pm 2,37$ ;  $2,51 \pm 3,14$ ; halo mediano con y sin colagenasa:  $72,03 \pm 12,30$ ;  $73,22 \pm 9,39$ ; halo pequeño con y sin colagenasa:  $24,49 \pm 13,12$ ;  $22,98 \pm 10,80$ ; sin halo con y sin colagenasa:  $1,46 \pm 0,68$ ;  $1,29 \pm 0,94$  (promedio  $\pm$  DS). Estos resultados parecerían indicar que esta enzima no produce descondensación ni fragmentación de la cromatina, al menos a esta concentración, y por lo tanto podría utilizarse para facilitar la manipulación del semen en llamas e incorporarse a los diferentes protocolos de reproducción asistida en estas especies.

## BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, A.; S.S. Allamaneni. 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *A review. Minerva Ginecológica*. 56:235-245.
- Banks, S.; S.A. King; D.S. Irvine; P.T.K. Saunders. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*; 129: 505–514.
- Barrera, C.; A.B. Mazolli; C. Pelling; C. Stockert. 1993. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta histochem. (Jena)*; 94: 141-149.
- Beil, R.E.; C.N. Graves. 1977. Nuclear decondensation of mammalian spermatozoa: changes during maturation and in vitro storage. *J. Exp. Zool.*; 202 (2): 235-40.
- Beletti, M.E.; M.L.S. Mello. 1996. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Braz. J. Genet.*; 19: 97-103.
- Beletti, M.E.; 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: 398-402.
- Beletti, M.E.; L. da Fontoura-Costa; M. Mendes-Guardieiro. 2005. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.*; 22(2): 85-90.
- Bravo, P.V.; P. Callo; J. Garnica. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Ruminant Res.*, (38): 91-95.
- Carretero, M.I.; S.M. Giuliano; C. Casaretto; M. Gambarotta; D. Neild. 2008. Influencia de la estación del año sobre el ADN de espermatozoides de llama. *In Vet*; 10(2): 150.
- Carretero, M.I.; S.M. Giuliano; C.I. Casaretto; M.C. Gambarotta; D.M. Neild. 2009. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *In Vet*; 11(1): 55-63.
- Carretero, M.I.; S.M. Giuliano; A. Agüero; M. Pinto; M. Miragaya; V. Trasorras; J. Egey; J. von Thungen; D. Neild. 2010a. Guanaco sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. *Reprod. Fertil. Dev.*; 22(1): 310–310.
- Carretero, M.I.; C.C. Arraztoa; C.I. Casaretto; W. Huanca; D.M. Neild; S.M. Giuliano. 2010b. Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. In: *Fibre production in South American camelids and other fibre animals. Lieke Boersma (Eds), Wageningen Academic Publishers*. pp. 141-144
- Carretero, M.I.; C.C. Arraztoa; M. Caldevilla; A. Ferrante; D. Lombardo; D. Neild. 2010c. Chromatin Dispersion test in equine spermatozoa. *In Vet*; 12(2): 249.
- Carretero, M.I.; D. Lombardo; C.C. Arraztoa; S.M. Giuliano; M.C. Gambarotta; D.M. Neild. 2012a. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, 131 (1-2): 63-71.
- Carretero, M.I.; S.M. Giuliano; C.I. Casaretto; M.C. Gambarotta; D.M. Neild. 2012b. Evaluation of the effect of cooling and the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. *Andrología*; 44: 239-247.
- Ciereszko, A.; T.D. Wolfe; K. Dabrowski. 2005. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquatic Toxicology*; 73: 128–138.
- Cortés-Gutiérrez, E.I.; M.I. Dávila-Rodríguez; C. López-Fernández; J.L. Fernández; J. Gosálvez. 2007. Evaluación del daño del DNA espermático. *Actas Urol. Esp.*; 31(2): 120-131.
- Dietrich, G.J.; A.Szpyrka; M. Wojtczak; S. Dobosz; K. Goryczko K.; akowski Ł, Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 64(8): 1809-1822.
- Erenpreisa, J.; J. Erenpreiss; T. Freivalds; M. Slaidina; R. Krampe; J. Butikova; A. Ivanov; D. Pjanova. 2003. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry Part A*; 52A:19-27.
- Erenpreiss, J.; J. Bars; V. Lipatnikova; J. Erenpreisa; J. Zalkalns. 2001. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl.*; 22(1): 45-53.
- Erenpreiss, J.; K. Jepson; A. Giwercman; I. Tsarev; Je. Erenpreisa; M. Spano. 2004. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum. Reprod.*; 19(10): 2277-2282.
- Fernandez-Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World Camelids. *Anim. Reprod. Sci.*; 33: 307-323.
- Fernández, J.L.; L. Muriel; M.T. Rivero; V. Goyanes; R. Vázquez; J.G. Alvarez. 2003. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J. Androl.*; 24(1), 59-66.
- Fernández, J.L.; C. Mehnert; R. Menkeveld. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil. Steril.*; 81: 965-972.
- Miragaya, M.; M. Martínez-Sarrasague; M. Casaretto; E. Rubin de Celis; I. Carretero; S. Giuliano. 2008. Assessment of apparent viscosity and analysis of rheological profiles in llama ejaculates. *16th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*; July 13-17, Budapest.
- Naves, C.S.; M.E. Beletti; M.B. Duarte; R.C. Vieira; E.G. Diniz; J.O. Jacomini. 2004. Evaluation of equine spermatic chromatin with toluidine blue and acridine orange. *Biosci. J.*; 20(3): 177-124.
- Rodríguez, H.; C. Ohanian; E. Bustos-Obregon. 1985. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int. J. Androl.*; 8: 147-158.
- Sardoy, M.C.; M.I. Carretero; D. Neild. 2008. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Anim. Reprod. Sci.*; 107: 349-350.
- Tomsu, M.; V. Sharma; D. Miller. 2002. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum. Reprod.*; 17; 1856-62.

