

*Artículo de corto*

## **CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE EYACULADOS DE LLAMAS AFECTADOS POR HIDROCELE Y EDEMA ESCROTAL DURANTE EL PERÍODO ESTIVAL**

Macroscopic and microscopic characteristics of ejaculated in llamas affected by hydrocele and scrotal edema during summer period

*S.M.Giuliano<sup>1,3</sup>, A. Agüero<sup>2,3</sup>, S. Spirito<sup>1</sup>, M.G. Chavez<sup>2,3</sup>, M.Boquet<sup>2</sup>, B. Rutter<sup>2</sup>, H. Cisale<sup>1,3</sup>, M.R. Ferrari<sup>1,3</sup>*

*<sup>1</sup>Catedra de Física Biológica, <sup>2</sup>Catedra de Teriogenología, <sup>3</sup>Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.*

*Dra Susana María Giuliano, Chorroarin 280, CABA, Argentina, smgiulia@gmail.com*

### **RESUMEN**

La evaluación clínica y ultrasonográfica de cuatro llamas en época de alta temperatura y humedad, indicó que presentaban hidrocele bilateral y edema escrotal. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la presencia de hidrocele y edema escrotal y de la exposición a altas temperaturas y humedad ambientales sobre características seminales de llama. Las muestras de semen se estudiaron durante un período de 125 días (estival-invernal) y se determinaron los siguientes parámetros: volumen, pH, movilidad espermática, número de espermatozoides/ml y totales, porcentaje de espermatozoides vivos, morfología espermática y nuclear y morfometría de la cabeza. La mayoría de las variables seminales estudiadas demostraron alteraciones que se prolongaron alrededor de 60 días. A los 125 días los eyaculados presentaron valores similares a los históricos para cada uno de ellos.

Palabras claves: *llama; estrés calórico; parámetros espermáticos, hidrocele*

### **ABSTRACT**

Clinical and ultrasonographic evaluation of four llamas exposed to high temperatures and humidity, noted that they presented scrotal edema and bilateral hydrocele. The aim of the present study was to evaluate the effect of hydrocele, scrotal edema and high temperature and humidity on llama seminal characteristics. Semen samples were study during 125 days (summer – winter) and the following parameters were determined: volume, pH, sperm motility, total sperm number, sperm number/ml, % of live spermatozoa, sperm and nuclear morphology and morphometry of the head. Most of the parameters showed alterations during about 60 days and at the day 125 all the damages were remitted. We conclude that in a situation of heat stress llamas that are not shorn may present: a) hydrocele and scrotal edema, b) macro and microscopic alterations in their ejaculates c) modifications in morphometric parameters values of the sperm heads.

Key words: *Llama, caloric stress, semen parameters, hydrocele*

## INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos están distribuidos geográficamente a lo largo de la región andina de América del Sur. Se caracterizan por presentar adaptaciones especiales a condiciones ambientales extremas tales como bajo porcentaje de humedad, importantes variaciones de temperatura, radiación solar intensa, presión parcial de oxígeno muy baja y escasez alimenticia (Valleñas, 1991). La llama (*Lama glama*) tiene un vellón de características variables de acuerdo a la presencia o no de la doble capa y se encuentra distribuido en todo el cuerpo de manera uniforme menos en la cara, patas y parte ventral del abdomen (Frank, 1997). Las fibras del vellón constituyen una barrera importante tanto para el frío como para la radiación solar. La disipación del calor del cuerpo se realiza mediante la evaporación de agua por parte de la piel; si el vellón está húmedo, excesivamente largo o apelmazado el vapor se recondensa y de esta manera se inhibe la disipación (Fowler, 1998).

En llamas y alpacas introducidas en regiones con temperatura y humedad altas se han observado cuadros clínicos de hidrocele, edema escrotal y pérdida de fertilidad (Neely y Bravo, 1997; Fowler, 1998). En mamíferos de distintas especies se observó que cuando los testículos están expuestos a estrés térmico, ya sea ambiental, corporal o en experimentos con aumento local de temperatura, se pueden producir alteraciones en la espermatogénesis que originan infertilidad temporaria o permanente (Rahman *et al.*, 2011). Schwalm *et al.* (2007) observaron que, cuando los machos permanecen a una temperatura constante de 29° C durante 4 semanas, la espermatogénesis en llamas sufre daños importantes. Observaron alteraciones en características seminales (concentración, movilidad y morfología) y a nivel testicular, en los cortes histológicos, se observó una disminución de la proliferación de las espermatogonias y un aumento en la destrucción de los túbulos. Por otra parte, un aumento de la temperatura ambiental puede inducir que se produzcan alteraciones en la compactación de la cromatina e integridad del ADN espermático

(Sailer *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2001). Como la cromatina ocupa casi la totalidad del núcleo y de la cabeza espermáticas sus alteraciones generarían cambios en la morfología de ambas estructuras (Ferrari *et al.*, 1998).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la presencia de hidrocele y edema escrotal y de la exposición a altas temperaturas y humedad ambientales sobre características seminales de llama.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, C.A.B.A., Argentina. La ciudad está situada a nivel del mar, a una latitud de 34° 36' y a una longitud de 58° 26'. En el período estival cuatro llamas presentaron aumento notorio del escroto y a la palpación se evidenció líquido dentro de la cavidad escrotal. Mediante ultrasonografía se detectó edema escrotal e hidrocele bilateral. La ultrasonografía se realizó con un ecógrafo Pie Medical 480, con transductor lineal de 5 MHz.

### *Obtención y evaluación del semen.*

Sólo dos de los cuatro machos afectados (Macho A y Macho B) aceptaron la maniobra de obtención de semen mediante vagina artificial. La misma se realizó según Giuliano *et al.* (2008). Macho A: se obtuvo semen en el mismo día en que se diagnosticó hidrocele bilateral y edema escrotal: Día 0. Posteriormente, se obtuvieron eyaculados los Días 22, 51, 62 y 125. Macho B: se obtuvo semen los Días 0, 22 y 125.

Los eyaculados del Día 125 (período invernal) se usaron como patrón ya que presentaron características seminales similares a las históricas de cada uno de los machos.

- pH: se midió mediante un papel Indicador Universal Especial Merck® (6.4–8.0).

- Concentración de espermatozoides: se midió mediante una cámara hemocitométrica de Neubauer.
- Porcentaje de espermatozoides vivos: se determinó con una coloración supravital (1% de eosina en citrato de sodio 2,92 %).
- Morfología espermática: se evaluó en espermatozoides coloreados con Diff-Quick® (1000 x). Se observaron por muestra un mínimo de 100 espermatozoides.
- Morfología nuclear: se determinó en espermatozoides coloreados con la Reacción de Feulgen que es específica del ADN. La técnica se realizó según Ferrari *et al.* (1996). Las observaciones, bajo un aumento de 1000x, se hicieron en pools de 1000 núcleos provenientes de los dos machos. Un pool fue obtenido el Día 0 y el otro el Día 125.
- Morfometría de la cabeza: se realizó sobre imágenes digitalizadas de espermatozoides coloreados con Diff-Quick®, usando un analizador de imágenes (Kontron Bildanalyse, MiniMOP). La medición se realizó según Spirito *et al.*, (2001). Los parámetros estudiados fueron: área, perímetro, diámetro máximo, diámetro mínimo y forma ( $4 \pi \text{ área/perímetro}^2$ ). Los parámetros anteriores se determinaron sobre la sección máxima del núcleo espermático. Las mediciones se realizaron los Días 0 y 125 en espermatozoides de los dos machos.

Temperatura máxima y porcentaje medio de humedad ambiental: los datos de temperatura máxima ( $T_{\text{máx}}$ ) y mínima ( $T_{\text{mín}}$ ) y de porcentaje medio de humedad (%Hum) fueron proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional de la República Argentina.

Con estos datos de temperatura y humedad ambiental se obtuvo el índice de estrés calórico (Heat Stress Index”, HSI). Anderson en el 2000 lo definió como:  $\text{Temperatura } [^{\circ}\text{C}] + \text{humedad promedio } [\%]$ . Este autor determinó que cuando el  $\text{HSI} \geq 120$  el manejo de los camélidos debe

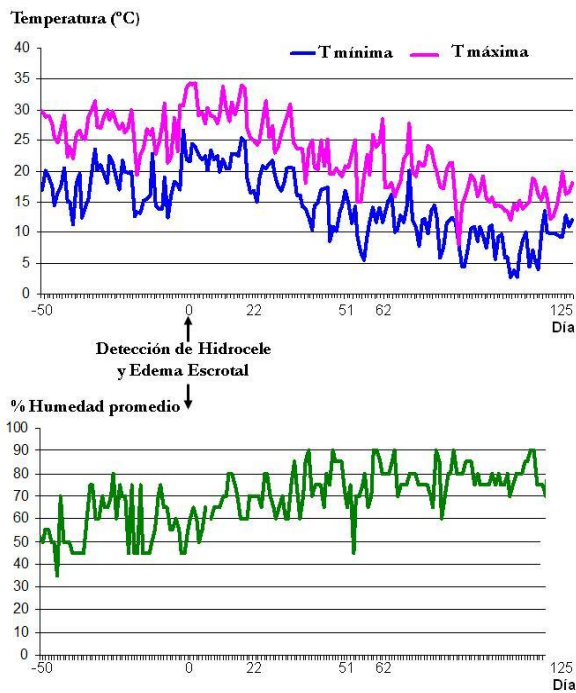
hacerse con precauciones, cuando el  $\text{HSI} \geq 160$  el manejo de camélidos es peligroso.

#### *Análisis estadístico*

Se empleó estadística descriptiva usando el programa InfoStat.

## RESULTADOS

En el Gráfico 1 se muestran las variaciones de temperatura máxima y mínima y los porcentajes de humedad ambiental promedio durante el período en que se realizó el estudio. También se indican los 50 días previos a la detección del hidrocele y edema escrotal; en dos de ellos la  $T_{\text{máx}}$  mostró un  $\text{HSI} > 160$  y en todos los restantes un  $\text{HSI} > 120$ . En el mismo período la  $T_{\text{mín}}$  indicó un  $\text{HSI} > 120$  en un 46% de los días. En el Día 0 se detectó hidrocele bilateral y edema escrotal (Figura 1) en cuatro machos no esquilados. La revisión clínica indicó un aumento importante del tamaño escrotal, con edematización de la pared y conservación de la forma testicular. En ultrasonografías de escroto y testículo se observó engrosamiento de la pared escrotal, contenido de líquido en la cavidad vaginal y conservación de la forma testicular. Luego de realizadas las ultrasonografías los cuatro machos fueron esquilados y a las 48 h se observó reducción del diámetro escrotal. En la Tabla 1 se observan las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados obtenidos en los machos A y B en distintas fechas. El pH no varió en ninguna de las extracciones. En el macho A partir del día 0 disminuyeron: la movilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, el número de espermatozoides totales y por mililitro y el porcentaje espermatozoides normales y hubo un incremento en el porcentaje de cabezas sueltas. En el eyaculado obtenido a los 62 días ya se observó un incremento en la movilidad, en el porcentaje de espermatozoides vivos, en el número de espermatozoides totales y una disminución en el porcentaje de cabezas sueltas.



En eje X contiene a los 50 días anteriores a la detección de hidrocele y edema escrotal y los 125 días posteriores. Las fechas indican el día en que se detectaron las patologías y los días indicados corresponden aquellos en que se obtuvieron y analizaron eyaculados.

Gráfico 1 Valores diarios de las temperaturas máxima y mínima y de la humedad ambiental promedio



Figura 1: ultrasonografía donde se puede observar edema de la pared del escroto e hidrocele bilateral en una llama

En el macho B también se observó una disminución en la movilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides vivos y un aumento en el porcentaje de anomalías de cabeza entre el eyaculado obtenido el día 0 y el obtenido 22 días después. Este animal se negó a la monta los días 51 y 62.

Los eyaculados obtenidos en el día 125 en los dos animales (época invernal), mostraron valores similares a los históricos para cada uno de ellos. En ambos hubo aumento en el volumen del eyaculado, en el porcentaje de movilidad en el lugar, en el número de espermatozoides totales, en el porcentaje de espermatozoides vivos y normales y una disminución en el porcentaje de anomalías de cabeza y de cola. La Tabla 2 muestra los porcentajes de diferentes morfologías nucleares en las muestras obtenidas los días 0 y 125. En el día 0 el porcentaje de núcleos normales es un 30 % más bajo que el determinado el día 125. Este último fue similar a los valores históricos para la especie (Giuliano *et al.*, 1997). La Tabla 3 presenta valores de los parámetros morfométricos determinados en la cabeza de espermatozoides normales teñidos con Diff-Quick®, los eyaculados corresponden a los días 0 y 125. Se observa que los valores obtenidos en los eyaculados del día 0 son mayores que los obtenidos en el día 125. Los Intervalos de Confianza (95%) sugieren que a excepción del Dmáx en el Macho A y del Dmín en el Macho B hay diferencias en los demás parámetros entre los valores obtenidos en las muestras de los días 0 y 125.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se detectó hidrocele bilateral, edema escrotal e importantes alteraciones macro y microscópicas de eyaculados de llamas expuestas a alta temperatura y humedad ambiental, con Índices de Estrés Calórico >120. En estudios realizados en un grupo de alpacas, *Lama pacos*, ubicadas en el Este central de Alabama, EE UU, durante los meses de junio, julio y agosto (período estival) se midió el efecto de la esquila sobre parámetros fisiológicos y se encontró que los animales que no

habían sido esquilados tenían menor tolerancia al calor que los esquilados (Navarre, 1991). En el presente estudio, luego de realizar las ultrasonografías se procedió a la esquila de los 4 animales afectados y a las 48 hs. se observó reducción del diámetro escrotal. Sin embargo, la presencia de daños micro y macroscópicos en los eyaculados se prolongó por más de 60 días. Observamos disminución de la movilidad espermática, del número de espermatozoides (totales y por mililitro) y de la viabilidad, así como aumento de morfologías espermáticas anormales y cabezas sueltas. Estos daños son similares a los registrados por otros autores en llamas sometidas a estrés calórico (Neely y Bravo, 1997, Schwalm *et al.*, 2007). Si bien los efectos de la alta temperatura y humedad estuvieron presentes desde los 50 días anteriores a declararse hidrocele bilateral y edema escrotal, estas dos patologías podrían haber colaborado en el deterioro de los parámetros seminales que se registraron en los eyaculados obtenidos a los 22, 51 y 62 días posteriores a la detección de las misma (día 0).

Schwalm *et al.* (2007) observaron que en llamas sometidas a temperatura ambiental alta y constante (29 °C) durante 4 semanas había cambios en la actividad mitótica de las espermatogonias que podrían incidir tanto en el número de espermatozoides (total y por mililitro) como en la frecuencia de espermatozoides vivos. También estos autores señalaron que la exposición a alta temperatura podría incrementar la tasa de apoptosis en llamas como se describió en otras especies en las que los testículos se sometieron a tratamiento térmico (Mello *et al.*, 2000, Lue *et al.*, 2002, Miura *et al.*, 2002). La frecuencia de morfologías nucleares anormales observadas en las muestras del día 0 son muy altas, 34.48 %, en comparación con el 4.02 % observado en las obtenidas 125 días después (período invernal), cuando los animales habían recobrado sus valores históricos. Estas anomalías podrían estar expresando alteraciones en la cromatina ya que varios estudios han mostrado la existencia de interrelaciones entre estructura de la cromatina, daño en el ADN y morfología nuclear (Ferrari *et al.*,

1998, Zini *et al.*, 2008). Por otra parte, resultados obtenidos en distintas especies, muestran que el estrés calórico influye sobre la estructura y distribución de la cromatina espermática comprometiendo la integridad del ADN y la composición y compactación de las proteínas básicas (Evenson *et al.*, 2000; Zhu y Setchell, 2004). Entre las malformaciones del núcleo espermático que se observaron en el presente trabajo se destacan las formas piriformes y la aparición de vacuolas (Tabla 2).

En otras especies, por efecto del calor, también se detectaron aumentos en la frecuencia de morfologías anormales. En equinos se encontró un incremento significativo de formas piriformes (Henry *et al.*, 1999) en tanto que en ratones y bovinos se registró un aumento de núcleos vacuolados (Shore *et al.*, 1995, Morgentarer 1999). El aumento en las dimensiones de los parámetros morfométricos observados en este estudio también sugiere disturbios en el proceso de organización y maduración de la cromatina. Durante casos como: capacitación *in vitro* (Royere *et a.*, 1991), criopreservación (Boquet *et al.*, 1999) y exposición a la sonicación (Ferrari *et al.*, 1994) el incremento del área nuclear se relacionó con el estado de condensación de la cromatina. El extenso período en donde se observaron alteraciones en los eyaculados sería consecuencia de daños producidos simultáneamente o en forma independiente en diferentes etapas de la espermatogénesis. Si bien, no encontramos datos bibliográficos sobre la duración de la espermatogénesis en llamas, en mamíferos puede prolongarse más de 60 días.

En conclusión: las llamas bajo condiciones ambientales de alta temperatura y humedad pueden: presentar hidrocele y edema escrotal, mostrar alteraciones macro y microscópicas en sus eyaculados, tener incrementada la frecuencia de anomalías morfológicas en los núcleos espermáticos y modificar valores de los parámetros morfométricos de los núcleos espermáticos.

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados

Características seminales	MACHO A					MACHO B		
	Día					0	22	125
	0	22	51	62	125			
pH	7	7	7,2	7	7	7,2	7	7
Volumen (ml)	1,5	1	0,8	1,4	5	0,5	1	3,33
Movilidad (%)	5	1	0	10	90	10	5	30
Esperm. Vivos (%)	51	21	0	62	80	28	7	60
Esperm. totales x 10 <sup>6</sup>	1,5	0,7	0,3	0,6	25,0	0,5	0,9	3,3
Esperm. x 10 <sup>6</sup> /ml	1,0	0,7	0,4	0,4	5,0	0,9	0,9	1,0
Esperm. Normales (%)	40	47	36	42	66	20	26	48
Anorm. de cabeza (%)	20	12	20	20	9	12	18	7
Anorm. pieza interm (%)	19	8	6	21	4	2	3	8
Anorm. de cola (%)	11	10	2	5	4	47	36	22
Cabezas sueltas (%)	4	13	32	10	4	7	17	14
Gota citoplasmática proximal (%)	3	8	2	2	3	13	1	0
Gota citoplasmática distal (%)	2	2	0	1	0	0	0	0

Día 0 = detección de hidrocele bilateral y edema escrotal. Los días restantes corresponden a número de días posteriores al Día 0.

Tabla 2. Núcleos espermáticos coloreados con la reacción de Feulgen. Porcentajes de morfologías normales y anormales presentes en un pool de espermatozoides correspondientes a los Machos A y B (n=1000 espermatozoides). Las muestras fueron obtenidas el día 0 (detección de hidrocele y edema escrotal bilateral) y el día 125 (post hidrocele).

Morfología (%)	Día	
	0	125
Normal	65,5	92,7
Pequeño	8,7	2,0
Piriforme	11,3	4,0
Alargado	5,4	0,
Corto	5,0	0,4
Globoso	3,0	0,4
Diploide	0,4	0,4
Vacuolado	5,4	0,0
Total de anomalías	34,5	4,0

Tabla 3. Parámetros morfométricos de la cabeza de espermatozoides normales teñidas con Diff-Quick®. Medias, Desvíos Estándar e Intervalos de Confianza (95%). Las muestras fueron obtenidas el día 0 (detección de hidrocele y edema escrotal bilateral) y el día 125 (post hidrocele).

Parámetros nucleares	MACHO A		MACHO B	
	Día 0	Día 125	Día 0	Día 125
Área, $\mu\text{m}^2$ (rango)	18,23 $\pm$ 2,32 (18,69-17,77)	16,71 $\pm$ 1,84 (17,01-16,41)	16,63 $\pm$ 2,44 (17,22-16,04)	15,16 $\pm$ 1,31 (15,41-14,91)
Perímetro, $\mu\text{m}$ (rango)	16,94 $\pm$ 1,14 (17,16-16,72)	16,55 $\pm$ 1,07 (16,72-16,38)	15,75 $\pm$ 1,31 (16,07-15,43)	15,22 $\pm$ 1,15 (15,44-15,00)
Diámetro máximo, $\mu\text{m}$ (rango)	6,93 $\pm$ 0,52 (7,03-6,83)	6,84 $\pm$ 0,51 (6,92-6,76)	6,17 $\pm$ 0,64 (6,32-6,02)	5,91 $\pm$ 0,05 (6,01-5,81)
Diámetro mínimo, $\mu\text{m}$ (rango)	3,28 $\pm$ 0,49 (3,38-3,18)	3,13 $\pm$ 0,26 (3,17-3,09)	3,44 $\pm$ 0,31 (3,51-3,37)	3,35 $\pm$ 0,36 (3,42-3,28)
Forma (rango)	0,80 $\pm$ 0,02 (0,80-0,80)	0,79 $\pm$ 0,00 (0,79-0,79)	0,84 $\pm$ 0,02 (0,84-0,84)	0,82 $\pm$ 0,02 (0,82-0,82)
Número de núcleos	103	153	100	109

## REFERENCIAS

- Anderson D. Heat stress in llamas and alpacas. En The Ohio State University College of Veterinary Medicine (Eds.). *Camelid Medicine, Surgery and Reproduction*. Columbus, Ohio: The College 2000; 343-347
- Boquet M., Spirito S.E., Giuliano S.M., Neild D.M., Chavez G., Agüero, A., Paz D., Ferrari M.R. Efectos de la criopreservación sobre la cromatina de espermatozoides equinos. *Rev Bras Reprod Anim* 1999; 23: 297-298.
- Evenson DP, Jost L, Corzett M, Balhorn R 2000. Characteristics of Human Sperm Chromatin Structure Following an Episode of Influenza and High Fever: A Case Study. *J Androl* 21: 739–746.
- Ferrari M, Spirito S, Giuliano S, 1994. Effects of ultrasound on bovine sperm. *Com Biol* 12: 245-254.
- Ferrari M, Spirito S, Giuliano S, Cristini E 1996. Feulgen Reaction: its microspectrophotometric analysis in bovine spermatozoa. *Com. Biol.* 14: 19-32.
- Ferrari MR, Spirito SE, Giuliano SM, Fernández HA 1998. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. *Andrologia*. 30: 85-89.
- Fowler M, 1998. *Medicine and Surgery of South American camelids*. 2<sup>nd</sup> ed. Ames, Iowa State University Press. Iowa. 391 p.
- Frank E, 1997. Mejoramiento genético en camélidos sudamericanos domésticos. Una propuesta para la población argentina. En: *Actas del 2<sup>nd</sup> Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos*, p. 51-73.
- Giuliano S, Ferrari M, Spirito S, Roldán J, Fernández H. Contenido de ADN de llama (*Lama glama*) y estudio de la distribución de la cromatina espermática. II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, do XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária e do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária., Gramado, Brasil, octubre 1997. 236.

- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V., Miragaya M., 2008, Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animals Reproduction Science* 104, 359-369.
- Henry M, Amaral D. Távare FF, Santos NR, 1999. Hydrocele of the vaginal cavity of stallions. *J Reprod Fertil* (Suppl. 56): 13-21.
- Love C, Kenney R, 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associates with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 60: 615-620.
- Lue YH, Lasley BL, Laughlin LS, Swerdloff RS, Sinha Hikim AP, Leung A, 2002. Mild testicular hyperthermia induces profound transitory spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Androl* 23:799–805.
- Mello MLS, Maria SS, Tavares MCH 2000. Heat shock-induced apoptosis in germ line cells of *Triatoma infestans* Klug. *Gen Mol Biol* 23: 301-304.
- Miura M, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T, Fujii J, 2002. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil Steril* 77:787–93.
- Morgentaler A, Stahl B, Yin Y, 1999. Testis and temperature: an historical, clinical, and research perspective. *J Androl* 20: 189-195.
- Navarre C, 1991. Heat stress in South American Camelids. A Comparison of Heat Tolerance Between Sheared and Non sheared Alpacas (*Lama pacos*). Auburn University.
- Neely DP, Bravo WP 1997. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. En: Younquist RS (ed.). *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia, PA: WB Saunders. p 787–792.
- Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Lansac J., 1991. Does in vitro capacitation alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa? cytochemical studies. *Mol Reprod Dev* 28: 177–182.
- Sailer B, Sarkar L, Bjordahl J, Jost L, Evenson D. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 18: 294-301.
- Schwalm A, Gauly M, Erhardt G, Bergmann M, 2007. Changes in testicular histology and sperm quality in llamas (*Lama glama*), following exposure to high ambient temperature. *Theriogenology* 67: 1316–1323.
- Shore MD, Bretzlaff KN, Thompson JA, Magee D.D., 1995. Outcome of scrotal hydrocele in 26 bulls. *Javma*, vol 207: 757-759.
- Spirito S, Boquet M, Giuliano S, Agüero G, Chavez G, Neild D, Ferrari M. 2001. Distribución de la cromatina y morfología nuclear en espermatozoides equinos normales. *In Vet* 3: 19-28.
- Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, Maes D, Hoogewijs M, Frijters A, Noordmanb J, Granados A, Dernelle C, Shamsuddin M, Parrish JJ, Van Soom A. 2011. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology* 76: 1246-1257.
- Vallenás A. 1991. Características anatomofisiológicas. En: ONU, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Oficina Regional de la FAO para América Latina y El Caribe. *Avances y Perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. Santiago, Chile. pp. 49-90.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A, 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23: 2663–2668.
- Zhu BK, Setchell BP, 2004. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod Nutr Dev* 44: 617–629.