

# Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina.

CARRETERO, M.I.<sup>1,3</sup>; GIULIANO, S.M.<sup>1,2,3</sup>; CASARETTO, C.I.<sup>1,3</sup>; GAMBAROTTA, M.C.<sup>4</sup>; NEILD, D.M.<sup>1,3</sup>

## Resumen

El colorante azul de toluidina (AT) se une al ADN permitiendo diferenciar espermatozoides de acuerdo al grado de condensación de la cromatina. Los objetivos de este trabajo fueron: poner a punto una técnica que evalúe la condensación de la cromatina espermática de llama, determinar los patrones de condensación para la especie mediante la tinción con AT y determinar si es posible utilizar ditiotreitol (DTT) como control positivo de la tinción. Se ensayaron 2 tiempos de fijación de las muestras con etanol 96 ° (2 y 30 minutos) y 3 tiempos de incubación con DTT al 1% (30 seg, 1,5 min y 3 min). Los patrones de coloración observados fueron: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación), violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación). No se observaron diferencias significativas entre los tiempos de fijación tanto en las muestras con y sin DTT. En conclusión, se logró simplificar la técnica de AT y determinar los diferentes patrones en espermatozoides de llama. Se comprobó que la incubación con DTT se puede utilizar como control positivo de la técnica y para evaluar la susceptibilidad de cada individuo a la descondensación in vitro.

*Palabras clave:* (ADN espermático), (azul de toluidina), (llama).

Evaluation of llama sperm dna using toluidine blue

## Summary

Toluidine blue stain (TB) binds to DNA, allowing differentiation of spermatozoa according to the degree of chromatin condensation. The objectives of this study were to adapt a technique for evaluating sperm chromatin in llamas, determine chromatin condensation patterns in llamas using TB and determine if it is possible to use dithiothreitol (DTT) as a positive control for the stain. Two fixation times with ethanol 96 ° (2 and 30 minutes) and 3 incubation times with 1% DTT (30 s, 1.5 min and 3 min) were studied. Staining patterns observed were: light blue (negative, without alteration in the normal chromatin condensation), light violet (intermediate, some degree of decondensation), dark violet (positive, high degree of

<sup>1</sup>Área de Teriogenología, <sup>2</sup>Área de Física Biológica, <sup>3</sup>Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), <sup>4</sup>Área de Estadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (C1427CWO). Buenos Aires, Argentina. e-mail: ignaciacarretero@fvet.uba.ar

Recibido: 20.09.2009 - Aceptado: 19.11.2009

decondensation). No significant differences were observed between fixation times, either in samples with or without DTT. To conclude, it was possible to simplify the TB stain and determine the different patterns in llama spermatozoa. It was proved that incubation with DTT can be used as a positive control for the stain and to evaluate individual susceptibility to decondensation in vitro.

*Key words:* (sperm DNA), (toluidine blue), (llama).

## Introducción

El núcleo de los espermatozoides de mamíferos presenta una cromatina estable y altamente compacta, seis veces más condensada que la de una célula somática<sup>29</sup>. Durante el pasaje de los espermatozoides a través del tracto genital del macho y especialmente en el epidídimo, los espermatozoides de mamíferos sufren cambios estructurales y bioquímicos, necesarios para alcanzar la óptima capacidad fertilizante<sup>27</sup>. Estos cambios son considerados en conjunto maduración espermática<sup>6</sup> y dentro de ellos, se ha descrito la progresiva formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteínas de las protaminas<sup>5</sup>. Así, luego del reemplazo de las histonas por protaminas en el testículo, los grupos tioles (SH) de los residuos de las cisteínas de las protaminas son progresivamente oxidados durante el tránsito por el epidídimo, formándose puentes disulfuro que le otorgan al núcleo espermático una estructura altamente compacta<sup>12</sup>. Anormalidades en las protaminas o alteraciones en la proporción de estas proteínas pueden resultar en una disminución de la compactación de la cromatina espermática<sup>10</sup>. Estas alteraciones de la cromatina han sido asociadas a subfertilidad en varias especies<sup>9,19</sup>. Además espermatozoides con anomalías en la cromatina podrían fertilizar un ovocito y producir embriones, sin embargo, se ha propuesto que dichos embriones podrían no llegar a término y/o no originar individuos sanos<sup>1,17,18,23</sup>.

El colorante azul de toluidina (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. La completa neutralización de los grupos fosfato por las argininas de las protaminas<sup>25</sup> y la ocurrencia de entrecruzamientos entre protaminas<sup>2,3,7</sup> son los principales factores responsables de la reducida afinidad de la cromatina compacta del espermatozoide maduro por los colorantes catiónicos.

Por otro lado, la reducción de los grupos disulfuro mediante agentes reductores como el ditiotreitol (DTT), permite que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del ADN queden disponibles y accesibles a la unión de los colorantes<sup>4</sup>. Esto permite utilizar el DTT como control positivo de la tinción con AT.

La tinción con AT ha sido utilizada para detectar defectos en la condensación de la cromatina en varias especies (conejo<sup>10</sup>, humano<sup>4,14,15,16</sup>, toro<sup>9,11</sup>, padrillo<sup>22, 28</sup>), sin embargo, aún no se ha reportado ningún ensayo en donde se evalúe la compactación de la cromatina espermática de camélidos sudamericanos.

Los objetivos de este trabajo fueron: poner a punto una técnica sencilla y económica que permita evaluar la condensación de la cromatina en espermatozoides de llama, determinar los patrones de condensación de la cromatina espermática para la especie

mediante la tinción con AT y determinar si es posible utilizar DTT como control positivo de la tinción con AT.

## Materiales y métodos

### Animales y localización

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron 6 machos de la especie *Lama glama* de edad entre 6 y 10 años y con un peso promedio de  $146,5 \pm 16,4$  Kg (media  $\pm$  DS). Los animales se alimentaron con fardo de pastura y alimento balanceado y tuvieron libre acceso al agua.

### Obtención de semen

El semen fue obtenido mediante electroeyaculación, bajo anestesia general, según técnica descripta<sup>13</sup>. Se utilizó un total de 12 eyaculados ( $n= 6$ ;  $r= 2$ ).

### Evaluación del semen

*Evaluación de las características seminales de rutina.* Se evaluaron las siguientes características seminales: volumen, concentración espermática, movilidad espermática, funcionalidad e integridad de membrana espermática y morfología espermática. El recuento de espermatozoides se realizó en cámara hemocitométrica de Neubauer. La movilidad espermática se evaluó por observación con microscopio de contraste de fase sobre platina térmica a 37° C. Se utilizó el test de endósmosis (HOS test), adaptado a la especie, para evaluar la funcionalidad de membrana<sup>20</sup>. Se evaluó la integridad de membrana (porcentaje de vivos) mediante tinción con los fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e ioduro de propidio (PI)<sup>20</sup>. La morfología espermática se observó mediante microscopio de contraste de fase (1000 X). La evaluación la realizó en todos los casos el mismo operador, sobre una base mínima de 200 espermatozoides por muestra.

*Evaluación de la condensación de la cromatina espermática.* Para evaluar el grado de condensación de la cromatina se utilizó la tinción de azul de toluidina<sup>15</sup> adaptada. En un ensayo previo realizado en nuestro laboratorio, se probó simplificar el método de fijación comparando la mezcla: etanol:acetona (1:1)<sup>14,15,16</sup> vs etanol 96° solo durante 30 minutos y no se hallaron diferencias significativas ( $Pd > 0,05$ ) entre ellos. A partir de dichos resultados, en este ensayo, se fijó con etanol 96° y se probaron dos tiempos de fijación diferentes (2 y 30 minutos) con el objetivo de simplificar aún más la técnica. Así, de cada eyaculado se realizaron extendidos en portaobjetos limpios y desengrasados. Una vez secos se fijaron con etanol 96° durante 2 y 30 minutos, a temperatura ambiente. Los frotis fueron teñidos durante 5 minutos con una solución de trabajo de AT. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron al aire protegidos de la luz.

La solución de trabajo fue preparada a partir de una solución stock (0,4 gramos de AT en 200 ml de agua destilada) que fue diluida en una proporción de 1:9 (1 parte de la solución stock en 9 partes de buffer pH 4). Los espermatozoides se evaluaron, dentro de las 24 hs, con microscopio de contraste de fase (mínimo 200 espermatozoides) a 1000X y se clasificaron en diferentes grupos de acuerdo a la intensidad de coloración de la cromatina espermática.

Como control positivo de la tinción de AT se utilizó ditiotreitol (DTT) al 1% en agua deionizada. El DTT es una sustancia reductora de los puentes disulfuro de la cromatina. Se colocó en tubos Eppendorf cantidades iguales de la sustancia reductora y de semen fresco. La incubación se realizó a temperatura ambiente ensayando 3 tiempos: 30 segundos, 1,5 y 3 minutos; luego se realizaron los extendidos y se secaron con secador de pelo para evitar que la reacción continúe en los portaobjetos. Posteriormente se fijaron y tiñeron según el protocolo de AT descripto anteriormente. Los espermatozoides

se evaluaron con microscopio de contraste de fase (mínimo 200 espermatozoides) a 1000X y fueron clasificados en 2 grupos principales de acuerdo a la coloración de la cromatina y, en subcategorías de acuerdo a la morfología de la cabeza espermática y a la presencia de vacuolas. El diseño experimental se puede observar esquematizado en la figura 1.

## Agentes

El colorante azul de toluidina y el ditiotreitol fueron suministrados por Sigma Chemicals, Argentina y el buffer (pH=4) por Global Lab. S.A., Argentina.

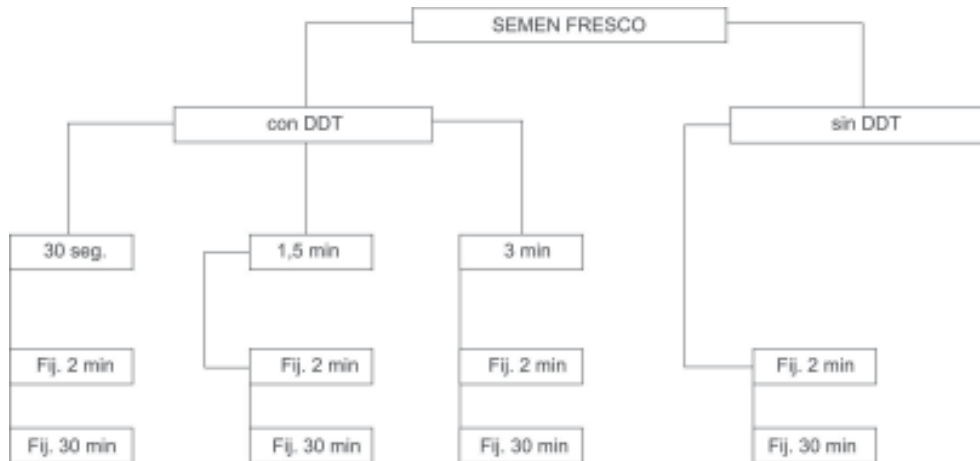


Figura 1. Diseño experimental.

\* Con DDT: incubación del semen con ditiotreitol al 1% (1:1) a temperatura ambiente durante 3 tiempos diferentes (30 segundos, 1,5 y 3 minutos)

\* Fij. 2 min; Fij. 30 min: Fijación de los extendidos en etanol 96° durante 2 y 30 minutos, respectivamente.

## Análisis estadístico

Para comparar el número de espermatozoides de acuerdo a la coloración de la cromatina espermática entre los dos tiempos de fijación, se utilizó un análisis de varianza tomando al macho como bloque y al tratamiento (2 y 30 minutos) como factor fijo. Para analizar los efectos del DTT se realizó un diseño de parcelas divididas en el tiempo (30 segundos, 1,5 y 3 minutos) con un factor (2 y 30 minutos) tomándose al macho como bloque. Para analizar la variabilidad entre machos de acuerdo al grado de condensación de la cromatina en muestras incubadas y no incubadas con DTT se realizó un análisis de varianza. Se realizó estadística descriptiva para analizar las características seminales de rutina. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R 2.2.1<sup>26</sup>.

## Resultados

### Características seminales de rutina

Los resultados de las características seminales de rutina (volumen, movilidad espermática, concentración espermática, funcionalidad e integridad de membranas y morfología espermática) pueden observarse en la tabla 1. Los parámetros seminales de rutina fueron normales para la especie y similares a los observados anteriormente en nuestro laboratorio<sup>20</sup>.

### Patrones de espermatozoides teñidos con azul de toluidina en semen fresco de llama

En semen de llama, se observaron 3 patrones de coloraciones diferentes de cabezas espermáticas teñidas con AT, que se encuentran relacionados al grado de condensación de la cromatina: coloración celeste (negativos, sin alteración en la

	Volumen (ml)	Movilidad (%)	Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	Endósmosis (%)	Vivos (%)	Normales (%)	Cabezas Anormales (%)	Cabezas Sueltas (%)	Colas anormales (%)	GCP (%)
PROMEDIO	3,6	35	148,4	36	63,7	58,2	15,5	2,3	12,3	11,7
DS	± 1,3	± 17,6	± 164,4	± 14,6	± 22,3	± 12,3	± 7,6	± 1,7	± 7,3	± 5,1

Tabla 1. Características seminales de rutina en semen fresco de llama ( $n=6$ ;  $r=2$ ).

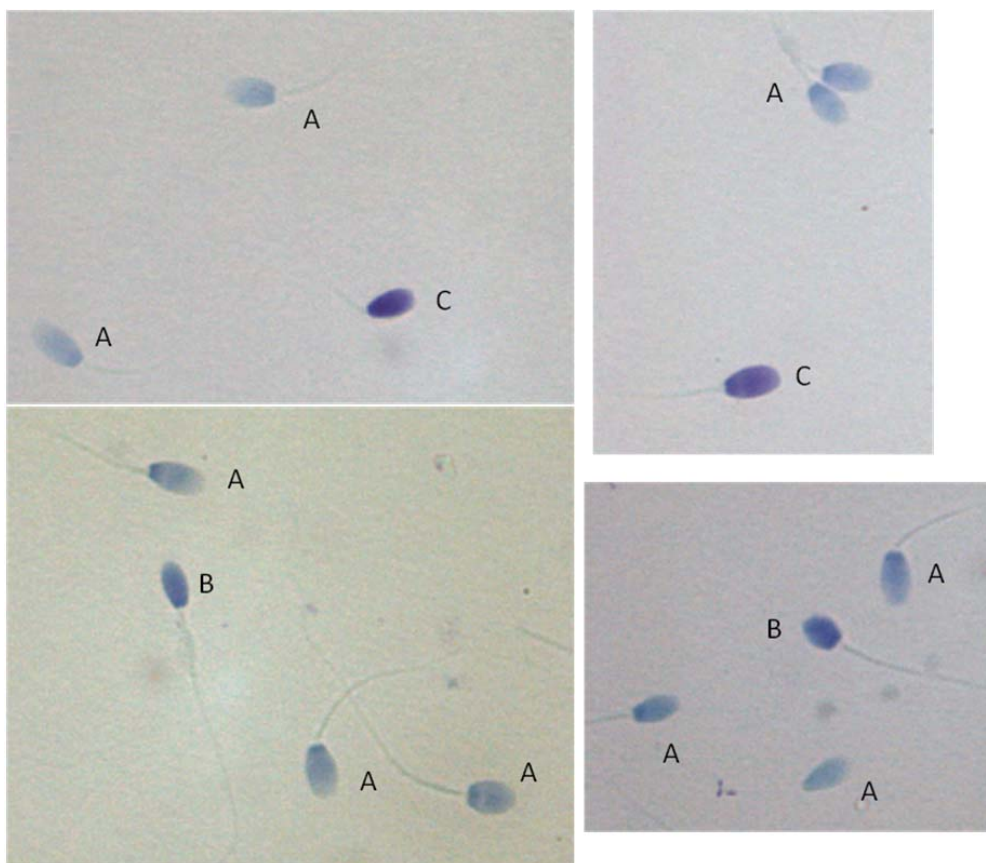


Figura 2. Patrones de espermatozoides de llama teñidos con azul de toluidina: A) negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina, B) intermedios, algún grado de descondensación C) positivos, alto grado de descondensación.

condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación), violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación) (Figura 2A, 2B y 2C; respectivamente).

### Patrones de espermatozoides incubados con ditiotreitol

Dentro de los espermatozoides incubados con una solución de DTT al 1% se observaron

dos categorías principales: 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 con mantenimiento de la forma (Figura 3i, 3ii y 3iii; respectivamente).

## Evaluación de los tiempos de fijación sobre la condensación de la cromatina espermática

No se encontraron diferencias en el número de espermatozoides positivos e intermedios al AT entre las muestras fijadas durante 2 y 30 minutos ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 1).

Tampoco se encontraron diferencias en el número de espermatozoides reaccionados (con sus 3 subcategorías) y no reaccionados con el DTT entre los dos tiempos de fijación.

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) ( $Pd \gg 0,05$ ) en el tiempo de 3 minutos con respecto al de 30 segundos de incubación con el DTT (Tabla 2).

## Variabilidad entre los diferentes machos

Se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,0000$ ) entre los diferentes machos en el número de espermatozoides positivos e intermedios al AT. También se observó una respuesta diferente a la descondensación inducida por el DTT. Así, en todos los tiempos de incubación con el DTT, el número de espermatozoides reaccionados fue significativamente diferente entre los diferentes machos ( $Pd \gg 0,05$ ).

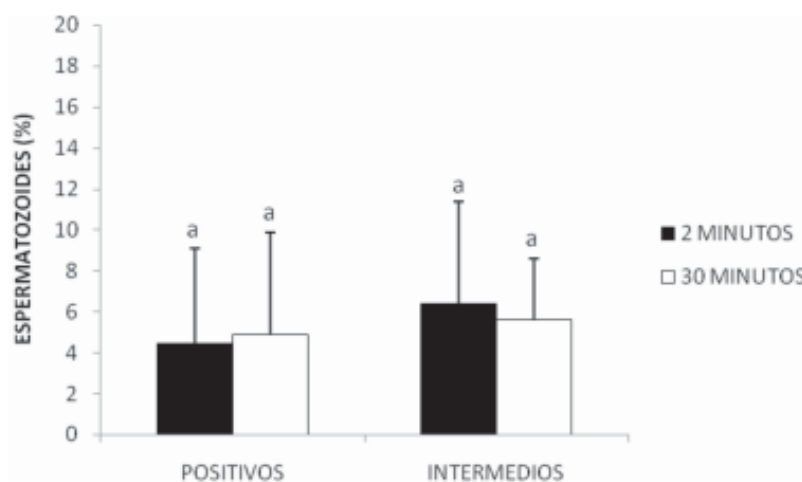


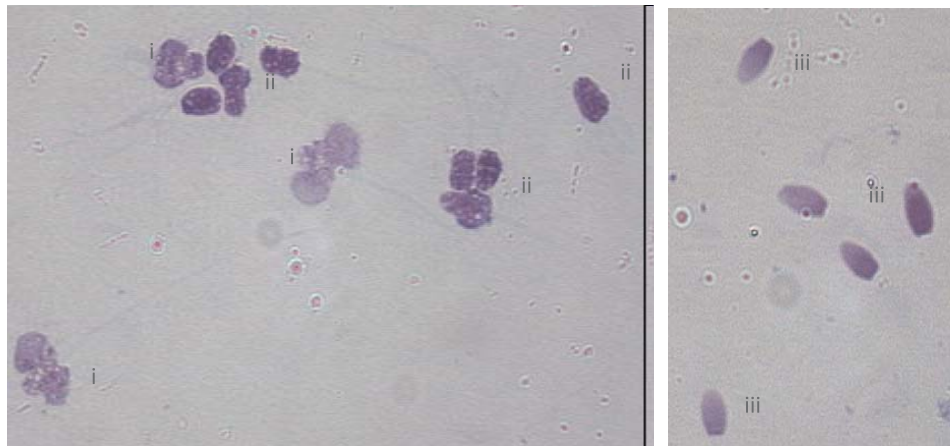
Gráfico 1. Espermatozoides positivos e intermedios al azul de toluidina (AT) en dos tiempos de fijación (2 y 30 minutos).  
a:  $P \geq 0,05$

Incubación con DTT	Cabezas reaccionadas			Cabezas no reaccionadas (media $\pm$ DS)
	i (media $\pm$ DS)	ii (media $\pm$ DS)	iii (media $\pm$ DS)	
30 segundos	7,0 $\pm$ 109 <sup>a</sup>	11,0 $\pm$ 17,3 <sup>a</sup>	354 $\pm$ 261 <sup>a</sup>	467 $\pm$ 414 <sup>a</sup>
1,5 minutos	25,5 $\pm$ 207 <sup>ab</sup>	27,9 $\pm$ 150 <sup>ab</sup>	203 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>	263 $\pm$ 285 <sup>a</sup>
3 minutos	27,9 $\pm$ 182 <sup>b</sup>	32,5 $\pm$ 7,3 <sup>b</sup>	198 $\pm$ 101 <sup>a</sup>	198 $\pm$ 135 <sup>a</sup>

Tabla 2. Efecto del DTT sobre el ADN espermático en semen fresco de llama incubado a diferentes tiempos ( $n=6$ ;  $r=2$ ).

<sup>ab</sup> Letras diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ( $Pd \gg 0,05$ ).





**Figura 3.** Espermatozoides de llama reaccionados con ditiotreitol (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.

## Discusión

La tinción de AT permite evaluar el grado de condensación de la cromatina espermática en varias especies (conejo<sup>10</sup>, humano<sup>4,14,15,16</sup> toro<sup>9,11</sup> padrillo<sup>22,28</sup>), pero hasta el momento no se ha reportado en espermatozoides de llama.

En este trabajo se utilizó una solución de trabajo con una concentración final de AT de 0,02%. Las distintas coloraciones de las cabezas espermáticas observadas fueron: coloración celeste (negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación), violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación). Esta misma técnica simplificada ha sido utilizada en semen equino<sup>28</sup>, en nuestro laboratorio, encontrándose los mismos patrones de coloración. En semen de conejo<sup>10</sup> utilizaron una concentración de 0,025% de AT y observaron una coloración celeste en la mayoría de los espermatozoides (cromatina normal) y una coloración azul a violeta en aquellos espermatozoides con la cromatina alterada. Por otra parte, en humanos<sup>14</sup>, utilizando la misma concentración de colorante que los autores anteriores, reportaron cuatro patrones de cabezas espermáticas diferentes: oscuros (violetas),

azules, violetas claros y celestes. Si bien, en nuestro trabajo, un cuarto patrón se hubiera podido identificar, creemos que la evaluación se volvería demasiada subjetiva.

En nuestro trabajo, se probó simplificar la técnica descrita por otros autores<sup>10,11,14,15,16</sup>, quienes utilizaron una hidrólisis ácida previa a la tinción con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la técnica. Estos autores reportaron que los espermatozoides que tienen una cromatina altamente compacta (normales) son apenas afectados por la hidrólisis ácida y en consecuencia se tiñen levemente celestes, mientras que, en los espermatozoides con una cromatina alterada, las protaminas pueden ser parcialmente extraídas por la hidrólisis permitiendo que las moléculas de AT se unan a los grupos fosfato. En nuestro laboratorio, observamos espermatozoides violetas oscuros en las muestras sin necesidad de realizar la hidrólisis ácida previa a la tinción con AT.

Distintos autores han utilizado diferentes soluciones para fijar los extendidos: metanol<sup>4</sup>, etanol-ácido acético (3:1) más etanol 70%<sup>10,11</sup>, etanol-acetona (1:1)<sup>14,15,19</sup>. Muchas de estas sustancias pueden ser altamente tóxicas si son inhaladas durante su

manipulación<sup>21</sup>. En este trabajo, la fijación simple con etanol 96° fue efectiva, dado que se encontraron patrones de coloración similares a los observados en otras especies. Con respecto a los dos tiempos de fijación utilizados en humanos y probados en este trabajo (2 minutos<sup>4</sup> y 30 minutos<sup>14,15,16</sup>), al no observar diferencias significativas entre ellos tanto en la muestra como en el control positivo, el tiempo de 2 minutos sería el de elección debido a que se agiliza la técnica.

En este trabajo los patrones observados al incubar los espermatozoides con una solución de DTT al 1% fueron: reaccionados y no reaccionados (positivos y negativos al AT, respectivamente). Dentro de los reaccionados se pudieron observar 3 subcategorías: cabezas muy descondensadas (muy agrandadas, con presencia de un gran número vacuolas), cabezas deformadas (agrandadas, con un número moderado de vacuolas) y cabezas con mantenimiento de la forma. Similares patrones, aunque en distinta proporción, fueron observados en otras especies (conejo<sup>8</sup>, humano<sup>4</sup>, carnero<sup>27</sup>, toro<sup>8,30</sup>). En estos ensayos<sup>4,8,27,30</sup> se utilizaron tiempos mayores de incubación que en nuestro estudio, en algunos de ellos utilizaron una concentración menor de DTT<sup>8,27</sup> y en otros<sup>4,30</sup> la misma concentración que en nuestro trabajo. Esto implicaría que el uso de agentes reductores de puentes disulfuro 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.

Además, en este trabajo se encontraron variaciones entre los machos. Similares resultados han sido observados en humanos<sup>5,24</sup> y en toros<sup>30</sup>. Esta variación podría estar indicando una susceptibilidad diferente a la descondensación de la cromatina espermática *in vitro* entre machos y quizás sea útil para evaluar la susceptibilidad individual a otros procesos *in vitro* a los que son sometidos los espermatozoides.

## Conclusiones

La coloración de la cromatina de espermatozoides de llama con AT puede ser utilizada en esta especie para evaluar la condensación de la cromatina. Se logró simplificar y economizar la técnica de AT utilizada previamente por otros autores en otras especies y describir los patrones observables en la llama. El DTT puede ser utilizado como control positivo de la técnica y para evaluar la susceptibilidad de cada individuo a la decondensación *in vitro*.

## Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto UBACyT V805. Los autores agradecen el asesoramiento de la Dra. María Rosa Ferrari y de la Lic. Sonia Spirito.

## Bibliografía

1. Ahmadi, A.; Ng S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999; 284: 696-704.
2. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1982; 93: 298-305.
3. Balhorn R. Mammalian protamines: Structure and molecular interactions. In: Adolph KW (Ed) *Molecular biology of chromosome function*. Springer, New York-Berlin-Heidelberg. 1989; 366-395.
4. Barrera, C.; Mazolli, A.B.; Pelling, C.; Stockert, C. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta histochem, (Jena)* 1993; 94: 141-149.
5. Bedford, J.M.; Calvin, H.I.; Cooper, G.W. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fert.* 1973; 18: (Suppl.) 199-213.
6. Bedford, J.M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Hamilton DW & Greep R O (eds). *Handbook of Physiology* 1975; Vol. 5, Chap. 14: 303.
7. Bedford, J.M. Evolution of sperm maturation and sperm storage function of epididymis. In: Fawcett DW and Bedford JM (Eds) *The spermatozoon*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 1979; 7-21.



8. Beil, R.E.; Graves, C.N. Nuclear decondensation of mammalian spermatozoa: changes during maturation and in vitro storage. *J. Exp. Zool.* 1977; 202 (2): 235-40.
9. Beletti, M.E.; Mello, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. *Braz. J. Genet.* 1996; 19: 97-103.
10. Beletti, M.E.; Mello, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology* 2004; 62: 398-402.
11. Beletti, M.E.; da Fontoura Costa, L.; Mendes Guardieiro, M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.* 2005; 22(2): 85-90.
12. Cortés-Gutiérrez, E.I.; Dávila-Rodríguez M.I.; López-Fernández, C.; Fernández, J.L.; Gosálvez J. Evaluación del daño del ADN espermático. *Actas Urol. Esp.* 2007; 31(2): 120-131.
13. Director, A.; Giuliano, S.; Trasorras, V.; Carretero, I.; Pinto, M.; Miragaya, M. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research.* 2007; 14(2): 203-206.
14. Erenpreisa, J.; Erenpreiss, J.; Freivalds, T.; Slaidina, M.; Krampe, R.; Butikova, J.; Ivanov, A.; Pjanova, D. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry Part A* 2003; 52A:19-27.
15. Erenpreiss, J.; Bars, J.; Lipatnikova, V.; Erenpreisa, J.; Zalkalns, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl.* 2001; 22(1): 45-53.
16. Erenpreiss, J.; Jepson, K.; Giwercman, A.; Tsarev, I.; Erenpreisa, J.; Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *H. Reprod.* 2004; 19(10): 2277-2282.
17. Evenson, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *J. Reprod. Fertil. Dev.* 1999; 11: 1-15.
18. Franken, D.R.; Franken, C.J.; de la Guerre, H.; de Villiers, A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999; 31: 361-366.
19. Gagnon C. The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: cache River Press 1999. ISBN: 978-1-889899-03-9
20. Giuliano, S.; Director, A.; Gambarotta, M.; Trasorras, V.; Miragaya, M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 104: 359-369.
21. Macedo, J.B.; Nava Muñoz, S. Intoxicación por metanol inhalado. *Rev. Asoc. Mex. Med. Crít y Ter Int.* 2000; 14(2): 67-70.
22. Naves, C.S.; Beletti, M.E.; Duarte, M.B.; Vieira, R.C.; Diniz, E.G.; Jacomini, J.O. Evaluation of equine spermatid chromatin with toluidine blue and acridine orange. *Biosci. J.* 2004; 20(3): 117-124.
23. Ostermeier, G.; Sargeant, G.; Yandell, B.; Evenson, D.; Parrish, J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.* 2001; 22: 595-603.
24. Pasteur, X.; Laurent, J.L.; Azéma, J.; Jourlin, M.; Deage, P.; Grange, D. Decondensation in vitro du noyau du spermatozoïde humain et analyse d'image. *CR Soc. Biol.* 1983; 176: 123.
25. Pogany, G.C.; Corzen, M.; Weston, S.; Balhorn, R. DNA and protein content of mouse sperm. *Exp. Cell. Res.* 1981; 127-136.
26. R.2.2.1. Program. Copyright 2005, The R Foundation for Statistical Computing Version 2.2.1 (2005-12-20 r 36812). ISBN3-900051-07-0.
27. Rodriguez, H.; Ohanian, C.; Bustos-Obregon E. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int. J. Androl.* 1985; 8: 147-158.
28. Sardoy, M.C.; Carretero, M.I.; Neild, D. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 107: 349-350.
29. Tavalae, M.; Nasr Estahani, M.H.; Reza Deemeh, M. Etiology and evaluation of sperm chromatin anomalies. *Int. J. Fertil. Steril.* 2008; 2(1): 1-8.
30. Vieytes, A.L.; Cisale, H.O.; Ferrari, M.R. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. *Veterinary Record* 2008; 163: 625-629.