

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN
CERDOS**

por

Carlos Javier BATISTA BENTANCOR

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Animales**

MONTEVIDEO

URUGUAY

marzo 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el DMTV (PhD) Alejandro Bielli, DMTV (PhD) Jorge Gil, Ing. Agr. (PhD) Daniel Fernández Abella y DMV (MSc) Álvaro López, el 30 de marzo de 2012. Autor: DMTV Carlos Batista. Director: Ing. Agr. (MSc) Hugo Petrocelli.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Al establecimiento rural “Torre del OSO” por brindar el acceso a los animales y la información para realizar este trabajo. A los señores “Pipo” y su hijo Líber que en su calidad de encargados del área reproducción del establecimiento, dedicaron su tiempo para la obtención de muestras y recopilación de información.

A la Facultad de Agronomía y la Unidad de Posgrado por permitir mi incorporación a los estudios de Maestría en Ciencias Agrarias.

A todos aquellos integrantes del departamento de Producción Animal y Pasturas que atendieron siempre mis inquietudes en el proceso de realización de este trabajo.

Un sentido y perdurable agradecimiento a mi tutor, compañero de oficina y amigo Hugo Petrocelli por mostrarme otra puerta que abrir y ayudarme a transcurrir por ella. Y un especial agradecimiento a una crítica, compañera de oficina y amiga Elize Van Lier.

Este trabajo está dedicado a mi familia, mis padres que me apoyaron desde el inicio incondicionalmente y a mi esposa e hijos que sin condición alguna cedieron valiosos momentos y alimentaron permanentemente este emprendimiento.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. PRODUCCIÓN NACIONAL.....	1
1.2. CALIDAD DE ADN ESPERMÁTICO.....	2
1.3. CAUSAS DE FRAGMENTACIÓN.....	4
1.4. TÉCNICAS PARA EVALUAR FRAGMENTACIÓN.....	6
1.5. CALIDAD DE ADN ESPERMÁTICO Y ÚTERO.....	9
2. <u>FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO EN SEMEN PURO</u>	12
2.1. RESUMEN.....	13
2.2. SUMMARY.....	14
2.3. INTRODUCCIÓN.....	15
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.4.1. <u>Manejo de Muestras de Semen en la Granja</u>	17
2.4.2. <u>Manejo de Muestras de Semen en Laboratorio</u>	18
2.4.3. <u>Fragmentación de ADN e (IFD%) Índice de Fragmentación (%)</u>	18

2.4.4. <u>Dinámica de la Fragmentación</u>	19
2.4.5. <u>Análisis Estadístico</u>	19
2.5. RESULTADOS.....	20
2.5.1. <u>Fragmentación de ADN</u>	20
2.5.2. <u>Dinámica de la fragmentación de ADN</u>	23
2.5.3. <u>Dinámica entre tiempos independientemente del cerdo</u>	24
2.5.4. <u>Fragmentación y concentración</u>	24
2.5.5. <u>Reproducción</u>	25
2.6. DISCUSIÓN.....	27
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	37
3.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	37
3.2. CONCLUSIONES GLOBALES.....	40
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	41

RESUMEN

Dinámica de la fragmentación del ADN espermático en cerdos

El macho con buena calidad de semen y calidad de ADN espermático desconocido, podría ser el causante de las fallas en la gestación. No está claro cómo es la calidad del ADN espermático en condiciones térmicas similares a las uterinas y junto al plasma seminal. Este trabajo tuvo como hipótesis que la calidad del ADN espermático de semen puro disminuye bajo condiciones de concentración, temperatura y tiempo de conservación prolongados similares a las uterinas. El objetivo general fue determinar la fragmentación y la dinámica de la fragmentación del ADN espermático de semen de cerdos utilizados para reproducción. Fueron evaluados e incubados a 37 °C por 24 horas, 61 eyaculados puros provenientes de 5 cerdos machos híbridos, realizando 428 fijaciones. En la granja se procedió a realizar la fijación para el tiempo 0 (T0) y en el laboratorio fueron realizadas fijaciones a las 4 horas de obtenido el semen (T4), luego cada 2 horas (T6, T8, T10, T12) y una última fijación a las 24 horas (T24). La velocidad de fragmentación de ADN fue de $4,32 \times 10^6$ y $1,15 \times 10^6$ espermatozoides por hora para cerdos jóvenes y viejos respectivamente. En ninguna de las muestras pertenecientes a los T24, se pudieron visualizar cabezas espermáticas con halos de dispersión de cromatina. Se observó diferencia significativa entre los cerdos cuando fue comparada la dinámica de fragmentación espermática ($p < 0,05$). Sin embargo, el efecto macho y la fragmentación del ADN espermático no afectaron el desempeño reproductivo, $R^2 = 0,06$ ($p = 0,68$) y $R^2 = 0,38$ ($p = 0,75$), respectivamente. La evaluación de la dinámica de fragmentación del ADN espermático en semen puro y mantenido a temperaturas similares a las uterinas, sugirió un posible comportamiento del ADN espermático perteneciente a espermatozoides de reserva.

Palabras Clave: reproducción, ADN, semen, temperatura de exposición, cromatina.

SUMMARY

Dynamics of sperm DNA fragmentation in boars

A male with high quality semen and sperm DNA of unknown quality, could be causing pregnancy failure. The sperm DNA quality under thermal conditions similar to that in uterus and together with seminal plasma is not known. The hypothesis of this study was that the sperm DNA quality of pure semen decreases under conditions similar to those of the uterus in terms of concentration, temperature and prolonged storage. The general aim was to determine the fragmentation and dynamics of sperm DNA fragmentation in semen from pigs used for breeding. Sixty-one ejaculates from 5 hybrids boars were evaluated and incubated at 37 °C for 24 hours, and 428 fixations were made. The fixations for time 0 (T0) were made on farm, and thereafter fixations were made at the laboratory at 4 hours of obtaining the semen (T4), then every 2 hours (T6, T8, T10, T12), and a final fixation at 24 hours (T24). The velocity of DNA fragmentation was 4.32×10^6 and 1.15×10^6 sperm per hour for young and old boars respectively. No sperm heads with halos of chromatin dispersion were visualized in any of the T24 samples. Significant difference was observed between boars when comparing the dynamics of sperm fragmentation ($p < 0.05$). However, the effect of boar and sperm DNA fragmentation did not affect reproductive performance, $R^2 = 0.06$ ($p = 0.68$) and $R^2 = 0.38$ ($p = 0.75$), respectively. The evaluation of the dynamics of sperm DNA fragmentation in pure semen maintained under similar thermal conditions of the uterus suggests a possible behavior of the DNA of spermatozoa of the uterine reserve.

Keywords: reproduction, DNA, semen, incubation temperature, chromatin.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCCIÓN NACIONAL

Las existencias de ganado porcino en el país hasta el 2010 ascienden a 200 mil cabezas. Esta cifra se generó a partir de la disminución del número de cabezas registrado en el último censo, representado por el 21,6 %. Esta caída en la producción interna de cerdos conllevó a la importación de ganado porcino desde la región para cubrir el ritmo de faena que fue de 265 toneladas. Las razones de esta retracción en la producción se podrían atribuir a disminución en el número de productores por causa de factores económicos. Sin embargo la disminución de productores es mucho mayor a la de existencias de ganado suino, confirmando la tendencia de una mayor concentración en la producción porcina. Esto se traduce en un aumento del tamaño medio del rodeo por explotación pecuaria (DIEA, 2006). Pero los índices productivos de estos rodeos, muestran una disminución de existencias atribuibles al hecho que el número de lechones a término destetados por madre es de 7,9 animales, siendo la mortalidad total de 16,4 %, esto último sin tomar en cuenta las muertes embrionarias (DIEA, 2010).

Por otra parte, se continúa realizando a nivel de las granjas una selección genética de madres para mejorar a favor de un mayor número de lechones por camada, utilizando razas que producen camadas de lechones numerosas como son Large White, Landrace y líneas Híbridas (DIEA, 2006). Esta selección de madres está sujeta a la producción, es decir aquellas hembras que fallan en las primeras gestaciones o tienen pocos lechones son descartadas.

En el caso de los cerdos machos se realiza igual selección que en la hembra, para un mayor número de lechones. Sin embargo, la evaluación de los machos es a través de los parámetros clásicos del semen y si preña o no a las hembras. Si bien esta evaluación aporta información necesaria para la introducción y permanencia de un macho en el rodeo, no la brinda toda. Los parámetros clásicos de semen dan información de calidad

de la muestra de semen, aportan datos sobre las posibilidades que tienen los espermatozoides de encontrarse con el ovocito, sin embargo no aportan información sobre la calidad del ADN que contienen, siendo este el que va a interactuar con el ovocito (Pérez-Llano et al. 2010). Por todo esto, muchas veces se descartan hembras con aparentes fallos reproductivos como bajo número de lechones o gestación interrumpida, sin tener en cuenta que el macho con buena calidad de semen y calidad de ADN espermático desconocido, podría ser el causante de las fallas en la gestación y/o bajo número de animales por camadas. Este puede ser otro factor determinante de las bajas existencias en los rodeos de cerdos del país.

1.2. CALIDAD DE ADN ESPERMÁTICO

La calidad del ADN espermático es un factor trascendente para iniciar y llevar una gestación a término. En este sentido, en humanos se ha señalado que la lesión del ADN espermático puede dar lugar a un desarrollo anómalo embrionario, fallas en la implantación de embriones y abortos en fases tardías de la gestación (Silva y Gadella 2006, Agarwal y Allamaneni 2005, O'Brien y Zini 2005). Y cuando el daño del ADN espermático es compatible con la vida, da lugar a niños con diversas anomalías (Agarwal y Allamaneni 2005).

La calidad del ADN espermático implica el grado de fragmentación de la cromatina del ADN. Las cadenas de ADN espermático están unidas a las protaminas, estructuras proteicas que se unen en forma longitudinal a la curvatura menor del espiral formado por la hebra doble hélice de ADN. El complejo ADN-protaminas de una hebra permite el encastramiento en la curvatura mayor de otra hebra de ADN (figura 1). Esta disposición de los complejos otorga un empaquetado lado a lado en forma lineal del ADN espermático, conformando la cromatina espermática (Ward 2010). Esta cromatina mantiene su estabilidad por la presencia de puentes di-sulfuro covalentes inter e intra-moleculares que anulan las cargas de repulsión entre hélices, manteniendo la integridad

y el ordenamiento de la cromatina (Ward y Coffey 1991, Balhorn 1982). Todos aquellos factores que alteren la estabilidad del complejo cromatínico provocan fragmentación en el ADN espermático.

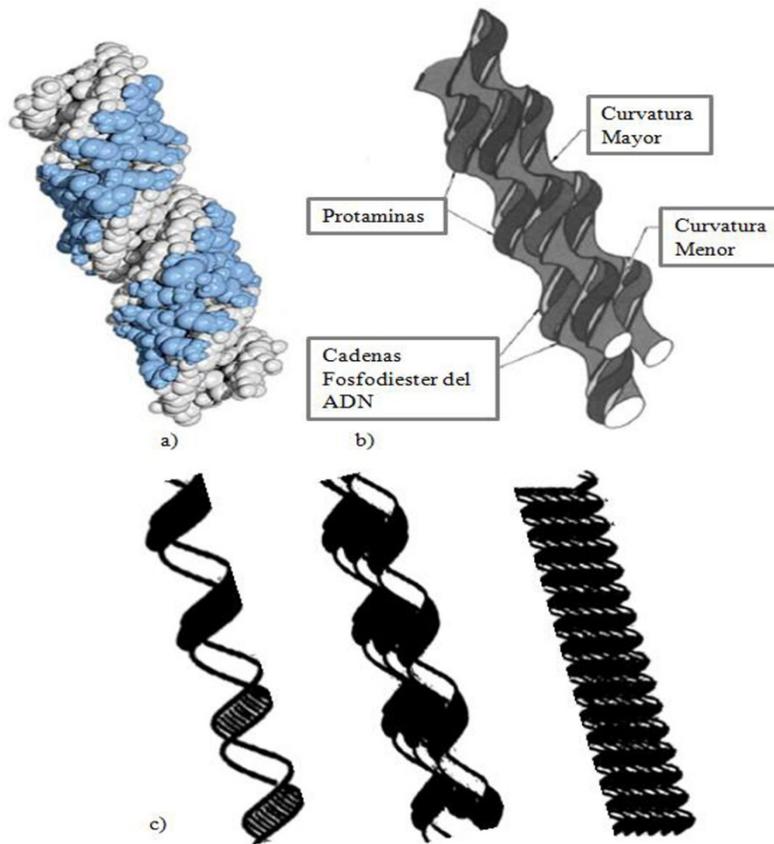


Fig. 1. Empaquetado del ADN con protaminas. a) Modelo mostrando la unión protaminas ADN, b) moléculas de protaminas unidas a la hendidura mayor del ADN, neutralizando las uniones fosfodiester de ADN y causando que la molécula de ADN se enrolle en una estructura toroide, c) fibras de cromatina ilustrando cómo el ADN se puede empaquetar dentro de un menor volumen por las protaminas (Balhorn 2007, Ward y Coffey 1991, Balhorn 1982).

1.3. CAUSAS DE FRAGMENTACIÓN

La fragmentación del ADN espermático puede observarse en semen proveniente de individuos sin patologías y en, principal y mayoritariamente, aquellos con procesos infecciosos, traumas y/o afecciones testiculares de cualquier entidad (Agarwal y Allamaneni 2005, Agarwal y Said 2003, Ollero et al. 2001). Se proponen principalmente 3 hipótesis respecto a las causas de fragmentación del ADN espermático o alteración en la integridad de la cromatina espermática. Una de ellas es el defecto en el empaquetado del ADN espermático, donde se relaciona la presencia de roturas en la cadena del ADN en células maduras con el intercambio del complejo de histonas por el de protaminas que ocurre en el proceso de la espermiogénesis. Este intercambio, dirigido a conseguir una mayor compactación de la molécula de ADN, genera cierto nivel de estrés en la torsión de la molécula de ADN, dado que hay un súper-enrollamiento heredado de la presencia de histonas. Para eliminar este tipo de tensiones y facilitar el reemplazo de las histonas por protaminas se genera un cierto nivel de roturas en las moléculas de ADN que serán posteriormente reparadas (Leduc et al. 2008).

Este tipo de daño y reparación, netamente estructural, se ha demostrado en espermátidas de ratones en estado de elongación. Es posible que este proceso también ocurra en el resto de las especies animales como el cerdo. La topoisomerasa, una de las enzimas que participan en este proceso de remodelación de la cromatina espermática, podría generar daño en el ADN espermático (Gosálvez et al. 2008, Agarwal y Said 2003, McPherson y Longo 1992, Balhorn 1982).

Una segunda hipótesis plantea un desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes, resultando en daño celular. Las ROS son agentes oxidantes y forman parte de una familia de moléculas conocidas como radicales libres (Tortolero et al. 2005). Los altos niveles de ROS, podrían ser consecuencia de su liberación por los leucocitos activados y/o macrófagos, por ejemplo,

frente a una respuesta inflamatoria generada ante un proceso infeccioso. La presencia de células inmaduras en el esperma, que mantienen cantidades excesivas de citoplasma, como por ejemplo la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o distales, pueden también contribuir a provocar altos valores de oxidación (Barroso et al. 2000).

Se podría generar estrés oxidativo cuando la producción de ROS supera la actividad antioxidante de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Kasimanickam et al. 2006b). Además, antioxidantes secundarios como la vitamina E (alfa tocoferol) y vitamina C (ascorbato) también podrían verse superados por la acción de las ROS (Gosálvez et al. 2008, Tortolero et al. 2005, Agarwal y Said 2003).

La tercer hipótesis propuesta como responsable de la fragmentación del ADN espermático es el proceso apoptótico o muerte celular programada. La apoptosis de células espermáticas se inicia en la espermatogénesis, momento en el cual algunas células que serán eliminadas, escapan al mecanismo de eliminación (Gosálvez et al. 2008, Moustafa et al. 2004, Anzar et al. 2002, Sakkas et al. 2002). El proceso de apoptosis podría deberse a la activación de endonucleasas las cuales causan extensos cortes endógenos en la cadena de ADN, esto representa una manera de inactivar y/o eliminar material genético defectuoso (Moustafa et al. 2004). Sumado a esto, la presencia de marcadores de superficie o proteína de superficie celular como, Fas, Bcl-x, p53 o anexina -V, indican células en proceso de apoptosis (Gosálvez et al. 2008, Candé et al. 2004, Moustafa et al. 2004, Agarwal y Said 2003, Sakkas et al. 1999). En cualquiera de los dos casos, la salida de células espermáticas con estas características en el eyaculado indicaría un proceso apoptótico interrumpido o abortado y la consecuente disminución de la calidad del ADN en los espermatozoides eyaculados.

Por otro lado, la presencia de espermatozoides con fragmentación del ADN espermático podría deberse a la asociación de las causas antes mencionadas dado que ninguna de ellas es excluyente (Gosálvez et al. 2008, Moustafa et al. 2004).

Como se señaló, los espermatozoides provenientes de individuos sin patologías pueden presentar cierto grado de fragmentación del ADN que contienen, como es el caso de espermatozoides que escapan a la apoptosis (Agarwal y Allamaneni 2005, Agarwal y Said 2003, Ollero et al. 2001). Otros mamíferos como el cerdo, podrían tener un cuadro similar. En los cerdos, los estudios de la fragmentación del ADN espermático son escasos, pero tendrían la misma tendencia que la observada en humanos, con alto nivel de fragmentación del ADN espermático y correlacionada con fertilidad. Por esto, se debería evaluar la fragmentación del ADN espermático juntamente con la evaluación clásica de semen, principalmente en aquellos cerdos utilizados en las granjas para la reproducción y donde se utilizan técnicas reproductivas (López-Fernández et al. 2008b).

1.4. TÉCNICAS PARA EVALUAR FRAGMENTACIÓN

Distintas técnicas han sido desarrolladas para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático: El TUNEL (transferase-mediated d-UTP nick end labelling) incorpora desoxiuridina biotilada al 3'OH del ADN afectado. La biotina actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas fluorescentes. Los espermatozoides con ADN fragmentado se tiñen con fluorescencia intensa. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. La fluorescencia producida puede ser detectada por citometría de flujo así como a través de microscopio de fluorescencia (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Agarwal y Allamaneni 2005, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002).

El SCSA (sperm chromatin structure assay) está basado en el principio de que la cromatina espermática anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. El grado de desnaturalización por el tratamiento mediante

calor o ácido se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero, que al ser excitado emite color verde, pero que presenta emisión en color rojo-naranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla. Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discriminar entre tipos de colores (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Agarwal y Allamaneni 2005, Love 2005, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002, Larson et al. 2000).

El ensayo Comet se basa en la descondensación del ADN del espermatozoide cuando es puesto en un gel y sometido a la acción de un campo eléctrico, las moléculas del ADN se desplazan generando una imagen en forma de cometa. La presencia de daño en el ADN es medida por la longitud de la cola generada (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Agarwal y Allamaneni 2005, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002).

El análisis *in situ* nick translation (INST) cuantifica la incorporación de desoxiuridin trifosfato biotinilado a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa 1. De esta manera se detectan los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno de su ADN (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Agarwal y Allamaneni 2005, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002).

El Acridine Orange (AO) mide la susceptibilidad del ADN espermático al ácido, inducida por la desnaturalización *in situ* por cuantificación del cambio metacromático del naranja de acridina fluorescente del verde al rojo. El naranja de acridina fluorescente se va intercalando entre las dobles cadenas de ADN como monómero y va ligando las cadenas simples del ADN como un agregado. El naranja de acridina monomérico vira el ADN natural a verde fluorescente mientras que el naranja de acridina agregado al ADN desnaturalizado vira a rojo fluorescente (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Agarwal y Allamaneni 2005, Chohan et al. 2004, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002).

Además, AO fue una de las metodologías utilizadas para estudiar la desnaturalización térmica del ADN *in situ* (Darzynkiewicz et al. 1975).

Al igual que el anterior, el Azul de Toluidina (AT) es una metodología alternativa. El AT interacciona con la cromatina espermática incorporándose a la parte rica en protaminas. Si la cromatina es inmadura y/o presenta roturas del ADN el colorante se incorpora en los puntos de unión liberados por la cadena de ADN y protaminas. La visualización en microscopio de campo claro permite observar coloraciones intensas correspondiente a espermatozoides con ADN espermático dañado, coloraciones intermedias de espermatozoides con poco daño en su ADN y sin colorear correspondiente a los sin daño aparente.

DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence *in Situ* Hybridization), se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas o ácidas suaves de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el ADN de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN marcada con un fluorocromo. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Enciso et al. 2006).

Por último, el SCD (sperm chromatin dispersion test) se basa en el análisis de los niveles de fragmentación de la cadena de ADN. Esta técnica utiliza una solución de digestión para disgregar la membrana celular del espermatozoide y permitir la salida del ADN, una vez digerida, la muestra de semen es impregnada con un mix de fluorocromo (ioduro de propidio) más antifading para ser evaluadas bajo microscopio de fluorescencia, observando si hay dispersión de cromatina espermática (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Gosálvez et al. 2007, Enciso et al. 2006, Pérez-Llano et al. 2006, Fernández et al. 2005, Fernández et al. 2003).

Las distintas técnicas fueron desarrolladas y aplicadas para investigación y diagnóstico en humanos, y posteriormente fueron trasladadas a los animales (bovinos, ovinos, suinos, equinos, rinocerontes, peces, aves) para investigar la fragmentación de ADN espermático (Gliozzi et al. 2011, Portas et al. 2009, López-Fernández et al. 2008ab, Fraser et al. 2007, Fraser y Strzezek 2007ab, De Ambrogi et al. 2006, Enciso et al. 2006, Kasimanickam et al. 2006a, Pérez-Llano et al. 2006, Boe-Hansen et al. 2005b, Cabrita et al. 2005, Love et al. 2005). Así, se relacionó fragmentación del ADN espermático y capacidad fertilizante en semen de carneros a través de SCSA (Kasimanickam et al. 2006b). En equinos, la susceptibilidad a la desnaturalización del ADN espermático fue asociada con reducción de la fertilidad en términos de eficiencia reproductiva y tasas de preñez en la temporada de reproducción (Love y Kenney 1998). Boe-Hansen et al. (2005b) determinaron en bovinos cómo se afectó la integridad del ADN espermático en muestras de semen bajo procedimiento de sexado. En cerdos, los primeros ensayos sobre ADN espermático fueron realizados por Evenson et al. (1994), al evaluar la utilidad del método SCSA para estudiar la fertilidad de muestras de semen frescas y congeladas midiendo la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización.

1.5. CALIDAD DE ADN ESPERMÁTICO Y ÚTERO

La información recabada respecto a la calidad del ADN espermático de cerdos bajo condiciones uterinas, no es del todo clara. Los espermatozoides eyaculados en el útero al momento de la monta van acompañados del plasma seminal, siendo el volumen total eyaculado de ± 350 ml. Inmediatamente, las contracciones de la musculatura lisa uterina inician el transporte de los espermatozoides hacia los sitios conocidos como reservorios espermáticos y de fertilización (Hunter 1984, Hawk 1983, First et al. 1968). Aproximadamente 70 a 99% de los espermatozoides son eliminados de la luz uterina rápidamente (Rodríguez-Martínez et al. 2005). A las 2 horas gran parte del eyaculado desaparece de los cuernos uterinos y una alta concentración de espermatozoides persiste

en la región útero tubárica (Hunter 1981). A las 6 horas de la inseminación existe un promedio de 10^6 espermatozoides en cada unión útero tubárica y este número persiste a las 24 horas. Pueden permanecer incluso hasta 72 horas pos inseminación 4×10^6 espermatozoides en la unión útero tubárica (Rigby 1966). Según First et al. (1968) el número de espermatozoides a nivel útero tubárico es similar pos inseminación a los 15 minutos 2, 4, 8 y 24 horas y además permanecen motiles. Este reservorio espermático formado a nivel de oviducto se encuentra una parte en la fase luminal y otra en contacto directo con el epitelio, nutrido por el fluido del oviducto el cual contiene importante cantidad de glycosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados. (Rodríguez-Martínez et al. 2005). La temperatura de la zona de reservorio en el oviducto se ha registrado para cerdas en celo pre y pos monta, promediando los $37,87 \pm 0,37$ °C (Hunter y Nichol 1986).

Paralelamente al transporte y formación de la reserva espermática, se produce una respuesta del útero a la entrada de semen con un rápido y dramático influjo de células inflamatorias dentro del lugar de deposición del semen. Una cascada inflamatoria ocurre después de la inseminación en el útero de cerdas, provocando la eliminación de muchas células espermáticas y estresando al resto (Jiwakanon et al. 2011, Kaczmarek et al. 2010, Robertson 2007, Waberski et al. 2006, O'Leary et al. 2004).

Considerando lo mencionado, la calidad de células del semen respecto a la fragmentación del ADN espermático bajo condiciones de reserva uterina, junto al plasma seminal así como, bajo condiciones de estrés extremas, aún no es clara.

Por lo anterior, este trabajo de tesis tuvo como hipótesis que la calidad del ADN espermático de semen puro disminuye bajo condiciones de tiempo de exposición a temperaturas similares a las uterinas.

El objetivo general de esta tesis fue determinar la fragmentación y la dinámica de la fragmentación del ADN espermático de semen de cerdos utilizados para reproducción. Además, establecer un rango basal de fragmentación en cerdos a los efectos de determinar un punto de referencia de fragmentación y predecir la fertilidad potencial de los mismos.

La estructura central de la tesis consiste de un artículo científico titulado ***DAÑO DEL ADN ESPERMÁTICO EN CERDOS: RESPUESTA DINÁMICA*** que aborda el segundo capítulo de la tesis denominado ***FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO EN SEMEN PURO***. En este artículo, escrito para enviar a la revista arbitrada Agrocienza (Uruguay), se evaluó la fragmentación del ADN espermático y la dinámica de la fragmentación de muestras puras mantenidas en condiciones de temperatura similares a las uterinas. En el tercer capítulo de esta tesis se presenta una discusión general y conclusiones generales de la temática planteada.

2. FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO EN SEMEN PURO

Daño del ADN espermático en cerdos: Respuesta Dinámica

C. Batista¹, E. Priore², H. Petrocelli¹

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

²Departamento de Biometría, Estadísticas y Computación, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

Correspondencia: Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, CP 12900. Montevideo, Uruguay. Tel: (+598)23559636; Fax: (+5982)3543460. E-mail: carlosjbatistab@gmail.com

Daño del ADN espermático en cerdos: Respuesta Dinámica

2.1. RESUMEN

Los objetivos fueron evaluar la fragmentación del ADN espermático en cerdos a través de la dispersión de su cromatina en muestras de semen puras, cuantificar la magnitud de fragmentación del ADN espermático estudiando su dinámica en condiciones térmicas similares a las uterinas (37 °C) en un período de hasta 24 horas y evaluar la fertilidad potencial de los reproductores. Se trabajó con 61 eyaculados provenientes de 5 cerdos machos híbridos. Semanalmente se colectó semen a cada cerdo, utilizando la técnica de la mano enguantada y descartando la última fracción del eyaculado. El semen puro se mantuvo en baño maría a 37 °C y protegido de la luz, y luego fue procesado con Sperm-Sus-Halomax[®]. En la granja se realizó la fijación correspondiente al tiempo 0 (T0) y en laboratorio las restantes a las 4 horas de obtención del semen (T4), luego cada 2 horas (T6, T8, T10, T12), y una última fijación a las 24 horas de la primera (T24). Al evaluar el índice de fragmentación del ADN espermático fueron encontradas diferencias significativas entre los tiempos de exposición para todos los cerdos ($p < 0,05$), excepto entre los tiempos T10 vs T12 ($p = 0,77$) y T4 vs T24 ($p = 0,91$). Sin embargo, en ninguna de las muestras pertenecientes a los T24, se pudieron visualizar cabezas espermáticas con halos de dispersión de cromatina. Se observó diferencia significativa entre los cerdos cuando fue comparada la dinámica de fragmentación de ADN espermático ($p < 0,05$). El desempeño reproductivo no fue afectado por la fragmentación del ADN espermático $R^2 = 0,38$ ($p = 0,75$).

Palabras Clave: fragmentación de ADN, cerdos híbridos, concentración espermática, tasa de fragmentación.

2.2. SUMMARY

The objectives were to evaluate sperm DNA fragmentation in boars through the dispersion of their chromatin in pure semen samples, to quantify the extent of sperm DNA fragmentation at 37 °C, to determine its dynamics under thermal conditions similar to the uterus over a period of up to 24 hours and to evaluate the potential fertility of males. We worked with 61 ejaculates from 5 hybrid boars. Semen was collected weekly from each of the boars, using the gloved hand technique and discarding the last fraction of the ejaculate. Fresh semen was maintained in a water bath at 37 °C and protected from light, and was thereafter processed with Sperm-Sus-Halomax[®]. The fixations for time 0 (T0) were made on farm, and thereafter fixations were made at the laboratory at 4 hours of obtaining the semen (T4), then every 2 hours (T6, T8, T10, T12), and a final fixation at 24 hours (T24). Significant differences in the rate of sperm DNA fragmentation were found between exposure times for all boars ($p < 0.05$), except between times T10 vs. T12 ($p = 0.77$) and T24 vs. T4 ($p = 0.91$). However, no sperm heads with halos of chromatin dispersion were observed in any of the T24 samples. Significant difference was observed between boars comparing sperm DNA fragmentation dynamics ($p < 0.05$). The performance reproductive was not affected for sperm DNA fragmentation $R^2 = 0.38$ ($p = 0.75$).

Keywords: DNA fragmentation, hybrid boars, sperm concentration, fragmentation rate.

2.3. INTRODUCCIÓN

La calidad del ADN espermático involucra el estado de enrollamiento del ADN y la integridad del empaquetado, es decir la estabilidad de la cromatina espermática. Defectos en la calidad del ADN espermático conllevan a una falla en los procesos de formación y desarrollo embrionario así como en el mantenimiento de la gestación. En las granjas, la calidad del ADN espermático no es tomada en cuenta al momento de evaluar las muestras de semen, siendo por ahora una técnica utilizada a nivel experimental. En este sentido varios autores (López-Fernández et al. 2007, Evenson y Wixon 2006, Gadea 2005, Agarwal y Said 2003, Evenson et al. 2002), mencionan la alta correlación entre la calidad del ADN espermático y la fertilidad de muestras utilizadas en técnicas de reproducción asistida (IA, inseminación artificial) en humanos y algunas especies animales.

Por otro lado, los espermatozoides eyaculados en el útero al momento de la monta y acompañados del plasma seminal son transportados inmediatamente hacia los sitios conocidos como reservorio espermático y de fertilización (Hunter 1984, Hawk 1983, First et al. 1968). La calidad del ADN espermático en estos lugares de reserva y bajo condiciones uterinas, se desconocen aún.

Pérez-Llano et al. (2010) en estudios con semen de cerdos observaron incrementos dinámicos en los índices de fragmentación de hasta 10% en las primeras 24 horas, en muestras de semen a 37 °C con 5% de CO₂ atmosférico y libradas del plasma seminal. Según Fraser y Strzezek (2004), la presencia y concentración del plasma seminal en semen de cerdo protege a los espermatozoides del estrés oxidativo y, por lo tanto, protege al ADN, mientras que el agregado de diluyente desprovee de la acción antioxidante. Sin embargo, para otros la presencia de diluyente retarda la fragmentación del ADN (Pérez-Llano et al. 2006). En ensayos previos de nuestro equipo de trabajo no se observaron diferencias en la fragmentación del ADN espermático para los tiempos de

exposición a 37 °C de muestras de semen diluidas sin atmósfera controlada (datos sin publicar).

Por lo anterior, se plantea como hipótesis de trabajo que la dinámica de la fragmentación del ADN espermático, en muestras de semen puras y sin cámara de atmósfera controlada, se ve afectada a una temperatura de 37 °C. En estas condiciones los objetivos planteados fueron evaluar la fragmentación del ADN espermático en semen de cerdos a través de la dispersión de su cromatina en muestras de semen puras, cuantificar la magnitud de fragmentación del ADN espermático, determinar su dinámica en condiciones térmicas similares a las uterinas (37 °C) en un período de hasta 24 horas y estimar la fertilidad potencial de los reproductores.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se realizó en una granja dedicada a la cría de cerdos, ubicada en latitud 34 ° 39 ' 18 " sur y longitud 56 ° 17 ' 18 " oeste. El experimento fue realizado en el año 2010 y el período de muestreo tuvo una duración de 6 meses. Se evaluaron 61 eyaculados provenientes de 5 cerdos machos híbridos. Estos fueron seleccionados por ser los que se utilizaban con mayor frecuencia. Sus edades estaban en $15 \pm 0,2$ meses y $37 \pm 0,5$ meses. Semanalmente se colectó semen a cada uno de los cerdos por el mismo operario, utilizando la técnica de la mano enguantada y descartando la última fracción del eyaculado por filtrado con gasa al momento de la extracción. Las muestras de semen fueron procesadas inicialmente en la granja y posteriormente en el Laboratorio de Andrología de la Facultad de Agronomía.

De cada macho se evaluó un mínimo de 10 eyaculados puros, sin diluir ni separar el plasma seminal. El semen de cada cerdo fue procesado inmediatamente a la obtención y evaluado por un período de hasta 24 horas. También fue registrada la temperatura

ambiente, durante todo el experimento, por medio de esferas de Vernon ubicadas en los alojamientos de los cerdos.

2.4.1. Manejo de Muestras de Semen en la Granja

Inmediatamente a la colecta, en cada eyaculado, fue medido el volumen, la concentración espermática y la motilidad espermática. La motilidad de los espermatozoides fue evaluada subjetivamente por el operario de la granja utilizando una escala de muy bueno, bueno y regular para cada muestra, utilizando para el experimento aquellas calificadas como muy bueno. La concentración espermática fue determinada con cámara Neubauer. En paralelo a lo anterior, se colocaron 10 cc de semen en tubo de plástico estéril con tapón de presión en baño maría a 37 °C. Este procedimiento se repitió en todas las muestras obtenidas de cada cerdo durante todo el experimento. Luego se procedió a tomar una segunda muestra de 40 µl del semen puro, la cual fue procesada según el protocolo Sperm-Sus-Halomax[®] Kit (ChromaCell ADN, Madrid España):

- a) Dilución con medio M III[®] (Minitüb Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG, Germany), para obtener la concentración espermática final indicada para evaluación de la fragmentación, $5-10 \times 10^6$. De esta dilución fueron tomados 12 µl para depositarlos en tubo Ependorf, que contenían 17 µl de Agarosa pre-calentada a 100 °C y estabilizada a 37 °C durante 5 minutos. De esta última mezcla se extrajeron 12 µl que se colocaron en un portaobjetos (rotulado con fecha, número de cerdo y tiempo de exposición), se cubrió con cubre objeto y se trasladó a refrigeración a 4 °C por 5 min, quedando fijada así la primer muestra y estableciendo el tiempo 0 (T0).
- b) Posteriormente se continuó el protocolo retirando el cubre objeto y depositando las fijaciones en solución de lisis durante 5 min, a lo que le continuó una etapa de lavado en agua destilada durante otros 5 min. Luego se realizó una etapa de secado de las

fijaciones en alcoholes durante 6 min y otra etapa de secado por evaporación a temperatura ambiente.

c) Por último, las muestras procesadas fueron teñidas con fluorocromo para posteriormente visualizarlas en microscopio de fluorescencia con excitación lumínica verde.

Este procedimiento fue realizado para cada uno de los eyaculados evaluados y fueron realizadas dos fijaciones por muestra de semen, la segunda como respaldo de la primera.

2.4.2. Manejo de Muestras de Semen en Laboratorio

Luego de colectadas y procesadas las muestras para el T0 en la granja, las muestras depositadas en baño maría a 37 °C fueron trasladadas al laboratorio manteniendo la misma temperatura en el traslado y protegidas de la luz. Con las muestras en el laboratorio y siguiendo el mismo procedimiento descrito para el T0 en la granja, se procedió a hacer fijaciones a las 4 horas de obtención del semen (T4) y luego cada 2 horas a partir del T4 hasta el tiempo 12 (T6, T8, T10, T12), realizando una última fijación a las 24 horas de la primera (T24). Las alícuotas de semen para fijación fueron extraídas de las muestras de semen puro, mantenido durante todo el experimento en baño maría a 37 °C y protegidas de la luz.

2.4.3. Fragmentación de ADN e (IFD%) Índice de Fragmentación (%)

Se realizó un total de 428 fijaciones dobles. Cada semana fueron realizadas 70 fijaciones de las cuales se visualizaron 35 los días siguientes a la última fijación, en microscopio de fluorescencia Olympus[®] BX41TF (Olympus Corporation Tokio-Japón) con cubo de luz de excitación verde. Fueron contados 200 espermatozoides por preparado (10 espermatozoides por campo y un total de 20 campos en zig-zag hacia adelante, comenzando el conteo desde la cuarta parte del extremo anterior derecho de la

fijación preparada), con aumento de 400x. La fragmentación del ADN espermático fue evaluada a través de la dispersión de cromatina adjudicando fragmentación a aquellos espermatozoides que mostraron un halo de fluorescencia mayor al diámetro menor de la cabeza del espermatozoide. El índice de fragmentación de ADN espermático (IFD%) estuvo representado por el porcentaje de espermatozoides fragmentados en 200 espermatozoides contados.

2.4.4. Dinámica de la Fragmentación

La dinámica de la fragmentación fue evaluada como los cambios en los índices de fragmentación (IFD%) a lo largo del tiempo de exposición del semen puro a 37 °C.

2.4.5. Análisis Estadístico

Se analizó la proporción de espermatozoides fragmentados en la muestra (siendo la estimación de la probabilidad poblacional) en función del tiempo utilizando como enlace la función logit.

$$\log\left(\frac{\pi_i}{1 - \pi_i}\right) = \mu + \alpha_i$$

Donde:

μ es la media general

π_i es la probabilidad de que un espermatozoide está fragmentado en el tiempo i

α_i es el efecto del tiempo i -ésimo sobre la fragmentación

La estimación del parámetro π_i fue realizada con 95% de confianza. Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GENMOD de SAS (SAS Institute, Cary, NC, 2006). Para la tasa de fragmentación del ADN espermático entre los tiempos de exposición y para las edades de 15 y 37 meses se ajustó la función correspondiente. El desempeño reproductivo de los animales, medido como el número total de hembras paridas en función del número total de hembras servidas, fue analizado con MANOVA (análisis multi-variable de varianza). Para evaluar el desempeño reproductivo total fueron considerados dos meses antes del período de experimento, los 6 meses del período de experimento y 5 meses después del mismo.

2.5. RESULTADOS

Este trabajo es el primero en aportar información de desempeño reproductivo a través de la evaluación del ADN espermático en nuestro país.

La concentración espermática promedio observada fue de $75 \pm 33 \times 10^6$ espermatozoides por ml. Los controles de movimiento espermático realizados en la granja fueron subjetivos, sin embargo la calificación fue de muy buena para todas las muestras evaluadas.

Si bien en el laboratorio no fue evaluado movimiento espermático para cada tiempo de forma sistemática y programada, fue hecho un control de movimiento espermático en los tiempos de exposición T12 y T24 del experimento, con presencia de movimiento en T12 y ausencia en T24. Los volúmenes de semen variaron entre 312 y 370 ml.

2.5.1. Fragmentación de ADN

Se observaron cabezas espermáticas con halos de dispersión de cromatina, representando espermatozoides con su ADN fragmentado, así como cabezas espermáticas con halos de pequeño tamaño o sin ellos representando ADN de poca

estabilidad, considerados sin fragmentar (fig. 2 y 3). La presencia e identificación de cabezas espermáticas con cromatina compactada representada por aquellas cabezas que tienen pequeños halos de dispersión en los espermatozoides fue visualizada desde el T0 hasta T12 inclusive.

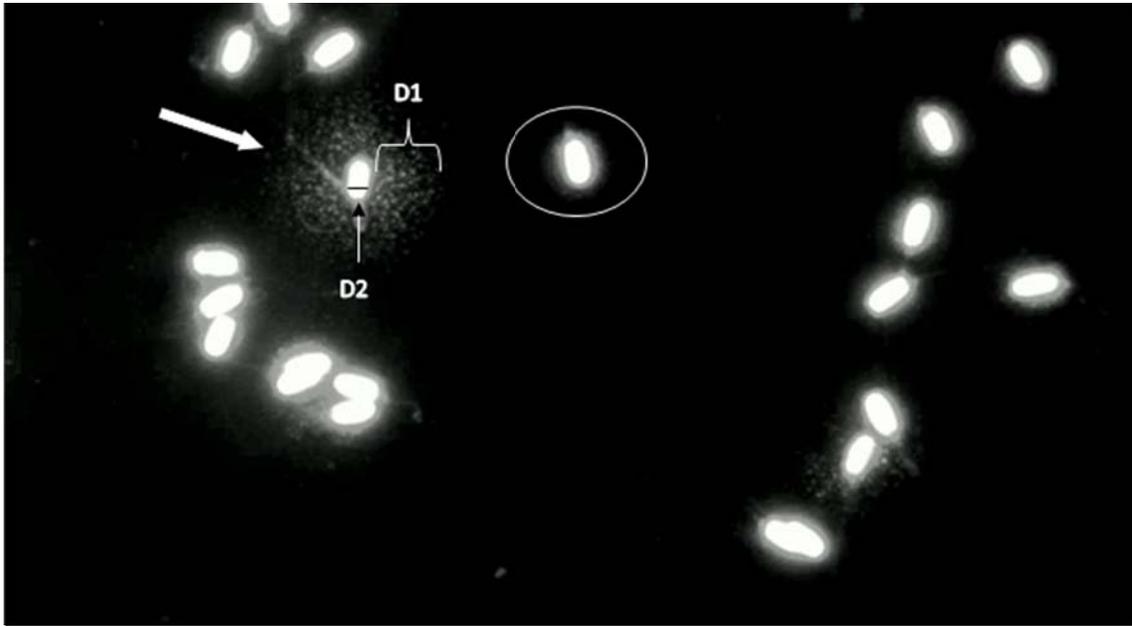


Fig. 2. Espermatozoide con ADN fragmentado (flecha gruesa) y sin fragmentar (circulo). D1: distancia de la dispersión 11,6 μm . D2: diámetro menor de la cabeza espermática 4,8 μm , indicado por flecha fina y línea negra en cabeza espermática. Valores tomados como referencia para espermatozoides con fragmentación (400x).

En ninguna de las muestras pertenecientes a los T24 se pudieron visualizar cabezas espermáticas con halos de dispersión de cromatina (fig. 3). La fragmentación de ADN espermático para cada macho se representa en la (tabla 1). Se observó una velocidad de fragmentación de ADN espermático, para el total del eyaculado, de $4,32 \times 10^6$ y $1,15 \times 10^6$ espermatozoides por hora para cerdos viejos y jóvenes respectivamente.

Tabla 1. Fragmentación de ADN espermático, promedio (%) \pm error estándar (EE) de cada uno de los machos.

Macho	Promedio (%)	EE
A	14	3.9
B	9	3.2
C	5	1.9
D	8	2.5
E	5	1.5

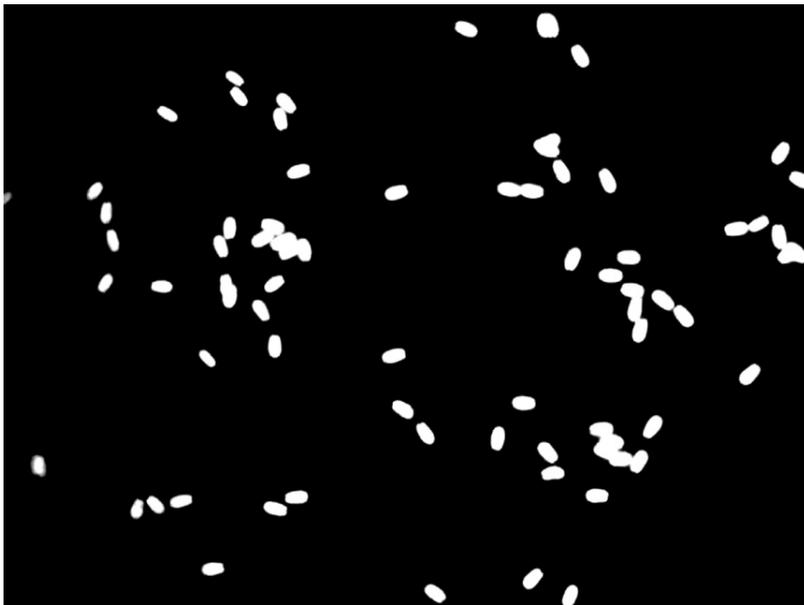


Fig. 3. Espermatozoides sin ADN fragmentado considerados “calvos”, tiempo exposición 24 horas (400x).

2.5.2. Dinámica de la fragmentación de ADN

Hubo diferencias entre los cerdos cuando fue comparada la dinámica del IFD% espermático ($p < 0,05$). Además, se observó una fuerte variación en la respuesta individual respecto a la dinámica de la fragmentación en los tiempos de exposición para cada cerdo. Siendo el T0 de cada cerdo diferente ($p < 0,001$) respecto de los otros tiempos (fig.3). En la (fig.5) se observa cómo varía el IFD% espermático en función del tiempo para las dos edades hasta el T24.

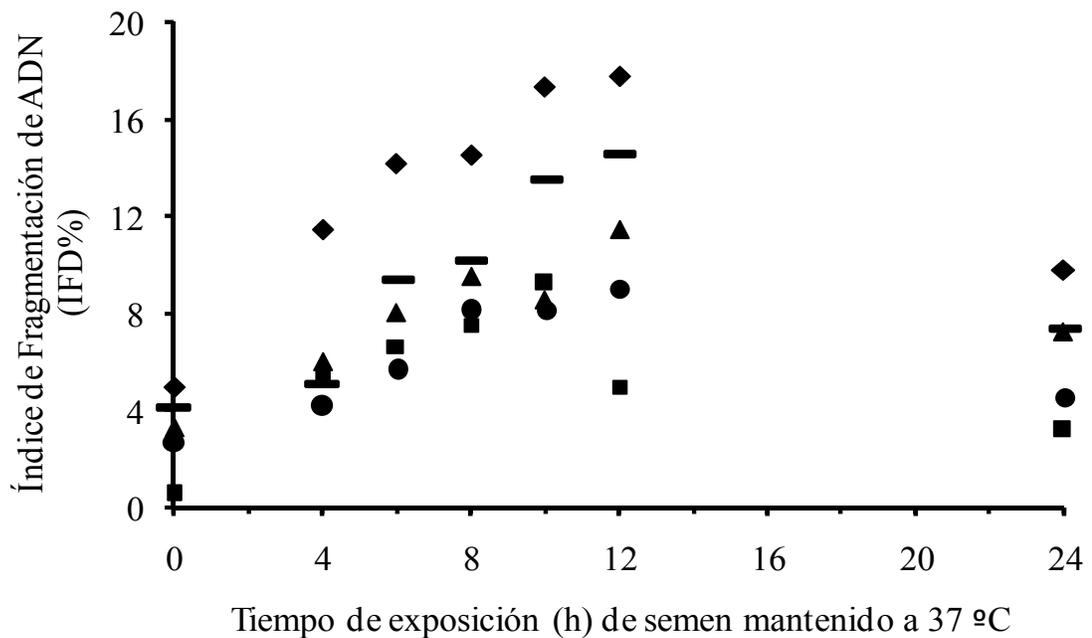


Fig. 3. (IFD%) Índice de fragmentación espermático para todo el experimento y de cada cerdo. ♦ Cerdo A, — Cerdo B, ■ Cerdo C, ▲ Cerdo D, ● Cerdo E.

2.5.3. Dinámica entre tiempos independientemente del cerdo

Al evaluar el IFD% espermático fueron encontradas diferencias significativas entre los tiempos de exposición para todos los cerdos ($p < 0,05$), menos entre los tiempos T10 vs T12 ($p = 0,7751$) y T4 vs T24 ($p = 0,9113$) (fig. 4).

2.5.4. Fragmentación y Concentración

La concentración de espermatozoides no afectó la fragmentación del ADN espermático para ninguno de los cerdos, coeficiente de correlación $-0,18$ ($p = 0,15$).

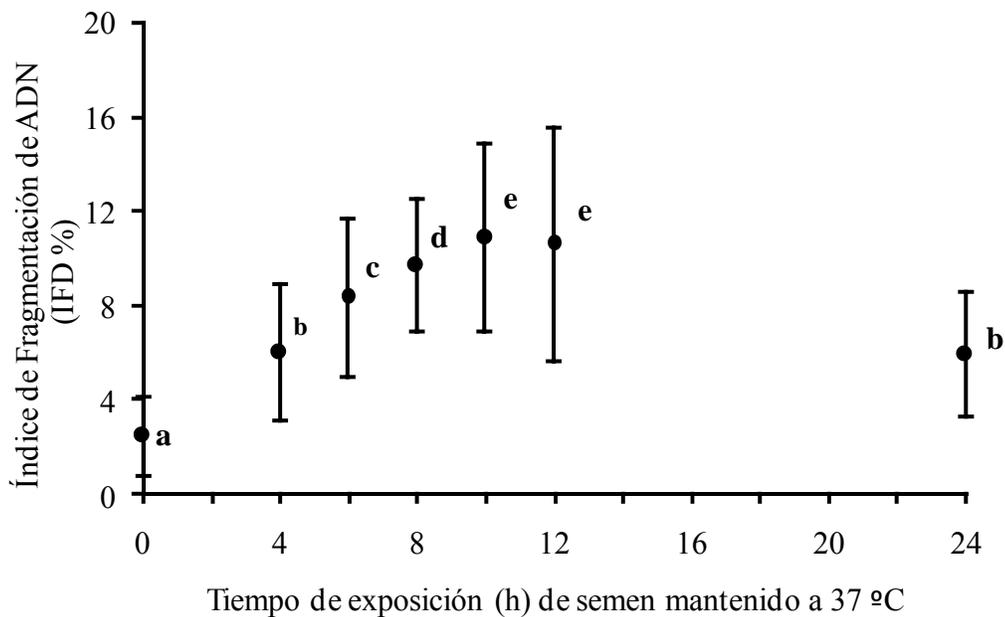


Fig. 4. (IFD%) Índice de fragmentación del ADN media \pm EE (Error Estándar) para cada tiempo de exposición. Diferencias significativas indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$).

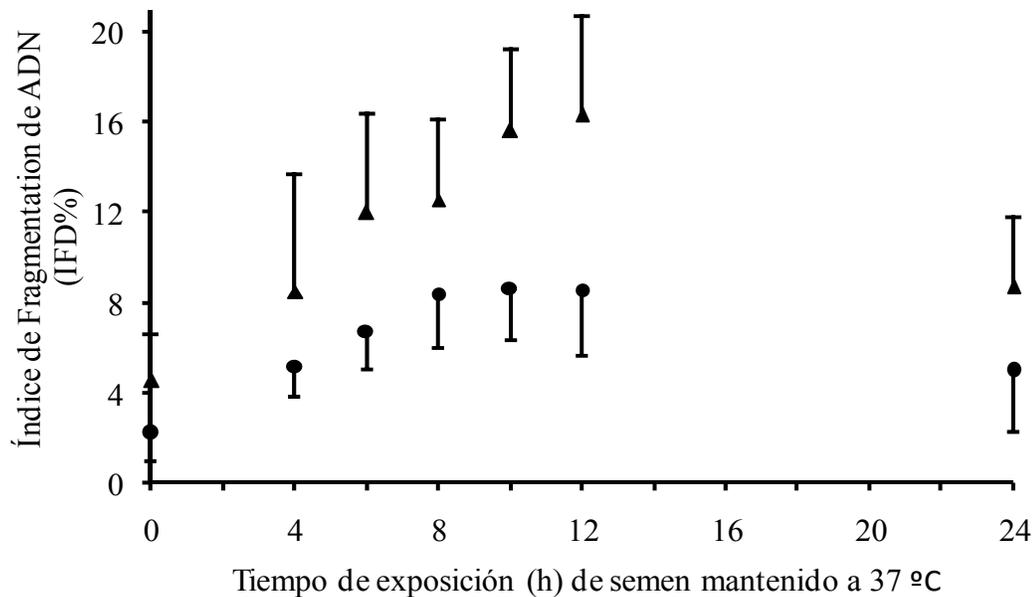


Fig. 5. (IFD%) Índice de fragmentación de ADN para las distintas edades en los tiempos de exposición. Barras superiores representan EE (Error Estándar). ● Cerdos Jóvenes (C, D, E), ▲ Cerdos Viejos (A, B).

2.5.5. Reproducción

Se observó diferencia entre el desempeño reproductivo total de los cerdos, dentro y fuera del período del experimento, para las edades de 15 y 37 meses siendo la media y error estándar de $0,75 \pm 0,02$ y $0,85 \pm 0,04$ respectivamente ($p=0,05$), pero no se observó diferencia para el período de muestreo del ensayo con media y error estándar de $0,76 \pm 0,06$ y $0,81 \pm 0,09$ para 15 y 37 meses de edad respectivamente ($p=0,66$). El efecto macho y la fragmentación del ADN espermático tampoco afectaron el desempeño reproductivo $R^2=0,6$ ($p=0,68$) y $R^2=0,38$ ($p=0,75$) respectivamente. La fragmentación del ADN espermático del T0 no afectó al desempeño reproductivo de los cerdos $r^2=0,16$ ($p=0,84$), ni tampoco T4 y T6 $r^2=0,32$ ($p=0,20$) y $r^2=0,231$ ($p=0,66$) respectivamente. El desempeño reproductivo de los cerdos, fuera y dentro del período del experimento y

únicamente en el período del experimento se representan en las tablas 3 y 4. Tampoco fueron advertidas diferencias significativas en desempeño reproductivo de los cerdos para la fragmentación del ADN espermático entre los tiempos T4-T0, T6-T0 y T6-T4 siendo $r^2=0,14$ ($p=0,62$), $r^2= 0,45$ ($p=0,14$) y $r^2=0,26$ ($p=0,48$) respectivamente.

Tabla 3. Desempeño reproductivo (hembras paridas / hembras servidas x 100) para el año productivo, media \pm error estándar (EE).

Macho	Media %	EE
A	83,5	5,4
B	87,3	6,2
C	77	4,8
D	75,4	4,3
E	73,3	6,3

Tabla 4. Desempeño reproductivo (hembras paridas / hembras servidas x 100) de cada macho para los meses del período de muestreo, media \pm error estándar (EE).

Macho	Media %	EE
A	75,0	13,9
B	94,4	12,8
C	83,9	12,8
D	72,0	9,4
E	76,9	10,4

2.6. DISCUSIÓN

Este trabajo demostró que la integridad del ADN espermático de muestras de semen puras se vio alterada por la exposición a 37 °C. Quedando de manifiesto por aumento de la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado a lo largo del tiempo de exposición. Se pudo entonces, establecer un efecto del tiempo y la exposición sobre el IFD% espermático. Estos datos coinciden en parte con los encontrados por López-Fernández et al. (2010), Pérez-Llano et al. (2010) y López-Fernández et al. (2008 y 2007), estos autores evaluaron muestras de semen cada 24 hrs en cámara de atmosfera controlada y/o utilizaron muestras descongeladas, sin plasma seminal y diluidas siempre en condiciones de atmósfera controlada, de carneros y equinos.

Además, el IFD% quedó de manifiesto entre los tiempos de exposición de las muestras de semen. Estos cambios dinámicos en la fragmentación del ADN espermático están en acuerdo con los obtenidos por otros autores en bovinos, ovinos, equinos, humanos y últimamente en cerdos (Gosálvez et al. 2011a, López-Fernández et al. 2010, Pérez-Llano et al. 2010, López-Fernández et al. 2008, Peregrín et al. 2008, López-Fernández et al. 2007). Sin embargo estos autores utilizaron muestras de semen ya sea con la fracción rica de espermatozoides y/o semen sin plasma y diluido, o únicamente semen diluido y con distintas temperaturas en los distintos ensayos, siempre utilizando cámara de atmósfera controlada.

Los valores crecientes del IFD% a lo largo del tiempo de exposición pudieron deberse a la no utilización de cámara de atmósfera controlada y agregado de diluyente. El no uso de atmósfera controlada pudo permitir el aumento de radicales libres generados por el metabolismo espermático en presencia de O₂. La muerte espermática podría haber sido otro factor relacionado al aumento en la fragmentación, ya que debido a ella se produce liberación de los contenidos enzimáticos del acrosoma, provocando alteraciones en las otras células espermáticas (Tortolero et al. 2005). Esto pudo estar influenciado además por la concentración de espermatozoides (Gundogan et al. 2010). Sin embargo, los valores de fragmentación alcanzados para cada tiempo de evaluación son menores o coincidentes parcialmente con los de otros autores (Gosálvez et al. 2011ab, López-Fernández et al. 2010, Pérez-Llano et al. 2010, López-Fernández et al. 2008, Peregrín et al. 2008, López-Fernández et al. 2007). Además, según los resultados la fragmentación de ADN no fue afectada por la concentración de espermatozoides.

Respecto al agregado de diluyente, su uso podría proteger a los espermatozoides. Según Pérez-Llano et al. (2006), la presencia de diluyentes retrasa o previene parcialmente la fragmentación de ADN. Esto concuerda con lo observado en trabajos previos sin publicar realizados por nuestro equipo de investigación, donde IFD% en muestras diluidas no dio diferencias respecto a la exposición a 37 °C y el tiempo de

exposición. Sin embargo, para otros la dilución interfiere con las características de protección del plasma seminal respecto a la calidad del ADN (Pérez-Llano et al. 2010, Khalifa et al. 2008, Peregrín et al. 2008, Fraser et al. 2007, Fraser y Strzezek 2007ab, López-Fernández et al. 2007, Pérez-Llano et al. 2006, Love et al. 2005, Fraser y Strzezek 2004 y Halliwell y Auroma 1991).

Por otra parte, la variación individual quedó de manifiesto por la respuesta en el IDF% en los distintos tiempos de evaluación. Según Pérez-Llano et al. (2010) ante resultados similares, la variación de respuesta en fragmentación de ADN de los animales podría ser explicada por características inherentes a la genética del propio animal, lo cual resulta en diferencias en el compactado y empaquetado de la cromatina espermática. García-Contreras et al. (2011), observaron también variación individual en la fragmentación de ADN espermático en respuesta a distintos niveles de Zn, sugiriendo probables componentes genéticos involucrados en la variación de respuesta. En este sentido, podemos agregar además la posibilidad de estar involucrados la cantidad de puentes di-sulfuro existentes en las protaminas espermáticas, lo que podría ser variable de acuerdo al individuo (Kasimanickam et al. 2006). Variaciones individuales en la fragmentación de ADN fueron observadas también en semen enfriado y descongelado de equinos (López-Fernández et al. 2007), en semen de cerdo diluido (Boe-Hansen et al. 2008, Gosálvez et al. 2007, Boe-Hansen et al. 2005ab) y en semen fresco de elefantes mantenido a 37 °C (Imrat et al. 2012).

La diferencia en IFD% entre los cerdos pudo deberse también a una variación individual en la tasa de degradación. Una probable explicación de esto podría ser el comienzo de un deterioro biológico gradual en los cerdos de mayor edad, para producir tanto espermatozoides con ADN de buena calidad, como un plasma seminal con elementos de calidad y cantidad adecuadas.

Lo anterior, podría explicar además la diferente tasa en la fragmentación del ADN espermático observada en cerdos viejos y jóvenes. López-Fernández et al. (2008), observaron aumentos en la velocidad de fragmentación en semen diluido de carnero a 37 °C, sin embargo no compararon individuos ni edades. Velocidades de fragmentación casi similares a los de los cerdos viejos se obtuvieron en muestras de semen de elefantes diluidas y mantenidas a 37 °C por largos períodos de tiempo (Imrat et al. 2012).

Los valores de fragmentación a las 24 horas de exposición y los resultados de las imágenes obtenidas para este mismo tiempo, hacen suponer problemas de la técnica. Esto se podría explicar por una incapacidad de detección por parte de la misma. A las 24 horas de exposición la cromatina espermática se fragmentó completamente, saliendo en su totalidad del entorno de la cabeza del espermatozoide, la dispersión de la cromatina podría haber llegado a tal magnitud que termina esparciéndose en todo el medio, lo cual no permite la existencia de un halo detectable por la técnica. Por esta misma teoría, las imágenes de los espermatozoides captadas a las 24 horas no revelan fragmentación apareciendo espermatozoides con aparente ADN compactado. Esta nueva hipótesis es compartida por otros autores (Gosálvez en comunicación personal el 15 de junio de 2010, Portas et al. 2009) que no han publicado aún sus resultados respecto a esto y que denominaron a estos espermatozoides como “calvos”.

Por otra parte, los resultados del desempeño reproductivo durante el ensayo hacen suponer una no relación de estos con el macho, la edad y la fragmentación del ADN espermático, sin embargo la cantidad de datos analizados para la fragmentación del ADN sugiere un sesgo en la información por lo que estos resultados son aparentes. Esto último, se evidencia al comparar el desempeño reproductivo incluyendo períodos de tiempo fuera del ensayo y sin considerar los valores de fragmentación de ADN para cada macho, donde se aprecian diferencias. De igual forma la no relación entre IFD% y diferencias de IFD% entre tiempos de exposición con el desempeño reproductivo, no coinciden con los resultados obtenidos por López-Fernández et al. (2007) que

observaron un aumento en la fragmentación de ADN espermático entre tiempos de exposición relacionado con infertilidad en equinos. Además, un aumento en la susceptibilidad del ADN espermático de equinos a la desnaturalización se asocia con disminución de la fertilidad, tanto en términos de eficacia de la reproducción y tasa de preñez en temporada (Love et al. 2002, Love et al. 2001).

Según lo anterior, la información procesada no permite sugerir un efecto de la variable fragmentación sobre el desempeño reproductivo de los machos utilizados en el ensayo. Sin embargo, este trabajo es el primero en dar información al respecto ya que no existen referencias en este sentido para la especie utilizada que permitan la comparación de resultados.

2.7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Said TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 9(4): 331-345.
- Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MBF, Hedeboe AM. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69(6): 728-736.
- Boe-Hansen GB, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005a. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 63(7): 2006-2019.
- Boe-Hansen GB, Morris ID, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005b. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*. 63(6): 1789-1802.
- Evenson DP, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 15: 979-01.
- Evenson DP, Larson KJ, Jost LK. 2002. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. 23: 25-43.
- First NL, Short RE, Peters JB, Stratman FW. 1968. Transport and Loss of Boar Spermatozoa in the Reproductive Tract of the Sow. *Journal of Animal Science*. 27(4): 1037-1040.
- Fraser L, Dziekonska A, Strzezek R, Strzezek J. 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*. 67(5): 994-1003.

- Fraser L, Strzezek J. 2007a. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*. 68(2): 248-257.
- Fraser L, Strzezek J. 2007b. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*. 99(3-4): 317-329.
- Fraser y Strzezek. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 °C and 16 °C. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 42(1): 499-55.
- Gadea J. 2005. Sperm factors related to in Vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 63: 431-444.
- García-Contreras A, De Loera Y, García-Artiga C, Palombo A, Guvara JA, Herrera-Haro J, López-Fernández C. 2011. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*. 31: 570-573.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF. 2011a. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology*. 75(2):206-211.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF. 2011b. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*. 75(2): 197-205.
- Gosálvez J, Fernández JL, Gosalbez A, Arrollo F, Agarwal A, Lopez-Fernandez. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertility and Sterility*. 88 (1):S365.

- Gundogan M, Yeni D, Avdatek F, Fidan AF. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 122(3-4): 200-207.
- Halliwell B, Auroma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies*. 281(1-2): 9-19.
- Hawk HW. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science*. 66: 2645-2660.
- Hunter RHF. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72(1): 203 -211.
- Imrat P, Hernandez M, Rittem S, Thongtip N, Mahasawangkul S, Gosálvez J, Holt WV. 2012. The dynamics of sperm DNA stability in Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa before and after cryopreservation. *Theriogenology*. 77(5): 998-1007.
- Kasimanickam R, Nebel RL, Peeler ID, Silvia WL, Wolf KT, McAllister AJ, Cassell BG. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*. 66(5): 1307-1315.
- Khalifa TAA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou T. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4): 143-163.
- López-Fernández C, Johnston SD, Fernández JL, Wilson RJ, Gosálvez J. 2010. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm

- concentration. *Theriogenology*. 74(8): 1362-1370.
- López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J. 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram. *Theriogenology*. 70(6): 898-908.
- López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*. 68(9): 1240-1250.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*. 63(6): 1584-1591.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*. 57(3): 1135-1142.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. 2001. The Relationship Between Chromatin Quality and Fertility of Chilled Stallion Sperm. *IVIS.org Proceedings of the Annual Convention of the AAP*. 47: 229-231.
- Peregrín PC, Calogne RN, Ortega-López L, Pérez-Gutierrez LM, López-Fernández C, Gosálvez JB. 2008. Dinámica diferencial de la fragmentación del ADN en espermatozoides capacitados y no capacitados: un análisis prospectivo. *Revista Internacional de Andrología*. 6(3): 186-192.
- Pérez-Llano B, López-Fernández C, García-Casado P, Arroyo F, Gosálbez A, Sala R, Gosálvez J. 2010. Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: ejaculate and temperature effects. *Animal Reproduction Science*. 119(3-4): 235-243.

- Pérez-Llano B, Enciso M, García-Casado P, Sala R, Gosálvez J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*. 66: 2137-2143.
- Portas T, Johnston SD, Hermes R, Arroyo F, López-Fernandez C, Bryant B, Hildebrandt TB, Göritz F, Gosálvez J. 2009. Frozen-thawed rhinoceros sperm exhibit DNA damage shortly after thawing when assessed by the sperm chromatin dispersion assay. *Theriogenology*. 72(5): 711-720.
- Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Osuna JA, Gómez R, Regadera J. 2005. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 3(3):12-19.

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

3.1. DISCUSIÓN GENERAL

La aplicación de pruebas diagnósticas en semen puro de cerdos para evaluar la fragmentación del ADN espermático y los cambios dinámicos en la fragmentación a lo largo del tiempo, podría considerarse otra herramienta diagnóstica respecto a la calidad del ADN espermático del semen de cerdo. Más aún considerando los cerdos utilizados con el fin de mejorar el material genético en las granjas para la reproducción y para aumentar los niveles productivos. (López-Fernández et al. 2008a).

La utilización de metodologías para evaluar fragmentación de ADN espermático, sumada a la evaluación clásica de semen (volumen, concentración, movimiento, vivos y muertos, etc.) en granjas y centros de producción de cerdos reproductores, permitiría disminuir las fallas reproductivas. Esto último, favorecería la producción de los establecimientos de cría disminuyendo las fallas en reproducción y potenciando aún más la selección de los animales.

Sin embargo, la mejora en los índices reproductivos dependerá además, de la raza animal así como también del propio individuo. En este trabajo, la utilización de cerdos únicamente híbridos no permite trasladar los resultados a otras líneas de cerdos. Además quedó demostrado que la variación individual dentro de una misma línea de cerdos no permite generalizar los resultados obtenidos con el resto de los cerdos de la misma línea y menos aún con líneas distintas. Por tales motivos, es relevante jerarquizar las características de fragmentación y dinámica de fragmentación del ADN espermático para cada individuo y raza que estén en programas de selección genética. Así como también, evaluar los cerdos reproductores que se utilizan en las granjas cotidianamente para extracción de semen e inseminación. Dicha evaluación debería realizarse de forma mensual y en modalidad permanente, dado que la fragmentación del ADN espermático

podría variar a causa de distintos factores (García-Contreras et al. 2011, Pérez-Llano et al. 2010, Gadea 2005)

Por otra parte, muchos factores intervienen en la pérdida de estabilidad de la cromatina espermática provocando un aumento en el número de espermatozoides con ADN fragmentado, como se mencionó con variación individual y racial (García-Contreras et al. 2011, Pérez-Llano et al. 2010, López-Fernández et al. 2008b y 2007, Boe-Hansen et al. 2008 y 2005a, Love et al. 2002, Love et al. 2001). Por lo cual normalmente se puede encontrar cerdos con cierto grado de fragmentación del ADN espermático, lo cual debería considerarse fisiológicamente normal. Pero nuevamente, es necesario evaluar al individuo y la línea dado que porcentajes de fragmentación considerados fisiológicamente normales para un cerdo y una línea, pueden ser patológicos para otros.

En este trabajo, este último concepto queda demostrado al comparar las edades de los cerdos. Si bien el número de animales y la utilización de una sola línea genética son muy pobres como para afirmar una diferencia clara en fragmentación de ADN espermático para las edades, se pudo encontrar una diferencia significativa entre las edades de los animales, evidenciándose una tendencia clara a aumentar la fragmentación del ADN espermático en animales de mayor edad respecto a los de menor edad.

Además, el estrés al cual fue expuesto el semen en este trabajo permitió dar una visión aproximada de lo que sucede en el útero de cerda con los espermatozoides. Aportando una mejor idea respecto al comportamiento del ADN espermático en los reservorios espermáticos y la dinámica de la fragmentación del ADN espermático dentro del aparato reproductor femenino.

Por otra parte, el protocolo de análisis de la fragmentación de ADN espermático utilizado en este trabajo ha sido ampliamente empleada (Cortés-Gutiérrez et al. 2007, Enciso et al. 2006, Pérez-Llano et al. 2006, Fernández et al. 2005, Fernández et al.

2003), por lo que la variación observada de la fragmentación de ADN espermático no es atribuible a la técnica. Esto concuerda con Enciso et al. (2006), que observaron diferencias significativas entre protocolos de distintas técnicas, sin embargo estas diferencias fueron atribuidas a las variaciones en la fragmentación del ADN espermático de los individuos utilizados. Al comparar las técnicas excluyendo a los dos individuos que generaban la diferencia no obtuvieron variación en fragmentación de ADN respecto al protocolo empleado.

La técnica utilizada en este trabajo, es una excelente herramienta diagnóstica de la fragmentación del ADN espermático, por los tiempos empleados para su utilización y obtención de resultados, además de los bajos costos de manejo. Por lo cual debería ser utilizada, como se mencionó anteriormente, para el análisis de semen en las granjas y en los centros de mejora de reproductores.

Respecto a la reproducción, es clara la necesidad de involucrar a la hembra respecto al desempeño reproductivo, ya que factores que interviene sobre esta y no en el macho pueden afectar los resultados de reproducción. Si bien lo último es verdadero, el desempeño reproductivo de los cerdos machos puede ser considerado con los resultados obtenidos en este trabajo, aportando mayores interrogantes de los probables efectos de la fragmentación del ADN espermático respecto al biotipo, macho, edad, temperatura de mantenimiento y tiempo de conservación, dado los resultados de desempeño reproductivo durante el experimento y fuera de este. Además debe considerarse la falta de información de otros trabajos, respecto a las variables estudiadas.

Según lo anterior, es necesaria mayor investigación para poder cotejar estos y otros posibles resultados de desempeño reproductivo con fragmentación de ADN espermático y los posibles cambios dinámicos del mismo, en las condiciones estudiadas y otras. En este sentido, muestras de semen puro y diluido bajo la acción de cámara de atmósfera controlada proveniente de distintos cerdos en un número mayor al estudiado y

utilizando distintas razas, es necesario para realizar mayor inferencia sobre el desempeño reproductivo respecto a la fragmentación del ADN espermático, biotipo, individuo y edad de los cerdos.

3.2. CONCLUSIONES GLOBALES

La evaluación de la fragmentación del ADN espermático en cerdos es una herramienta de gran importancia y complementaria de las evaluaciones clásicas. Este trabajo reveló la importancia de seguir estudiando y aplicando nueva tecnología en la reproducción animal, con el fin de mejorar los índices generales de producción. En este sentido, el estudio de la fragmentación de ADN espermático y las posibles consecuencias reproductivas en los cerdos es una tarea pendiente en nuestro ámbito de producción. No obstante esto, en el resto de las especies animales, utilizadas con fines productivos en nuestro país, también es necesario el análisis del semen de los reproductores. Más aún, teniendo en cuenta que existen programas de mejora genética, con todo lo que esto implica desde el punto de vista reproductivo, en animales de producción.

Además, la evaluación de la dinámica de la fragmentación del ADN espermático en semen puro y mantenido a temperaturas similares a las uterinas, sugirió un posible comportamiento del ADN espermático perteneciente a espermatozoides de reserva uterina. Esto último deja la interrogante de cómo se comportará realmente al ADN espermático mantenido en el útero de la cerda y como influenciará los resultados reproductivos.

4. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal A, Allamaneni SSR. 2005. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Revista Internacional de Andrología*. 3(1):31-37.
- Agarwal A, Said TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 9(4): 331 -345.
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biology of Reproduction*. 66(2): 354 -360.
- Balhorn R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*. 8(9): 227-227.
- Balhorn R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology*. 93(2): 298 -305.
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15(6): 1338 -1344.
- Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MBF, Hedeboe AM. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69(6): 728-736.
- Boe-Hansen GB, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005a. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 63(7): 2006-2019.

- Boe-Hansen GB, Morris ID, Ersbøll AK, Greve T, Christensen P. 2005b. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*. 63(6): 1789-1802.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 50: 144-153.
- Candé C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. 2004. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ*. 11(6): 591-595.
- Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. 2004. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*. 36: 321-326.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 31(2): 120-131.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. 1975. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Experimental Cell Research*. 90(2): 411-428.
- De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C. 2006. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. 66(8): 1994-2000.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2006. Encuesta Porcina 2006 - 2007. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. [En línea]. Consultada en Julio de 2009. Disponible en:

<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,106,O,S,0,MNU;E;27;6;MNU>

..

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2010. Anuario Estadístico Agropecuario 2010. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. [En línea]. Consultada en Marzo de 2011. Disponible en:

<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,352,O,S,0,MNU;E;27;6;MNU>

..

Evenson DP, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 15: 979-01.

Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálbez A, Gosálvez J. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*. 65(2): 308-316.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. 23(1): 25-43.

Evenson DP, Thompson L, Jost L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 41(3): 637-651.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, La Frombroise M, De Jonge C. 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*. 84(4):833-842.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. 2003. The

Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*. 24(1): 59-66.

First NL, Short RE, Peters JB, Stratman FW. 1968. Transport and Loss of Boar Spermatozoa in the Reproductive Tract of the Sow. *Journal of Animal Science*. 27(4): 1037-1040.

Fraser L, Strzezek J. 2007a. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*. 68(2): 248-257.

Fraser L, Strzezek J. 2007b. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*. 99(3-4): 317-329.

Fraser L, Dziekonska A, Strzezek R, Strzezek J. 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*. 67(5): 994-1003.

Fraser y Strzezek. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 °C and 16 °C. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 42(1): 499-55.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 63(2): 431-444.

García-Contreras A, De Loera Y, García-Artiga C, Palombo A, Guvara JA, Herrera-Haro J, López-Fernández C. 2011. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*. 31(4): 570-573.

- Gliozzi TM, Zaniboni L, Cerolini S. 2011. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*. 75(9): 1613-1622.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF. 2011a. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology*. 75(2):206-211.
- Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, Moreno JF. 2011b. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*. 75(2): 197-205.
- Gosálvez BJ, Caballero PP, López-Fernández C, Fernández JL, Núñez Calonge R. 2008. Fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*. 6(3): 193-209.
- Gosálvez J, Fernández JL, Gosalbez A, Arrollo F, Agarwal A, Lopez-Fernandez. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertility and Sterility*. 88 (1):S365.
- Gundogan M, Yeni D, Avdatek F, Fidan AF. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 122(3-4): 200-207.
- Halliwell B, Auroma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies*. 281(1-2): 9-19.
- Hawk HW. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science*. 66(12): 2645-2660.

- Hunter RHF, Nichol R. 1986. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *Journal of Reproduction and Fertility*. 77(2): 599 -606.
- Hunter RHF. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72(1): 203 -211.
- Hunter RHF. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63(1): 109 -117.
- Imrat P, Hernandez M, Rittem S, Thongtip N, Mahasawangkul S, Gosálvez J, Holt WV. 2012. The dynamics of sperm DNA stability in Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa before and after cryopreservation. *Theriogenology*. 77(5): 998-1007.
- Jiwakanon J, Persson E, Berg M, Dalin AM. 2011. Influence of seminal plasma, spermatozoa and semen extender on cytokine expression in the porcine endometrium after insemination. *Animal Reproductive Science*. 123(3-4):210-20.
- Kaczmarek MM, Krawczynski K, Blitek A, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ. 2010. Seminal plasma affects prostaglandin synthesis in the porcine oviduct. *Theriogenology*. 74(7): 1207-1220.
- Kasimanickam R, Nebel RL, Peeler ID, Silvia WL, Wolf KT, McAllister AJ, Cassell BG. 2006a. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*. 66(5): 1307-1315.
- Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD. 2006b. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs.

Theriogenology. 65(7): 1407-1421.

Khalifa TAA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou T. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4): 143-163.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*. 15(8): 1717 -1722.

Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G. 2008. DNA Damage Response During Chromatin Remodeling in Elongating Spermatids of Mice. *Biology of Reproduction*. 78(2): 324 -332.

López-Fernández C, Johnston SD, Fernández JL, Wilson RJ, Gosálvez J. 2010. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology*. 74(8): 1362-1370.

López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J. 2008a. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram. *Theriogenology*. 70(6): 898-908.

López-Fernández C, Pérez-Llano B, García-Casado P, Sala R, Gosálbez A, Arroyo F, Fernández JL, Gosálvez J. 2008b. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science*. 103(1-2): 87-98.

López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*. 68(9): 1240-1250.

Love CC. 2005. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications.

- Animal Reproduction Science. 89(1-4): 39-45.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*. 63(6): 1584-1591.
- Love CC, Thompson J, Lowry V, Varner D. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*. 57(3): 1135-1142.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. 2001. The Relationship Between Chromatin Quality and Fertility of Chilled Stallion Sperm. *IVIS.org Proceedings of the Annual Convention of the AAP*. 47: 229-231.
- Love C, Kenney R. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*. 50(6): 955-972.
- McPherson SMG, Longo FJ. 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermiogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular reproduction and Development*. 31: 268-79
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel Hafez MA, Thomas AJ, Agarwal A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19(1): 129 -138.
- O'Brien J, Zini A. 2005. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology*. 65(1): 16-22.
- O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA. 2004. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and

embryo development in the pig. *Reproduction*. 128(2): 237 -247.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharman RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Alvarez JG, Alvarez Jr. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stage of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction*. 16(9): 1912-1921.

Peregrín PC, Calogne RN, Ortega-López L, Pérez-Gutierrez LM, López-Fernández C, Gosálvez JB. 2008. Dinámica diferencial de la fragmentación del ADN en espermatozoides capacitados y no capacitados: un análisis prospectivo. *Reivista Internacional de Andrología*. 6(3): 186-192.

Pérez-Llano B, López-Fernández C, García-Casado P, Arroyo F, Gosalbez A, Sala R, Gosálvez J. 2010. Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: Ejaculate and temperature effects. *Animal Reproduction Science*. 119(3-4): 235-243.

Pérez-Llano B, Enciso M, García-Casado P, Sala R, Gosálvez J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*. 66(9): 2137-2143.

Portas T, Johnston SD, Hermes R, Arroyo F, López-Fernandez C, Bryant B, Hildebrandt TB, Göritz F, Gosalvez J. 2009. Frozen-thawed rhinoceros sperm exhibit DNA damage shortly after thawing when assessed by the sperm chromatin dispersion assay. *Theriogenology*. 72(5): 711-720.

Rigby JP. 1966. The persistence of spermatozoa at the uterotubal junction of the sow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11(1): 153-155.

Robertson SA. 2007. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: Lessons from rodents and pigs. *Journal of Animal Science*. 85(13): E36-E44.

- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Sanz L. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. 63(2): 514-535.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. 2002. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis. *Biology of Reproduction*. 66(4): 1061-1067.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. 4(1): 31-37.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65(5): 958-978.
- Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Osuna JA, Gómez R, Regadera J. 2005. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 3(3):12-19.
- Waberski D, Döhring A, Ardón F, Ritter N, Zerbe H, Schuberth H-J, Hewicker M, Weitze K, Hunter RHF. 2006. Physiological routes from intra-uterine seminal contents to advancement of ovulation. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 48:13.
- Ward WS. 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*. 16(1): 30 -36.
- Ward WS, Coffey DS. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*. 44(4): 569 -574.