

# DAÑOS EN EL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

Víctor J. Atencio García

Departamento de Ciencias Acuícolas/FMVZ

Instituto de Investigaciones Piscícolas CINPIC, Universidad de Córdoba, Colombia

## RESUMEN

La crioconservación de semen es una herramienta para mejorar la producción de alevinos, atendiendo la demanda de semen y simplificando la reproducción en cautiverio; sin embargo, la crioconservación ocasiona daños a las células espermáticas por el estrés tóxico y osmótico ocasionado por la exposición a los crioprotectores y por los choques térmicos que sufre durante la congelación y descongelación. La magnitud de los daños criogénicos, en el proceso de crioconservación puede resultar en la disminución de la movilidad, velocidad espermática y capacidad fertilizante del semen crioconservado; por lo que el objetivo de esta conferencia es discutir los principales daños que sufre la célula espermática durante el proceso de crioconservación-descongelación, así como referenciar algunos de los métodos de evaluación de los daños que sufre la célula espermática durante la dilución (precongelación), congelación y descongelación.

## Introducción

La crioconservación de semen es un método seguro para almacenar y conservar material genético (Cabrita et al., 2014); cuyos beneficios permite el establecimiento de bancos de recursos genéticos, contribuye a la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Bobe & Labbé, 2010) y ha permitido el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida de varias especies animales (Fabbrocini et al., 2000). En la piscicultura podría ser una herramienta tecnológica para mejorar la producción de alevinos, atendiendo la demanda de semen y simplificando la reproducción en cautiverio; sin embargo, la crioconservación ocasiona daños en las células espermáticas por el estrés tóxico y osmótico ocasionado por la exposición a los crioprotectores y por los choques térmicos que sufre en el proceso de congelación y descongelación. La magnitud de los daños criogénicos, durante el proceso de crioconservación puede resultar en la disminución de la movilidad, velocidad espermática y capacidad fertilizante del semen crioconservado-descongelado.

La dilución del espermatozoides en las soluciones crioprotectoras así como las curvas de congelación y descongelación producen cambios en la célula espermática que deterioran su calidad. Los cambios en la osmolaridad externa provocan daños en la estructura y funcionalidad celular, ya que generalmente el choque hiperosmótico induce alteraciones en el tamaño de las células (Morisawa, 1994). Morris et al. (2012) afirmaron que el daño celular cuando se utilizan tasas lentas de congelación se relaciona con la exposición y la eliminación de las condiciones hipertónicas ocasionada por los crioprotectores y consideraron que un aumento en la tasa de congelación reduce al mínimo el tiempo de exposición del semen a los crioprotectores y por tanto se esperaría una disminución del daño ocasionado por el desequilibrio osmótico. El objetivo de esta conferencia es discutir los principales daños que sufre la célula espermática durante el proceso de

crioconservación-descongelación así como referenciar algunos de los métodos de evaluación de los daños a los organelos de la célula espermática.

### **Calidad espermática**

La movilidad espermática es el atributo más comúnmente usado para evaluar la calidad del espermatozoide, es una variable de calidad integradora junto con los componentes celulares responsables de la activación y sostenibilidad de la movilidad del espermatozoide (Bobe & Labbé, 2010); sin embargo, puede no ser bien correlacionada con la capacidad fecundante del semen (Gwo et al., 1991). Generalmente la crioconservación influye en la disminución de la movilidad, tiempo de activación y estimula el aumento de movimientos circulares (Lahnsteiner et al., 2000; Wamecke & Pluta, 2003). Conocer los daños en las estructuras celulares del espermatozoide ayudaría a explicar el descenso de la movilidad y por ende de la fertilidad. Se ha reportado que los daños en la mitocondria están asociados a la disminución de la movilidad (Fraser & Strzezek, 2007); pero también se ha encontrado que semen con alto grado de daños a nivel del DNA nuclear registra una marcada disminución de la movilidad y velocidad espermática posdescongelación (Li et al., 2008).

La viabilidad de las células, definida como las células con membrana plasmática intacta y función mitocondrial, han sido seleccionados como indicadores para la evaluación de la calidad espermática en peces, especialmente para la crioconservación del esperma, cuya membrana plasmática y mitocondrial pueden ser dañadas durante el proceso de crioconservación.

La estimación de la calidad del espermatozoide de peces ha sido determinada tradicionalmente usando técnicas manuales, subjetivas, evaluando la movilidad y la densidad espermática, pero éstas consumen tiempo y los resultados son muy variables (Van Look & Kime, 2004). En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos para la evaluación de la calidad espermática a través de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides, la integridad de la membrana y las funciones mitocondriales (Asturiano et al., 2005; Marco-Jiménez et al., 2006a, 2006b). Estas nuevas técnicas pueden usarse para evaluar la calidad del semen en fresco o para distinguir cambios producidos en su morfología debidos a la dilución (precongelación), congelación o descongelación (Billard et al., 2000; Vladic et al., 2002). La evaluación de la calidad espermática mediante el uso de tinciones fluorescentes en conjunto con la citometría de flujo es relativamente nuevo, en especies acuáticas cada vez tiene mayor relevancia; relevancia, porque permite la detección rápida de una gran número de células en una muestra, para detectar los cambios estructurales o funcionales de las mismas lo cual proporciona un método objetivo de evaluación de la calidad espermática (Daly & Tiersch, 2012).

### **Daños en membrana espermática y mitocondrias**

En el proceso de crioconservación la membrana plasmática es la primera estructura en ser afectada por los cambios en la composición química o temperatura del medio y se sugiere que la resistencia del espermatozoide a la congelación y toxicidad del medio es influenciada por la composición química de lípidos y proteínas que constituyen la membrana (Farkas et al., 2001; Muchlisin et al., 2009); siendo la membrana plasmática una estructura importante en la activación de la movilidad (Bobe & Labbé et al., 2010). La morfología e integridad de las mitocondrias también se consideran factores clave en la funcionalidad del espermatozoide y su daño disminuye la movilidad de las

células así como los niveles de ATP después de la congelación y descongelación (Cabrita et al., 2005 a; Figueroa et al., 2013).

El estrés oxidativo se considera como una de las principales causas del daño mitocondrial (Cabrita et al., 2010), debido a que promueve la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales afectan la eficiencia respiratoria mitocondrial (Ferramosca et al., 2013). Otra posible causa del daño mitocondrial son los cambios morfológicos ocurridos en la pieza media del espermatozoide que afectan la pérdida de la envoltura densa de las mitocondrias (Yao et al., 2000). La pérdida de la funcionalidad mitocondrial reduce el potencial de la membrana mitocondrial ocasionando pérdida de la movilidad y velocidad espermática.

La integridad de la membrana y la función mitocondrial en semen fresco y crioconservado son evaluadas con el fin de determinar el éxito de los protocolos de crioconservación (Daly & Tiersch, 2012). Entre los métodos más usados para investigar y determinar los daños ultraestructurales, especialmente en membrana plasmática de células espermáticas, ha sido la microscopía electrónica de barrido (scanning); la cual proporciona información detallada de la estructura ultracelular y ayuda a establecer los cambios morfológicos que acontecen en los procesos de crioconservación (Yao et al., 2000; Taddei et al., 2001). Otro método es la tinción de fluorescencia en conjunto con la citometría de flujo; la cual es recomendada para proporcionar una valoración rápida de la integridad de la membrana plasmática y la función mitocondrial en espermatozoide crioconservado de peces (Ogier-De Baulny et al., 1999; Segovia et al., 1999). Entre los colorantes más utilizados para la evaluación de la actividad mitocondrial está la Rhodamina 123, el cual requiere ser removido, lo cual implica tiempo consumido y daño mecánico; otro colorante poco usado para espermatozoide de peces es el yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3)) este colorante se incorpora en la mitocondria por el potencial transmembrana mitocondrial (Shapiro, 1994). Los colorantes anteriormente mencionados usualmente son combinados con Ioduro de Propidio (IP) para detectar daños en la membrana espermática, el cual es incapaz de pasar a través de una membrana plasmática normal pero puede penetrar una membrana plasmática cuya estructura se encuentre alterada (Darziynkinkiewicz et al., 1984) y de esta manera predecir los efectos de la crioconservación sobre la sobrevivencia espermática y la capacidad fecundante (Daly & Tiersch, 2012).

### **Fragmentación del DNA**

El daño a la integridad o fragmentación del DNA se entiende como las anomalías que sufre la estructura de la cromatina espermática debido a las diversas condiciones ambientales a las cuales la célula está sometida (Zilli et al., 2003). La integridad del DNA espermático está asociado al éxito de la fertilización, al desarrollo normal de los embriones resultantes o su descendencia (Lopes et al., 1998); lo cual sugiere que la fragmentación del DNA es una característica asociada al fracaso o al éxito de la fertilización (Sakkas et al., 2002; Sergerie et al., 2005; Li et al., 2008) y por tanto del proceso de crioconservación. Algunos estudios reportan que los daños en el DNA pueden ser respuesta a la oxidación y a eventos mecánicos (Box et al., 2001; Pérez-Cerezales et al., 2009); estudios con semen de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* demuestran un significativo incremento en la fragmentación del DNA después de la crioconservación, sugiriendo que la oxidación de bases específicas pueden ocurrir durante el proceso de crioconservación (Cabrita et al., 2005b; Pérez-Cerezales et al., 2009). La fragmentación del DNA por la generación de ROS (estrés oxidativo), se sugiere como consecuencia de la modificación de las histonas presentes en el

DNA (Ziech et al., 2011; Chervona & Costa, 2012). Las bases nitrogenadas del DNA, en particular guanina, son el principal objetivo de ataque de las ROS, generando 8-hidroxy,2'-deoxyguanosina (8OHdG); esta reacción debilita el enlace entre la guanina y la unidad de ribosa adyacente, produciendo la pérdida de la base oxidada, desestabilizando la estructura del DNA y resultando en la fragmentación de las cadenas (Cabrita et al., 2014). La fragmentación del DNA tiene efectos importantes en el desarrollo embrionario inicial más que en la fertilización, en virtud de su papel en el control de la expresión génica en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Carrell & Hammoud, 2010; Delbés et al., 2010; Ward, 2010).

Para reducir las modificaciones de la cromatina, se deben tener en cuenta dos aspectos; la evaluación de las posibles diferencias de resistencia al daño entre las muestras de semen y la utilización de métodos de congelación y descongelación menos dañinos. Se ha comprobado que las muestras de semen criopreservado poseen diferentes susceptibilidades al daño de la membrana y por lo tanto la elección de muestras de semen más resistentes resulta en mayor calidad después de la criopreservación (Cabrita et al., 1998); lo mismo sucede con el daño del DNA, por eso se sugiere que el periodo de recolección del esperma se realice dentro de la temporada reproductiva, ya que este es uno de los factores que podrían afectar el éxito de la criopreservación. Generalmente es reconocido que el semen producido a la mitad de la temporada proporciona las muestras más apropiadas para criopreservación (Billar & Zhang, 2001; Kopeika et al., 2007) y se ha sugerido la adición de antioxidantes al diluyente para reducir la oxidación, pero los resultados no parecen evitar completamente la fragmentación de la cromatina (Pérez-Cereales et al., 2010).

Existen diferentes métodos para evaluar la fragmentación del DNA, algunas se basan en la electroforesis, otras en la citometría de flujo, y también existen otras que se basan en el uso de pruebas de fluorescencia que pueden ser analizadas por citometría de flujo o citometría de fluorescencia asistida por computador (Cordelli et al., 2005). Entre estas pruebas se encuentra el ensayo cometa o electroforesis en gel de una sola célula (SCGE por sus siglas en inglés), la cual es muy sensible para la detección del rompimiento de las cadenas de DNA en células individuales (Tice et al., 2000). La prueba tipo TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling), cuantifica la incorporación de una etiqueta de trifosfato de desoxiuridina (dUTP) y sitios de rompimiento del DNA en una reacción catalizada por la enzima desoxinucleotidil transferasa (Gorczyca et al., 1993; Muratori et al., 2000, Cabrita et al., 2011) esta prueba puede ser cuantificada por citometría de flujo, microscopía de fluorescencia o microscopía de luz. Una técnica que ha incrementado de manera notable su uso en la última década para la evaluación de la calidad espermática en especies acuáticas es la tinción fluorescente y citometría de flujo (Ogier de Baulny et al., 1997; Liu et al., 2007; Guthrie et al., 2008), esta prueba tiene el propósito de medir las anomalías de la condensación de la cromatina usando diferentes colorantes específicos del DNA como DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole) (Spanó et al., 1984), bromuro de etidio/mitramicina (Engh et al., 1992) e yoduro de propidio (Molina et al., 1995), esta técnica ha permitido demostrar la relación entre la capacidad fertilizante y el incremento de la fracción de espermatozoides anormales (Hacker-Klom et al., 1999; Filatov et al., 1999). En este método Dali & Tiersch (2012) señalaron que los resultados pueden ser sub o sobreestimados por la lectura de eventos no espermáticos como células diploides; debido a la contaminación de las muestras en la obtención del semen, especialmente cuando el semen es extraído por disección y posterior maceración testicular; considerándose de mucha importancia para la objetividad de este método, separar los eventos espermáticos de los no espermáticos en la preparación de la muestra.

En general se puede concluir que la célula espermática sufre importantes daños tanto en la dilución con los crioprotectores, curvas de congelación y descongelación que afectan su morfología, movilidad y en últimas su capacidad fertilizante. La estimación de los daños y sus posibles causas son un gran reto para el desarrollo de protocolos de crioconservación más efectivos para la industria piscícola.

## **Bibliografía**

- Asturiano J, Pérez L, Garzón D, Peñaranda D, Marco-Jiménez F, Martínez-Llorens S, Tomas A, Jover M. Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquaculture Research* 2005; 36: 1480-1487.
- Billard R, Cosson J, Linhart O. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research* 2000; 31: 283-287.
- Billard R, Zhang T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: Watson P, Holt editors. W.V. Cryobanking the genetic resource Wildlife conservation for the future? Taylor and Francis: 2001; 145-70.
- Bobé J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinology* 2010; 165(3): 535- 548.
- Box H, Dawidzik J, Budzinski E. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radical Biol and Med* 2001; 31:856-68.
- Cabrera E, Álvarez R, Anel L, Rana K, Herráez M. Sublethal damage during cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. *Cryobiology* 1998; 37: 245-253.
- Cabrera E, Martínez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarce DG, Sarasquete C, Herráez MP, Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 2014; 389-401.DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.04.034.
- Cabrera E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml microtubes. *Cryobiology* 2005a; 50:273-284.
- Cabrera E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005b; 50: 144 -153.
- Cabrera E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol* 2010; 26: 623-635
- Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 37-47.
- Chervona Y, Costa M. The control of histone methylation and gene expression by oxidative stress, hypoxia, and metals. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53: 1041-1047.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spanó M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 2005; 72: 273-279
- Daly J, Tiersch T. Sources of variation in flow cytometric analysis of aquatic species sperm: The effect of cryoprotectants on flow cytometry scatter plots and subsequent population gating. *Aquaculture* 2012; 370-371: 179-188.
- Darziynkinkiewicz Z, Traganos F, Kapuscinski J, Staiano-Coco L, Melamed R. Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* 1984; 5: 355-63.

Delbès C, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 14–22.

Engh E, Clausen O, Scholberg A, Tollefsrud A, Purvis K. Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. *Int J Androl* 1992; 15: 407–415.

Fabbrocini A, Lubrano S, Rispoli S, Sansone G. Criopreservation of seabream (*Spaurus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 2000; 40(1):46-53.

Farkas T, Fodor E, Kitajka K, Halver JE. Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research* 2001; 32:645–655.

Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology* 2013; 82: 78–83.

Figueroa E, Risopatrón J, Sánchez R, Isachenko E, Merino O, Isachenko V, Valdebenito I. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 2013; 372–375: 119-126.

Filatov M, Semenova E, Vorob'eva O, Leont'eva O, Drobchenko E. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 825–830.

Fraser L, Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci.* 2007; 99: 317- 329

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res* 1993; 53: 1945–1951.

Guthrie H, Woods L, Long J, Welch G. Effects of osmolality on inner mitochondrial transmembrane potential and ATP content in spermatozoa recovered from the testes of striped bass (*Morone saxatilis*). *Theriogenology* 2008; 69: 1007–1012.

Gwo J, Strawn K, Longnecker M, Arnold C. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 1991; 94:335-375.

Hacker-Klom U, Gohde W, Nieschlag E, Behre H. DNA flow cytometry of human semen. *Hum Reprod* 1999; 14: 2506–12.

Kopeika E, Kopeika J, Zhang T. Cryopreservation of fish sperm. *Methods Mol Biol* 2007; 368: 203–17.

Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B, Weismann T. Cryopresevation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 2000; 54: 1477- 1496.

Li P, Wei Q, Liu L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. *J Appl Ichthyol.* 2008; 24:121-125.

Liu Q, Li J, Zhang S, Xiao Z, Ding F, Yu D, Xu X. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology* 2007; 67:1168- 1174.

Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in a cytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528–532.

Marco-Jiménez F, Garzón D, Peñaranda D, Pérez L, Viudes-de-Castro M, Vicente J, Asturiano J. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology* 2006a; 53: 51-57.

Marco-Jiménez F, Pérez L, Viudes-de-Castro M, Garzón D, Peñaranda D, Vicente J, Jover M, Asturiano J. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* 2006b; 65: 1302-1310.

Molina J, Castilla J, Gil T, Hortas M, Vergara F, Herruzo A. Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod* 1995; 10: 1280–1286.

Morisawa M. Cell signaling mechanism for sperm motility. *Zoo Sci* 1994; 11: 647-662.

Morris G, Acton E, Murray J, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology* 2012; 64: 71– 80.

Muchlisin ZA, Siti Azizah MN. Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. *Cryobiology* 2009; 58:166–169.

Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21: 903–912.

Ogier-De Baulny B, Labbé C, Maisse G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectans. *Cryobiology* 1999; 39:177-184.

Ogier-De Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 1997; 34: 141-149.

Pérez-Cerezales S, Martínez- Páramo S, Beirão J, Herráez M. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*, 2010; 74: 282–289.

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, De Paz P, Herráez M. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology* 2009; 71: 605–613.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi G, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod* 2002; 66: 1061–1070.

Segovia M, Jenkins J, Paniagua-Chavez C, Tiersch T. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia, *Theriogenology* 1999; 53: 1489-1499.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum. Reprod* 2005; 20: 3446-3451.

Shapiro H. Cell membrane potential analysis. In: Darzynkiewicz, Z., Robinson, J., Crissman, H. (Eds.), *Flow Cytometry*. Academic Press, San Diego, 1994; p121.

Spanó M, Calugi A, Capuano V, et al. Andrological sperm analysis by flow cytometry and sizing. *Andrologia* 1984; 16: 367–375.

Taddei A, Barbato F, Abelli L, Canese S, Moretti F, Rana K, Fausto A, Mazzini M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untrated, preefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazo* (Cetti). *Cryobiology* 2001; 42: 244-255.

Tice R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206-221.

Van Look K, Kime D. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology* 2004; 63: 1020-1033.

Vladic T, Afzelius B, Bronnikov G. Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biol. Reprod* 2002; 66: 98-105.

Ward SW. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 30–36

Warnecke D, Pluta H. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L) sperm using dimetil-acetamida as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 2003; 187: 361-375.

Yao Z, Crim L, Richardson G, Emerson C. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture* 2000; 181: 361-375.

Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis M. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2011; 711: 167–173.

Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *J. Cryobiology* 2003; 47: 227- 235.