

## **ESTUDIOS ULTRAMICROSCÓPICOS DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES FELINOS CONGELADOS-DESCONGELADOS CON DISTINTOS DILUYENTES**

María Candela Bonauro<sup>1,2</sup>, María Carla García Mitacek<sup>1,2</sup>, Romina Nuñez Favre<sup>1,2</sup>, Susana Jurado<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina (CP 1900), <sup>2</sup>CONICET, CABA, Capital Federal, Argentina; <sup>3</sup>Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. [bonaura874@hotmail.com](mailto:bonaura874@hotmail.com)

### **Resumen**

La recuperación de espermatozoides epididimales (EE) y la criopreservación espermática son herramientas de gran importancia para utilizar en animales en vías de extinción. La introducción de modificaciones en los protocolos de congelación de espermatozoides felinos (EF) podría mejorar la supervivencia de los mismos al descongelado. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en los EF congelados-descongelados y caracterizar el tipo de daño según el diluyente utilizado. Se utilizaron felinos (n=64) mestizos, sanos. Luego de la orquiectomía, se realizó la recuperación de los EE y pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*. Para realizar la congelación de los EE se diseñaron 4 experimentos en los que se utilizaron diferentes diluyentes. Un diluyente (DIL) Tris, un DIL con agregado de Trealosa (TREA), un DIL con agregado de Dimetilformamida (DMF), un DIL con agregado de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) y un DIL con agregado de TREA-SDS. Se realizó el estudio ultraestructural de los EE frescos y congelados-descongelados de cada uno de los diluyentes. En nuestro estudio se pudieron detectar daños ultramicroscópicos generados durante el proceso de congelación-descongelación en los EF. Se pudo observar una tendencia a proteger las

cabezas de los EE criopreservados con los DIL que contenían TREA, SDS y TREA+SDS al compararlos con aquellos diluyentes que no los contenían o que estuvieron compuestos por DMF. Concluimos que el proceso de congelación-descongelación genera daños ultramicroscópicos que pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides y esos daños podrían relacionarse con el DIL formulado para la criopreservación.

**Palabras claves:** gato, espermatozoides, criopreservación, ultramicroscopía.

## **Introducción**

La recuperación de espermatozoides epididimales (EE) y criopreservación espermática son herramientas de gran potencial para preservar material genético. Es así que la recuperación de EE ofrece un material sumamente valioso a la hora de conservar material genético de un individuo que ha sufrido muerte súbita o debe someterse a orquiectomía. Sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos del proceso sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (Watson, 1995; Mazur y col., 1970; Parks y Lynch, 1992). La evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy ventajosa ya que provee información detallada sobre la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Si bien las pruebas rutinarias de contrastación seminal brindan información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides de una muestra, estas no ofrecen información completa sobre el potencial fertilizante del material seminal (Jurado y col., 2008; Dunphy y col., 1989). La motilidad y morfología espermática evaluadas mediante microscopía óptica, son indicadores aproximados de la capacidad fertilizante de ese semen; sin embargo, un daño a nivel subcelular puede afectar la fertilidad sin modificar la motilidad espermática o la morfología espermática observable al microscopio óptico (Blottner y col., 2001). De esta forma, células

espermáticas morfológicamente normales al microscopio óptico pueden presentar alteraciones estructurales que solo serían detectables al microscopio electrónico (Tasseron y col., 1977). El estudio de la ultraestructura espermática nos brinda información detallada sobre la integridad del espermatozoide pudiendo ser una herramienta de gran utilidad en la detección de alteraciones estructurales que interfieren en el proceso de fecundación. Esta información posibilita precisar la fertilidad del semen evaluado con mayor exactitud que otras pruebas de análisis de semen *in vitro* (Jurado y col., 2008).

La microscopía electrónica ha sido utilizada en humanos para la detección de malformaciones espermáticas y permite evaluar alteraciones que causan infertilidad en los mismos (Baccetti y col., 1995; Baccetti y col., 2002). En animales, la microscopía electrónica ha sido utilizada como una herramienta para el estudio morfológico de la célula espermática (Holt y col., 1998; Alvarenga y col., 2000; Jones y Stewart, 1979). En caninos el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio electrónico de transmisión (MET) han permitido identificar anomalías espermáticas en el semen fresco, así como algunos de los daños ocurridos durante el proceso de congelación-descongelación del semen criopreservado (Holt y col., 1998; Jurado y col., 2008). Para establecer el grado de daño asociado al proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides, el examen morfológico estructural y ultraestructural es de vital importancia, y permite detectar defectos a nivel de cabeza, pieza media y cola (Hammerstedt y col., 1990; Parks y Graham, 1992; Jurado y col., 2008). El MET es la herramienta más eficaz al momento de detectar daños submicroscópicos y la localización de los mismos luego de realizar algún tratamiento (Jurado y col., 2008; Ozkavukcu y col., 2008; Plummer y Watson, 1988; Reichart y col., 2000). El estudio ultraestructural del semen congelado-descongelado permite observar no solo la ocurrencia del daño celular sino también la estructura afectada estimando de esa manera el impacto protector de los diluyentes (Jurado y col., 2008; Savignone y col., 2008).

En la especie felina existe una gran variabilidad individual en los parámetros seminales, particularidad que influye en la calidad y capacidad fecundante del semen. A pesar de los avances en la microscopía electrónica de transmisión, son escasos los trabajos que estudian el espermatozoide en esta especie (Long y col., 1996; Pukazhenthil y col., 1999; Tebet y col., 2006). Debido a que aún no se encuentran estandarizados los protocolos de congelación para la preservación de espermatozoides felinos (EF), la utilización de la microscopía electrónica podría brindar datos que permitan mejorar los protocolos de congelación con el consecuente aumento de la supervivencia espermática al descongelado. Por lo que el estudio ultramicroscópico adquiere significativo valor para evaluar el tipo y localización del daño para determinar el comportamiento de un DIL en los diferentes compartimentos celulares.

## **Objetivos**

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en los EF congelados-descongelados y caracterizar el tipo de daño según el diluyente utilizado. La hipótesis fue que los EF congelados-descongelados presentan alteraciones ultraestructurales relacionadas con la formulación del DIL utilizado.

## **Materiales y métodos**

Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron cuatro experimentos.

### **Experimento 1**

Se utilizaron felinos (n=15) mestizos, sanos, de entre 24 y 36 meses de edad, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual, aplicando un diseño aleatorio (Petersen, 1985). Los felinos utilizados fueron incluidos en

un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral, los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal se colocaron inmediatamente en solución fisiológica con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio (Slatter, 1993). Los EPI fueron procesados dentro de las 4 h posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron las colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostatzado a 37°C por 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los EE se realizó por cutting de la cola del epidídimo (Tittarelli y col., 2006).

Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostatzado a 37°C y sometidos a las siguientes pruebas de contrastación para comprobar que reúne condiciones mínimas para su procesamiento:

1) Concentración espermática (CE;  $10^6$ /ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (Johnston y col., 2001); 2) Motilidad individual (MI), una muestra de 10  $\mu$ l de los EE frescos se depositó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X. Se estimó, en varios campos, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Johnston y col., 2001); 3) Vigor (VI, escala 1-5), se depositó 10  $\mu$ l de la muestra de los EE frescos en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X. Se estimó, en varios campos, el tipo de movimiento individual (Johnston y col., 2001; Axner y col., 1998); 4) Morfología espermática (ME; % de espermatozoides normales), se observaron 100 espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur (Axner y col., 1998); 5) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (Mendoza y col., 1992). Se observaron

100 acrosomas a 1000 X; 6) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP; Harrison y Vickers, 1990). Se observaron 100 espermatozoides 1000 X.

Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes. Un DIL Tris y un DIL con agregado de 0,312% Trealosa (TREA). Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes descritos para obtener una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego de un tiempo de equilibración los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados en vapores de Nitrógeno líquido (Bonauro, 2016). La descongelación se realizó a 37°C durante 1 minuto (Bonauro, 2016).

## **Experimento 2**

Se utilizaron felinos (n=16) para la obtención de los EE. Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes. Un DIL Tris y un DIL con agregado de 0,5% de DMF y 4,5% de glicerol. Los EE fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación y proceso descritos para el experimento 1.

## **Experimento 3**

Se utilizaron felinos (n=15) para la obtención de los EE. Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes. Un DIL Tris y un DIL con agregado de 0,25% de SDS. Los EE fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación y proceso descritos para el experimento 1.

## **Experimento 4**

Se utilizaron felinos (n=18) para la obtención de los EE. Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes (n=2) diferentes. Un DIL Tris y un DIL con agregado de 0,312% de TREA y 0,25% de SDS. Los EE fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación y proceso descriptos para el experimento 1.

### ***Estudio ultraestructural***

Se realizó el estudio ultraestructural de los EE frescos y los EE congelados-descongelados en los distintos diluyentes utilizados en cada uno de los experimentos con el fin de estudiar los cambios que provocan los procesos de congelación-descongelación sobre la célula espermática en relación al DIL utilizado.

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 h a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 h a 4°C y posteriormente, los espermatozoides se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina Epoxi (Jurado y col., 2008). Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estas muestras se examinaron con un JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Se evaluaron un mínimo de 100 cabezas y 100 colas.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante ANOVA con PROC GLM de SAS<sup>®</sup> (SAS, 2003).

### **Marco bioético del uso de animales**

Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y utilizando las recomendaciones de la Academia de Ciencias de EEUU referidas al uso de felinos como animales de laboratorio (National Research Council, 2002). Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras de sangre y procedimientos experimentales (National Research Council, 2002). Además contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV-UNLP (26-4-12).

## **Resultados y discusión**

A nivel ultraestructural el  $83,5 \pm 9,59\%$  de las colas de los EE frescos y el  $58,8 \pm 5,66\%$  de las cabezas mostraron morfología normal (Figura 1).

En todos los experimentos, el porcentaje de EE sin daños ultramicroscópicos fue significativamente mayor tanto en las cabezas como en las colas de los EE frescos en comparación con los EE congelados-descongelados (Gráficos 1.1 y 1.2). Las alteraciones ultraestructurales observadas en las muestras de EE congelados-descongelados en los distintos DIL en cada uno de los experimentos fueron: membrana plasmática hinchada, membrana acrosomal hinchada, membranas plasmática y acrosomal hinchadas, formación de pliegues en la membrana plasmática y/o acrosomal, ruptura de la membrana plasmática y/o acrosomal, vesiculación en la membrana acrosomal externa y plasmática; y vacuolas mitocondriales (Figuras 2-4).

### **Experimento 1**

Se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides congelados con TREA **vs** el DIL TRIS ( $22,04 \pm 4,45$  **vs**  $18,33 \pm 3,69$  % de cabezas normales, respectivamente).

### **Experimento 2**

Se observó una tendencia a proteger más las colas de los espermatozoides congelados con el DIL TRIS **vs** el DIL con DMF ( $64,66 \pm 11,18$  **vs**  $52,8 \pm 5,39\%$  de colas normales, respectivamente).

### **Experimento 3**

Se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides congelados con el DIL SDS **vs** el DIL TRIS ( $28,58 \pm 5,47$  **vs**  $21,42 \pm 5,76\%$  de cabezas normales, respectivamente).

### **Experimento 4**

Se observó una tendencia a proteger tanto las cabezas como las colas de los espermatozoides congelados con el DIL TREA-SDS **vs** el DIL TRIS ( $24,18 \pm 3,94$  **vs**  $17,33 \pm 1,65$ ;  $53,55 \pm 6,99$  **vs**  $42,95 \pm 1,28\%$  de las cabezas y as colas normales, respectivamente).

Las alteraciones que se observaron con mayor frecuencia en la cabeza de los EE criopreservados fueron la membrana plasmática y acrosomal vesiculadas y la membrana plasmática rota. Mientras que en la cola los daños más frecuentemente observados fueron la membrana plasmática hinchada y la presencia de vacuolas en las mitocondrias.

El estudio ultramicroscópico nos permitió evaluar el grado de daño provocado por los procesos de congelación-descongelación sobre las células espermáticas felinas y sus estructuras, lo que concuerda con lo observado en otras especies como caninos, bovinos, ovinos, porcinos, chinchilla y humanos (Stornelli MA y col., 2004; Stornelli MA y col., 2007; Jones y Stewart, 1979; Quinn y col., 1969; Nath, 1972; Pedersen y Lebech, 1971; Healey, 1969). Además, nos permitió localizar los daños y demostrar que las principales alteraciones se observaron en la membrana plasmática, membrana acrosomal y en las mitocondrias, coincidiendo con los hallazgos de otros autores (Jurado y col., 2008; Rodriguez-Martinez y col., 1993; Ström y col., 1998; Silva y col., 2009). En concordancia con Ardrít y col., nuestras observaciones sugieren que la criopreservación induce también un daño en las mitocondrias, y que esto podría ser la causa de la disminución en la motilidad espermática al descongelado (Ardrít y col., 2006).

Nuestro estudio permitió también estimar la capacidad protectora de los DIL utilizados según la formulación de los mismos.

## **Conclusiones**

Para mantener el potencial fértil de los espermatozoides luego del proceso de criopreservación, es necesario mantener la integridad estructural y funcional de las membranas. Por lo tanto, los daños hallados en nuestro estudio podrían señalar que los espermatozoides criopreservados en los distintos experimentos poseen comprometida su capacidad fecundante. Sin embargo son necesarias pruebas de fertilidad para poder confirmarlo.

El estudio ultramicroscópico de los EF nos permitió observar alteraciones ultraestructurales que no se pueden detectar por métodos de evaluación seminal de rutina. Podemos concluir, que el estudio ultramicroscópico reveló un mayor porcentaje de alteraciones en los EF congelados-descongelados en comparación con los espermatozoides frescos, hecho que muestra que el proceso de criopreservación afecta a la célula espermática como ha sido demostrado en otras especies. Se observó una tendencia a proteger más las cabezas de los espermatozoides congelados con DIL TREA y con DIL SDS al compararlo con el DIL TRIS, así como una tendencia a proteger tanto las cabezas como las colas con el DIL TREA+SDS comparado con el DIL TRIS. El estudio de mayor número de muestras permitiría definir si esta tendencia marca un efecto protector del disacárido y/o el detergente sobre las estructuras arriba mencionadas. Los resultados obtenidos aportan valiosos datos que permiten avanzar en el estudio del proceso de criopreservación en el felino doméstico.

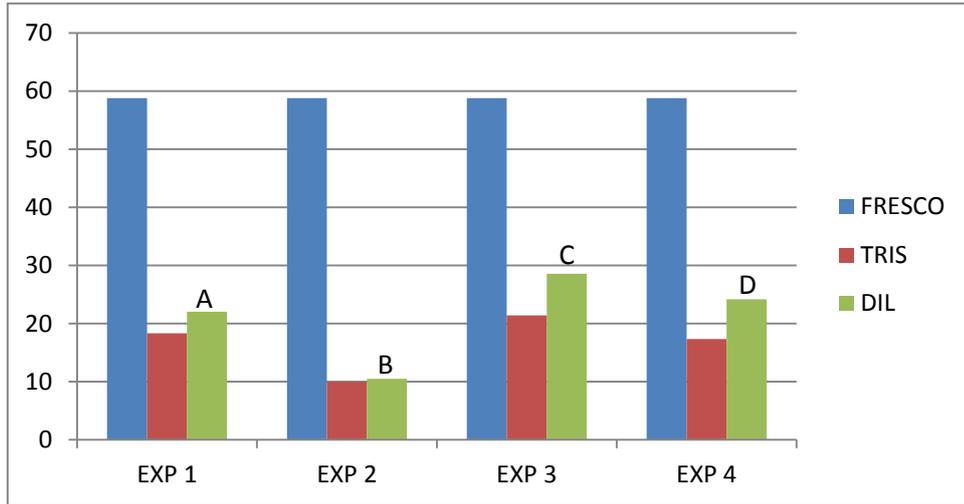
## **Bibliografía**

1. Alvarenga MA, Landim Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM.. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J* 2000; 32(6): 541-5.
2. Ardrit S, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T,
3. Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y. Pavasuthipaisit K, Pinyopummin K. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *International Journal Andrology* 2006; 29(2): 346-52.

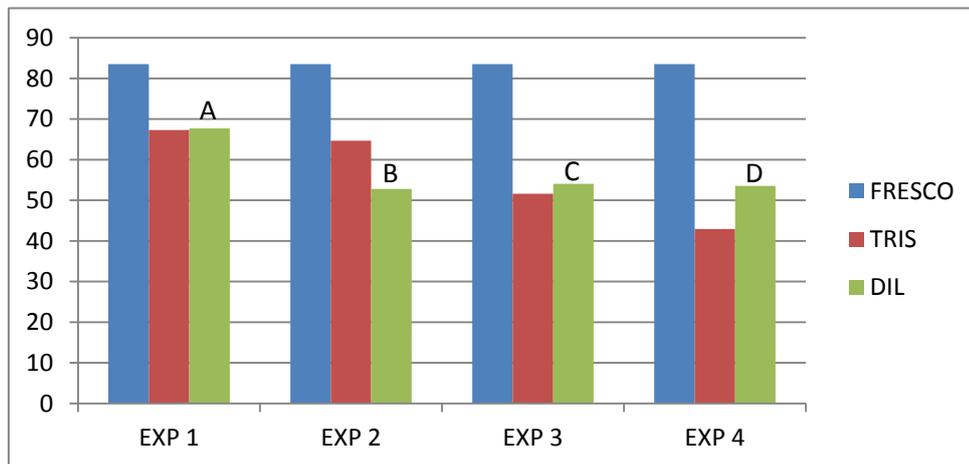
4. Axner E, Linde-Forsberg C. Mating and artificial insemination in domestic cats. En: Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology (eds) Simpson G., England GCW and Harvey MJ. Cheltenham: BSAVA, 1998; p. 105-11.
5. Baccetti B, Capitani G, Collodel E, Strehler E, Piomboni P. Recent advances in human sperm pathology. Contraception 2002; 65(4):283-7.
6. Baccetti B, Bernieri G, Burrini AG, Collodel G, Crisà N, Mirolli M, Moretti E, Piomboni P. Notulae seminologicae. 5. Mathematical evaluation of interdependent submicroscopic sperm alterations. J Androl 1995; 16(4):356-71.
7. Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. Anim Reprod Sci 2001; 65(1-2):75-88.
8. Bonaura M.C. Efecto de la adición de disacáridos, detergentes y amidas a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2016.
9. Dunphy BC, M Neal L, Cooke ID. The clinical value of conventional semen analysis. Fertil Steril 1989; 51(2):324-9.
10. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J Androl 1990; 11(1):73-88.
11. Harrison RAP, Vikers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fertil 1990; 88(1):343-52.
12. Healey P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. J Reprod Fertil 1969; 18(1):21-7.
13. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. J Exp Zool 1998; 246(3):305-14.
14. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. En: Canine and feline Theriogenology. WB Saunders. Philadelphia, 2001, p. 287-306.
15. Jones RC, Stewart DL. The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. J Repro Fertil 1979; 56(1):233-8.
16. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Analecta Veterinaria 2008; 28(1):7-14.
17. Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. Biol Reprod 1996; 54(3):638-46.
18. Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG, Smith LH. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. En: Ciba Foundation Symposium. The Frozen Cell. John Eiley y sons, Ltd. Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M. (Eds.), The Frozen Cell, Churchill, London, 1970, p 69-88.
19. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum agglutinin*. J Reprod Fertil 1992; 95(3):755-63.
20. Nath J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. Cryobiology 1972; 9(4):240-6.
21. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2da. Edición. México. Ed Lomelí, C. Estampa de artes gráficas, 2002.
22. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effect of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2008; 25(8):403-11.

23. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38(2):209-22.
24. Pedersen H, Lebech PE. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. *Fertil Steril* 1971; 22(2):125-33.
25. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985, p. 314.
26. Plummer JM, Watson PF. The qualitative ultrastructural assessment of head membrane damage in boar spermatozoa subjected to varying degrees of cold shock. *Anim Reprod Sci* 1988; 16:265-75.
27. Pukazhenthhi B, Pelican K, Wildt D, Howard J. Sensitivity of Domestic Cat (*Felis catus*) sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced Acrosomal Damage. *Biol Reprod* 1999; 61(1):135-41.
28. Quinn PJ, White LG, Cleland KW. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fert* 1969; 18:209-20.
29. Reichart M, Eltes F, Soffer Y, Zigenreich E, Yogev L, Bartoov B. *Andrología* 2000; 32:139-45.
30. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fert* 1993; 47: 279-85.
31. SAS®. **SAS and STAT User's Guide, Release 9.1.** SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2003.
32. Savignone CA, Jurado SB, Tittarelli CM, Reyna JC, Stornelli MC, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Efecto de la trealosa en la estabilización de membranas en espermatozoides caninos criopreservados. IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR Casilda, 2008, p. 214-5.
33. Silva A, Fontelle-Neto J, Cardoso R, Silva L, Chirinea V, Lopes M. Description of ultrastructural damage in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciencia Animal Brasileira* 2009; 10(2):595-601.
34. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2º ed. Philadelphia, 1993; p. 1325-35.
35. Stornelli MA, Jurado SB, Savignone CA, Sarmiento P, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL. Estudios microscópicos y ultramicroscópicos de semen canino fresco y congelado-descongelado con un diluyente tris base con el agregado de trealosa. *Acta Microscópica* 2007; p 194-5.
36. Stornelli MA, Savignone CA, Jurado S, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL. Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. *Cong Cs Morf.* 2004; p. 48.
37. Ström Hoist B, Rota A, Andersen-Berg K, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim* 1998; 33(2):77-82
38. Tasseron F, Amir D, Schindler H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fert* 1977; 51(2):461-2.
39. Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididimal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1629-32.
40. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli, MA, de la Sota RL. Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 2006; 66(6-7):1637-40.
41. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 1995; 7(4):871-91.

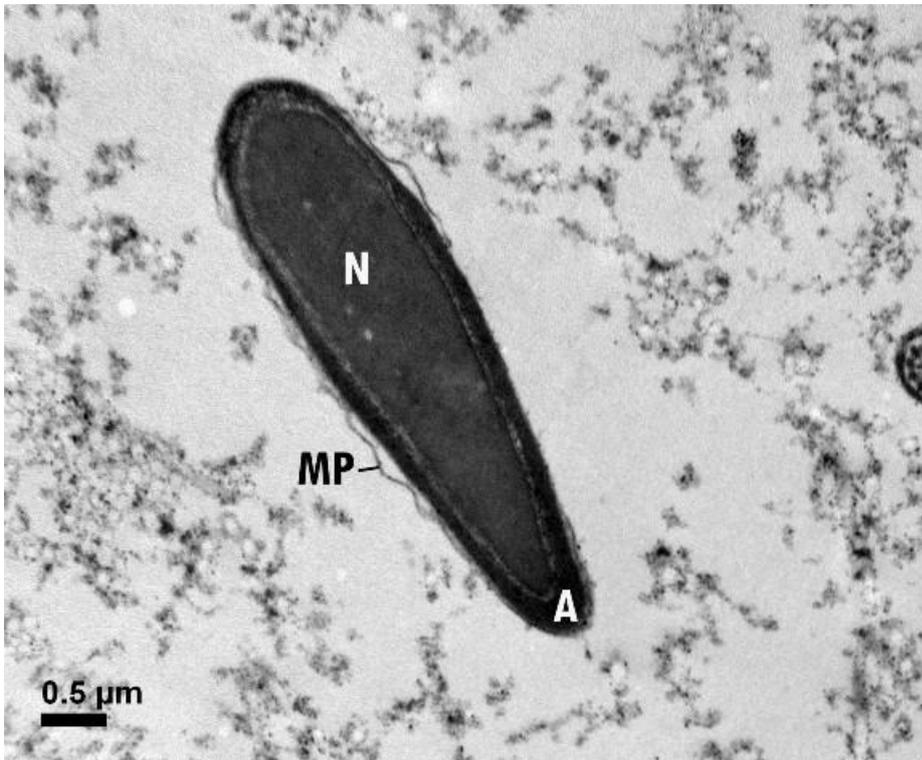
## Anexos



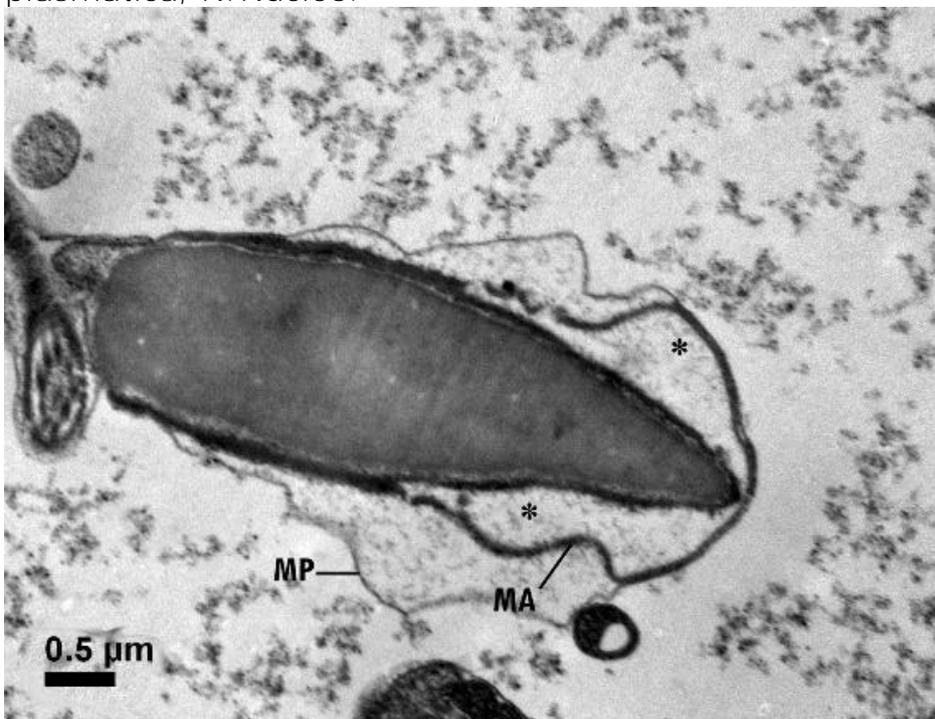
**Gráfico 1.1.** Porcentaje de cabezas espermáticas normales en espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados en cada uno de los experimentos. <sup>A</sup>Trealosa; <sup>B</sup>Dimetilformamida; <sup>C</sup>Dodecil Sulfato de Sodio; <sup>D</sup>Trealosa y Dodecil Sulfato de Sodio.



**Gráfico 1.2.** Porcentaje de colas espermáticas normales en espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados en cada uno de los experimentos. <sup>A</sup>Trealosa; <sup>B</sup>Dimetilformamida; <sup>C</sup>Dodecil Sulfato de Sodio; <sup>D</sup>Trealosa y Dodecil Sulfato de Sodio.

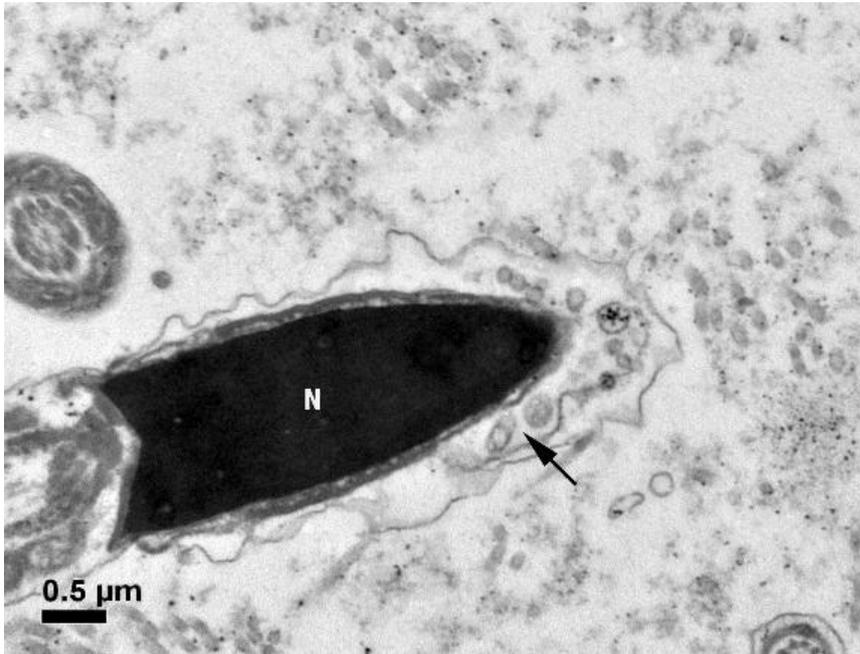


**Figura 1.** Evaluación ultramicroscópica de espermatozoides felinos congelados-descongelados. Cabeza normal. A: acrosoma, MP: membrana plasmática, N: Núcleo.

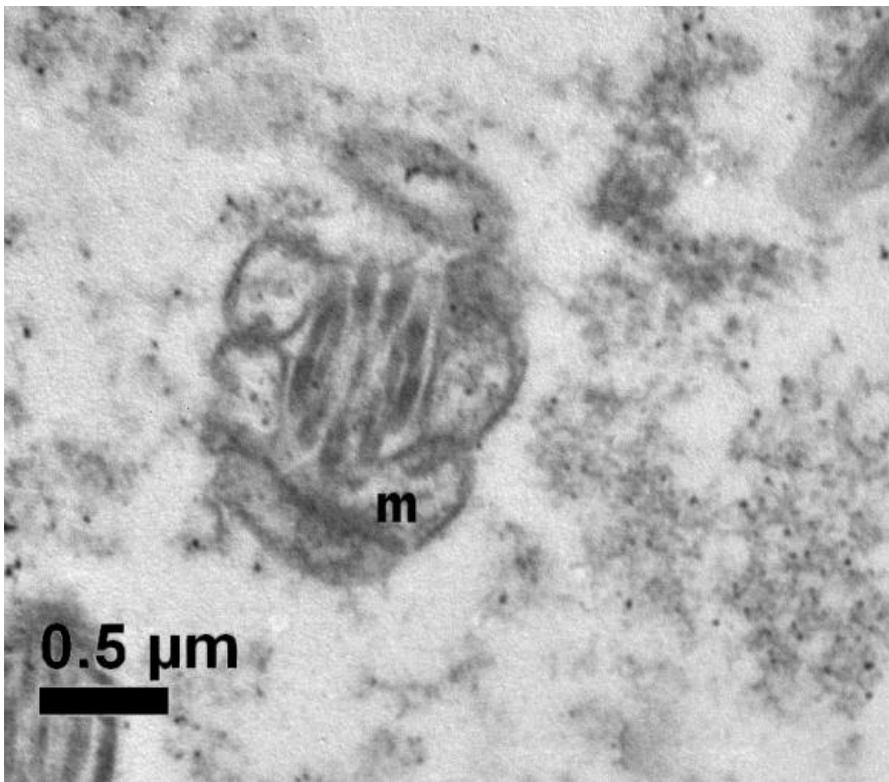


**Figura 2.** Evaluación ultramicroscópica de espermatozoide felino congelado-descongelado. Membrana plasmática y acrosomal plegadas.

Pérdida de contenido acrosómico (\*). MP: membrana plasmática, MA: membrana acrosomal.



**Figura 3.** Evaluación ultramicroscópica de espermatozoide felino congelado-descongelado. Fusión de las membranas acrosomales y formación de vesículas (flecha). N: núcleo.



**Figura 4.** Evaluación ultramicroscópica de espermatozoide felino congelado-descongelado. Mitocondrias hinchadas. m: mitocondria.