

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES CANINOS Y
FELINOS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES**

AUTOR: MV. TITTARELLI Claudia Marcela
DIRECTOR: MV. Dr. Cs. Vet. Dra. STORNELLI Alejandra

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO: MV. Dr. Cs. Vet. BOCCIA Francisco. FCV-UNLP
MV. Dr. Cs. Vet. CABODEVILA. J. FCV-UNICEN
MV. Dr. Cs. Vet. WILLIAMS Sara. FCV-UNLP

La Plata, 27 de Junio de 2014

A mis dos amores Denise y Camila...

AGRADECIMIENTOS

Sé que esta tesis existe gracias a todos estos apoyos, aquellos que me devolvieron una y otra vez la confianza en mis propias fuerzas. Mi agradecimiento a todas estas personas que me animaron a gestar y a dar a luz este trabajo.

- Al Dr. Carlos Eduardo Ramírez[†] por haberme iniciado en el camino de la investigación.
- A la generosidad del Méd. Vet. Eduardo Desmarás por haber permitido el pasaje de mi cargo de JTP ordinario a la Cátedra de Reproducción Animal.
- Al Dr. Gustavo Zucolilli, entonces y hoy, Director del Departamento de Ciencias Básicas, por haber facilitado mi pase y al Dr. Luzbel de la Sota por haberme abierto las puertas de su Cátedra incondicionalmente.
- A mi Directora de tesis, la Dra. María Alejandra Stornelli, por haberme dado la oportunidad de trabajar en la Cátedra de Reproducción e iniciarme en este difícil camino hacia el Doctorado.
- Al querido Profesor Titular Dr. Luzbel de la Sota por haber confiado en mí desde el primer momento, por haberme brindado su invaluable experiencia y su constante afecto. Su apoyo, contención y sugerencias han mejorado enormemente este trabajo. Es para mí, un ejemplo de persona, de dedicación a la docencia y a la investigación. Fue, simplemente...., la mano que me sostuvo en los momentos difíciles.

- A todos y cada uno de los integrantes de la Cátedra de Reproducción, que me recibieron con los brazos abiertos. Son tantos que quiero incluir a todos y no olvidarme absolutamente de nadie, compañeros, amigos, en fin, del primero al último, todos aquellos que de alguna manera siempre estuvieron en los momentos buenos y en los no tan buenos que tuve que atravesar durante el desarrollo de esta tesis.
- A mi Co-equiper, quien codo a codo trabajó con las muestras histológicas y ultraestructurales, resinas, tacos, semifinos, ultrafinos, microfotografías...tantas muestras! La Dra. Susana Jurado. A sus técnicos del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la FCV, UNLP, Silvio y Roxana, quién puso su constancia, tenacidad y eficiencia para trabajar con los preparados. Eternamente gracias...!
- A la Dra María Carla Mitacek por su ayuda incondicional con los gráficos y figuras.
- A la Méd. Vet. Romina Praderio por su constante y desinteresado apoyo.
- A la Dra Cecilia Cuitiño por presentarme ese mundo de la morfometría con tanta humildad y cariño.
- A la Dra. María Alejandra Quiroga y a la Dra. Adriana Massone por su desinteresado apoyo relacionado a las imágenes y términos patológicos.

- Al Méd. Vet. César Savignone por acercarme otra vez a las imágenes histológicas y por los primeros estudios estadísticos.
- A la UNLP y a la querida Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme permitido realizar mis estudios de grado y de posgrado.
- A los jurados por sus meritorias correcciones y sus valiosos aportes que me han dado la oportunidad de mejorar.
- A los veterinarios de los Centros de Zoonosis de Alte. Brown, Ringuet y La Plata por su colaboración en la provisión de las muestras de castración usadas en los experimentos, en especial al Dr. Javier Guzzetti. Un recuerdo especial para el Dr. López quien me hizo llegar las primeras muestras para este trabajo (testículos y epidídimos de dos hermanos Labradores 5 días poscastración).
- Por último, quisiera agradecer a mi pareja y compañero, que ha sido mi guía, mi sostén y consejero en esta etapa; a mis hijas, Denise y Camila por llenarme de orgullo día a día y a toda mi familia que son mi apoyo incondicional.

Muchas Gracias!

LISTA DE PUBLICACIONES

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS

1. EFFECT OF TRANSPORT MEDIA AND STORAGE TIME ON SURVIVAL OF SPERMATOOZOA RECOVERED FROM CANINE AND FELINE EPIDIDYMIDES (2006). **Tittarelli CM**, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. *Theriogenology* 66 (2006) 1637-1640.
2. RECUPERACION ESPERMATICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENETICO. **Tittarelli CM**, Stornelli MC, Giménez F, Savignone CA, de la Sota RL, Stornelli MA. (2007) *Revista Veterinaria Cuyana*, 2007, 2(1): 1-5,
3. EFFECT OF STORAGE MEDIA AND STORAGE TIME ON HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN CAT EPIDIDYMAL CELLS. **Tittarelli CM**, Jurado SB, Núñez Favre R, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 6), 281–283 (2012); doi: 10,1111/rda,12073, ISSN 0936–6768

TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS

1. Alteraciones morfológicas en epidídimos felinos almacenados 24 h a 4°C. **Tittarelli CM**, Savignone CA, Stornelli MC, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, Jurado SB, Guzzetti J, Stornelli MA. Primera Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina, Huerta Grande, Córdoba, 17-16/8/2007, Res A24 Pág, 30, Póster.
2. Influencia del tiempo y el medio de almacenado sobre la ultraestructura de epidídimos felinos. **Tittarelli CM**, Jurado SB, Peralta R, García Mitacek C, Nuñez Favre R, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA, XII Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología. IByME. 1 al 3 de diciembre de 2010. Presentación oral. Pág. 28.
3. Effect of storage media and storage time on histological and ultrastructural changes in cat epididymal cells. **CM Tittarelli**, SB Jurado, R Núñez Favre, MC Bonaura, RL de la Sota RL, MA Stornelli. VII International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler, British Columbia, Canada. 26 al 29 de Julio de 2012, p 268-269. Presentación oral.
4. Descenso térmico intraepididimal ocurrido en diferentes medios de almacenado a 4°C (intraepididymal temperature decrease in different storage media at 4°C). **Tittarelli CM**, Nuñez Favre R, Praderio R, Bonaura MC, Silvestrini MP, de la Sota RL, Stornelli MA. XXIII

Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias PANVET. Cartagena de Indias, Colombia. 24 – 27 de Octubre de 2012 Presentación póster.

5. Efecto del tiempo y el medio de almacenado sobre los cambios microscópicos y ultramicroscópicos de epidídimos caninos. **Tittarelli CM**, Jurado SB, Sarmiento P, Praderio RG, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA, XII Congreso Interamericano de Microscopía (CIASSEM 2013).Cartagena de Indias, Colombia, 24 -28 de septiembre de 2013.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE PUBLICACIONES	VI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMEN.....	XIX
SUMMARY	XX
 CAPÍTULOS	
I. INTRODUCCIÓN	
Recuperacion espermática epididimal como medio para preservar material genético	1
 II. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE EPIDÍDIMOS ALMACENADOS EN DOS MEDIOS DE TRANSPORTE A 4°C DURANTE DIFERENTES PERÍODOS	
Introducción	12
Objetivo	16
Hipótesis.....	17
Materiales y Métodos	17
Experimento I	17
Animales experimentales, tratamientos y recolección de EE.....	17

Pruebas de contrastación de material espermático	19
Análisis estadístico	20
Resultados	21
Discusión y Conclusión.....	28
III. TEMPERATURA ALCANZADA EN EL INTERIOR DEL EPIDÍDIMO LUEGO DE 24 HORAS DE ALMACENADO A 4°C EN DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE	
Introducción	33
Objetivo	38
Hipótesis	38
Materiales y Métodos	39
Experimento II.....	39
Animales experimentales y tratamientos.....	39
Análisis estadístico	39
Resultados	40
Discusión y Conclusión.....	44
IV. EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE SOBRE EL PROCESO DE AUTÓLISIS DE LAS CÉLULAS EPIDIDIMALES DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL ÓRGANO A 4°C DURANTE 24, 48 Y 72 HORAS	
Introducción	48
Objetivo	54
Hipótesis.....	54
Materiales y Métodos	55

Experimento III.....	55
Animales experimentales y tratamientos.....	55
Microscopía óptica y Microscopía electrónica de transmisión	56
Análisis morfológico ultraestructural.....	63
Análisis estadístico	64
Resultados	64
Discusión y Conclusión.....	69
V. EFECTO DE LA ADICIÓN DE 0,25% DE SODIO DODECIL SULFATO AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-DESCONGELACIÓN	
Introducción	73
Objetivo.....	80
Hipótesis	80
Materiales y Métodos	80
Experimento IV	80
Animales experimentales y tratamientos.....	80
Análisis estadístico	82
Resultados	82
Discusión y Conclusión.....	85
VI. CONCLUSIONES FINALES Y PROSPECTIVA	87
BIBLIOGRAFÍA	88

BIOGRAFÍA DE LA AUTORA..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- AI Acrosomas intactos
- AICF Acrosomas intactos por contraste de fase
- AIFL Acrosomas intactos por fluorescencia
- AM Area mitocondrial
- AN Area nuclear
- ASB Albúmina de suero bovino
- CITES Convención sobre el Comercio Internacional de Especies
Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
- Csp Cantidad suficiente para
- DIL Diluyentes
- ED Desvío estándar
- EE Espermatozoides epididimales
- EI Epidídimo izquierdo
- EP Endósmosis positiva
- EPI Epidídimos
- ES Error estándar
- ET Espermatozoides testiculares
- Fig Figura
- FIV Fertilización in Vitro
- GLM Modelo lineal general
- GPC Glicerofosfolina
- GPx Glutación peroxidada
- h Horas

- HOS Test hiposmótico
- IA Inseminación artificial
- ICSI Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides
- LDL Lipoproteína de baja densidad
- MET Microscopía Electrónica de Transmisión
- MI Motilidad individual
- MOsm Miliosmoles
- MRA[®] Martín Rilo-Arias
- NM Número de mitocondrias
- NN Número de núcleos
- Obj Objetivo
- PBS Buffer fosfato
- PESA Aspiración percutánea de espermatozoides epididimales
- PV Porcentaje de vivos
- RER Retículo endoplásmico rugoso
- ROS Especie reactiva de oxígeno
- SDS Sodio dodecil sulfato
- SF Solución Fisiológica
- SOD Superóxido dismutasa
- TESE Extracción de espermatozoides testiculares
- TRISBA Tris base
- TRISEQ1,5 Tris base con 1,5 ml de Equex STM[®]
- TRIS SDS Tris base con 0,25 % de SDS
- TRT Tratamiento
- TSV Tinción supravital

TYH Tris yema de huevo

UI Unidades internacionales

UICN Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

v/v Volumen sobre volumen

VI Vigor

YH Yema de huevo

LISTA DE TABLAS

Tabla

- 2.1. Medias y error estándar para motilidad, integridad de membrana, acrosomas intactos por contraste de fase, acrosomas intactos con fluorescencia, vivos y velocidad de espermatozoides caninos recuperados de epidídimos almacenados en dos medios durante diferentes períodos..... 23
- 2.2. Medias y error estándar para motilidad, integridad de membrana, acrosomas intactos por contraste de fase, acrosomas intactos con fluorescencia, vivos y velocidad de espermatozoides felinos recuperados de epidídimos almacenados en dos medios durante diferentes períodos..... 23
- 4.1. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos felinos..... 57
- 4.2. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos caninos. 58
- 4.3. Grados de cambios ultraestructurales de la distribución de la cromatina nuclear y morfología de las estereocilias en células principales de epidídimos felinos y caninos..... 60

LISTA DE FIGURAS

Figura

- 2.1. Diseño experimental parte I por especie, ED: epidídimo derecho, EI: epidídimo izquierdo..... 19
- 2.2. Porcentaje medio para Motilidad individual, vigor y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales caninos almacenados a 4°C por distintos períodos..... 24
- 2.3. Porcentaje medio para test hiposmótico, acrosomía por contraste de fase y acrosomía por fluorescencia de espermatozoides epididimales caninos almacenados a 4°C por distintos períodos. 25
- 2.4. Porcentaje medio para motilidad individual, vigor y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales felinos almacenados a 4°C por distintos períodos26
- 2.5. Porcentaje medio para test hiposmótico, acrosomía por contraste de fase y acrosomía por fluorescencia de espermatozoides epididimales felinos almacenados a 4°C por distintos períodos, 27
- 2.6. Porcentaje medio para motilidad individual y vigor de espermatozoides de epididimos felinos almacenados a 4°C en solución fisiológica o en Tris yema de huevo. 28
- 3.1. Curva de descenso de la temperatura dentro de colas de EPI sometidos a 4°C en dos especies y dos medios..... 40
- 3.2. Curva de descenso de la temperatura dentro de colas de epidídimos felinos sometidos a 4°C en dos medios..... 42
- 3.3. Curva de descenso de la temperatura dentro de colas de EPI caninos sometidos a 4°C en dos medios..... 43

4.1. Diseño experimental parte II por especie, ED: epidídimo derecho, EI: epidídimo izquierdo.	56
4.2. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos felinos.	58
4.3. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos caninos.	59
4.4. Grados de cambios de cromatina nuclear y morfología de estereocilias a nivel ultraestructural de células epididimales felinas.	61
4.5. Grados de cambios de cromatina nuclear y morfología de estereocilias a nivel ultraestructural de células epididimales caninas.	62
4.6. Cambios morfológicos en epidídimos felinos entre 0 y 72 horas.	64
4.7. Cambios morfológicos de núcleos y esterocilias de epidídimos felinos en dos medios.	65
4.8. Microfotografía de cambios en núcleos y esterocilias de epidídimos felinos entre 0 y 72 horas.	66
4.9. Microfotografía mostrando cambios en núcleos y esterocilias de epidídimos felinos en distintos medios.	67
4.9.1. Cambios morfológicos en epidídimos caninos entre 0 y 72 horas.	68
4.9.2. Microfotografía mostrando cambios en núcleos y estereocilias de epidídimos caninos entre 0 y 24horas.	69
5.1. Motilidad, vigor y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales caninos congelados-descongelados en Tris Base y Tris base con 0,25% de Sodio dodecil sulfato.	83

5.2. Porcentaje de acrosomas intactos y test hiposmótico y de espermatozoides epididimales caninos congelados-descongelados en Tris Base y Tris base con 0,25% de Sodio dodecil sulfato.....	84
--	----

RESUMEN**VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES CANINOS Y FELINOS ALMACENADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES**

PALABRAS CLAVES: espermatozoides, epidídimo, caninos, felinos, dodecil sulfato de sodio, tris-yema de huevo.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la sobrevivencia de EE caninos y felinos almacenados en EPI modificando las condiciones y el tiempo de almacenado transcurrido hasta la recuperación de las gametas para aumentar el número de espermatozoides viables. Los objetivos específicos fueron: 1) comparar el efecto de diferentes medios sobre la supervivencia de EE almacenados a 4°C durante distintos periodos dentro del EPI; 2) evaluar el efecto de diferentes medios sobre la temperatura alcanzada en el interior del EPI a 4°C; 3) evaluar los cambios autolíticos de las células epididimales durante el almacenamiento del órgano a 4°C por diferentes períodos mediante microscopía óptica y MET; 4) estudiar el efecto de dos DIL para criopreservación sobre la supervivencia de EE al descongelado. Se desarrollaron 4 experimentos. En el primer experimento se usaron 140 epidídimos almacenados en SF y TYH de 0 a 72 h. Se obtuvieron diferencias significativas en todas las variables de calidad espermática estudiadas en función del tiempo de almacenado en ambas especies. El medio de almacenado influyó en el porcentaje de EE viables recuperados en felinos pero no en los caninos. En el segundo experimento se almacenaron los epidídimos en los 2 medios de transporte a 4°C y se registraron las temperaturas alcanzadas dentro de 20 colas de epidídimos, cada 30 minutos a través de la colocación de termocuplas. Al comparar la curva de descenso de temperatura de las dos especies se observaron diferencias significativas. La comparación de las curvas de descenso de temperatura entre medios mostró una tendencia a ser significativamente diferente en los felinos. En el tercer experimento se realizaron 44 cortes semifinos y 44 ultrafinos de colas epididimales, almacenadas a 4°C en dos medios durante 24, 48 y 72 h para microscopía óptica y MET. Los estudios histológicos en felinos, mostraron cambios autolíticos con el tiempo y con el medio. Los cambios autolíticos fueron mayores en SF que en TYH. En el estudio ultraestructural la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias cambiaron con el tiempo y con el medio de almacenado como en el estudio morfológico. El NN y el AN cambiaron con el tiempo. En caninos, los cambios histológicos y ultraestructurales aumentaron con el tiempo de almacenado pero no hubo diferencias entre los medios. El NM cambió con el tiempo. En el cuarto experimento se estudió el efecto del agregado de 0,25% de SDS (TRIS SDS 0,25%) al diluyente TRISBA sobre la congelabilidad de EE caninos congelados-descongelados. Se utilizaron 30 epidídimos caninos y se evaluó la calidad espermática en semen fresco y al descongelado. Todas las variables de calidad seminal estudiadas fueron mejores en el semen congelado-descongelado con TRIS SDS 0,25% con excepción de HOS y el porcentaje de AI. En conclusión, el TYH permite obtener mayor cantidad de EE en felinos y la adición de SDS al DIL mejora la calidad de los EE congelados-descongelados.

SUMMARY

VIABILITY OF CANINE AND FELINE EPIDIDYMAL SPERMATOZOA STORED UNDER DIFFERENT CONDITIONS

KEY WORDS: spermatozoa, epididymis, canine, feline, sodium docecyl sulphate, tris-egg yolk.

The primary objective of this dissertation was to study the survival of canine and feline epididymal spermatozoa stored in the epididymis modifying the conditions and storage time until recovery to increase the number of viable recovered spermatozoa. The secondary objectives of this dissertation were: 1) to compare the effect of different storage media on survival of epididymal spermatozoa stored in epididymis at 4°C during different times, 2) to study the effect of different storage media on the temperature reached inside the epididymis when stored at 4°C, 3) to assess with optic and electron microscopy the autolytic changes of epididymal cells during storage at 4°C, and 4) to study the survival of frozen-thawed epididymal spermatozoa cryopreserved with two different extenders. Four experiments were done to bring about these objectives. In the first experiment, 140 canine and feline epididymides were stored in saline solution (SS) or tris-egg yolk (TEY) for 0 to 72 h. In dogs and cats, time of storage had a significant effect on sperm parameters. Storage media had a significant effect on sperm parameters in cats but not in dogs. In the second experiment, epididymides were stored in SS or TEY at 4°C and temperature inside the tail of the epididymides was recorded every 30 min. The temperature curves were different for dogs and cats. Furthermore, different curves were recorded for different extenders in cats. In the third experiment, canine and feline epididymides were stored in different storage media for 24, 48 and 72 h. Semithin and ultrathin sections of cauda epididymides were prepared for optic and electron microscopy studies. In feline samples, the histological studies showed autolytic changes with time and storage media. Autolytic changes were more pronounced in SS compared to TEY. Similar changes were observed in the ultrastructural studies. Ultrastructural changes in the nuclear chromatin and morphology of stereocilia also changed with time and storage media. The number of nuclei and of mitochondria changed with time. Conversely, in canine samples, the histological and ultrastructural changes increased with time but did not change with storage media. Only the number of nuclei changed with time. In the fourth experiment, we studied the effect of adding 0,25% of SDS to the Tris base extender on sperm characteristics of frozen-thawed epididymal spermatozoa. A total of 30 canine epididymides were used to recover spermatozoa. Semen quality was assessed in fresh and frozen-thawed spermatozoa. Frozen-thawed sperm quality was improved with the addition of SDS to the Tris-base extender in all sperm parameters with the exception of HOS and percentage of intact acrosomes. In conclusion, TEY allowed to obtain more epididymal spermatozoa in cats and use of SDS as an extender improved sperm quality in epididymal frozen-thawed semen.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENÉTICO

La expansión de la biotecnología con el fin de promover la diversidad genética en poblaciones reducidas se ha convertido en una necesidad. A mayor diversidad genética, las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente. Cuando el tamaño de las poblaciones se reduce, aumenta la reproducción entre organismos emparentados (consanguinidad) y hay una reducción de la diversidad genética. Promover esta diversidad es deseable no sólo para el mejoramiento genético sino también para la conservación de especies, ya que el rol fundamental de la variabilidad genética es ser la materia prima para los procesos evolutivos.

La preservación de la biodiversidad animal fue el objetivo que ha impulsado el desarrollo y la aplicación de técnicas de reproducción asistida debido a la muerte inesperada de animales de alto valor genético ya sea productivo, de interés para los zoológicos o animales en vías de extinción, como así también a la dificultad para obtener semen fresco en especies silvestres. Por este motivo, los investigadores han dirigido sus esfuerzos a la preservación tanto de gametas como de células somáticas con el fin de crear bancos de material genético para ser usado en el futuro.

Una herramienta de gran potencial para rescatar material genético de animales que mueren inesperadamente (recuperación post-mortem) o deben ser

orquiectomizados por problemas médicos es la recuperación y criopreservación espermática epididimal. Esta metodología, permite preservar gametas que podrán ser usadas para mantener la variabilidad genética dentro de poblaciones reducidas evitando la pérdida de la biodiversidad en futuras generaciones. A través de ella, la creación de bancos genéticos asegurará la preservación de caracteres fenotípicos de diferentes especies previniendo cualquier posibilidad de desaparición futura, tanto por motivos ecológicos, sanitarios o catástrofes naturales sumándonos al esfuerzo mundial para evitar las pérdidas de especies en el planeta (Díaz y Ojeda, 2000; International Union for Conservation of Nature [IUCN] 2013).

El avance en la recuperación de espermatozoides epididimales (EE), potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epidídimo y su posterior criopreservación en especies domésticas, es de suma importancia como modelo experimental para ser utilizado en especies silvestres amenazadas. La fisiología reproductiva en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*) ha sido utilizada como un modelo para investigaciones en felinos silvestres. Estas investigaciones han permitido reconocer, además de la duración del ciclo estral y sus diferentes fases, algunas de las variaciones en la fisiología reproductiva de los diferentes felinos. Una de las características de los felinos es la ocurrencia de la ovulación inducida, sin embargo existen evidencias de que algunas especies pueden ocasionalmente ovular de manera espontánea (gato doméstico, león africano (*Panthera leo*) y guepardo (*Acinonyx jubatus*). El fotoperíodo modifica la actividad ovárica, por lo menos de manera parcial, en los tigres siberianos (*Panthera tigris altaica*), leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) y pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) entre otras especies. No se encontraría evidencia de estacionalidad reproductiva en algunas especies silvestres como por ejemplo león africano (*Panthera leo*), puma (Puma concolor)

leopardo (*Panthera pardus*), o jaguaré (*Panthera Onca*). En los felinos silvestres, se han estudiado y siguen en estudio diversas técnicas de reproducción asistida, las mismas incluyen: congelación de semen, inseminación artificial, maduración y fertilización in Vitro (FIV), criopreservación y transplante de embriones (Brousset Hernandez Jáuregui, 2002; Asa y Valdespino, 2003; Asa, 2010).

De esta forma, los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de EE caninos y felinos podrían ser utilizados en cánidos y félidos silvestres en vías de extinción lo que permitirá aumentar sus posibilidades de preservación (Fougner, 1989; Fastard y col., 1992; Fastard, 1996; Pukazhenthí y col., 2004 y 2006; Asa, 2010).

Existen diferentes causas que pueden ser las responsables de la extinción de las especies, el común denominador es la destrucción del hábitat de las mismas. Este hecho coloca a dichas especies en una situación difícil de amenaza, sobre todo a aquellas que no tienen la capacidad de adaptarse al nuevo ambiente o de trasladarse a otro mejor. Entre todas estas causas, podemos hacer una división entre las naturales, y las provocadas por el hombre. Entre las primeras encontramos aquellas que tienen que ver con procesos evolutivos propios de las especies y las que son propias de la vida de la naturaleza; en tanto entre las segundas, que colocan al hombre como el único protagonista y responsable de estos hechos, encontramos por ejemplo la caza indiscriminada de animales, la deforestación, el uso de agentes contaminantes del medio ambiente, el tráfico y la comercialización ilegal de animales, etc.

En nuestro país, un cánido silvestre, el Aguará-Guazú (*Chrysocyon brachyurus*) perteneciente a la clase mamíferos, orden carnívora y familia canidae, que habita en las provincias de Formosa, Chaco y Corrientes, ha sido declarado

especie “amenazada” según la lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza, (UICN). Dentro de los félidos silvestres amenazados en la Argentina se encuentran el Yaguareté (*Panthera onca*), Gato andino (*Oreailurus jacobita*) y Ocelote o gato onza (*Leopardus pardalis*) (Díaz y Ojeda, 2000).

Por otro lado, es importante aclarar que para los fines mencionados anteriormente podríamos obtener gametas también a partir de los testículos, aunque la célula espermática a este nivel posee diferencias funcionales relacionadas con su grado de maduración. Los espermatozoides testiculares (ET) carecen de capacidad fecundante mientras que los espermatozoides de la cola del epidídimo tienen un potencial de fertilización equivalente al espermatozoide eyaculado (Amann y Griel, 1974).

En el tratamiento de la infertilidad masculina, en pacientes con parámetros seminales anormales se pueden usar los métodos estándar de FIV o el ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) para obtener descendencia, según la cantidad de espermatozoides móviles progresivos con morfología normal. Si bien es cierto que han sido utilizados tanto EE como ET para ICSI los hallazgos muestran que si bien el uso de EE o ET aseguran similares tasas de embarazo luego de realizar un procedimiento de ICSI se obtienen mejores tasas de fecundación cuando se utilizan EE. Díaz-Fontdevila y col. (2006) observaron que en 33 hombres azoospermicos sometidos a aspiración percutánea de EE (PESA) y a extracción de ET (TESE) mediante biopsia para recuperar y posteriormente criopreservar las gametas la tasa de fecundación fue mayor para el grupo de PESA 75 % respecto al grupo de TESE 43% ($p < 0,005$), Pasqualotto y col. (2002) observaron que con el uso

de ET se obtuvieron tasas de fertilización y embarazo inferiores que con el uso de EE. Bourne y col., (1995) observaron que si bien las tasas de fertilización obtenidas con EE y ET fueron altas, la tasa de fertilización obtenida con EE fue significativamente mayor.

Estudios realizados en ICSI muestran que la criopreservación de ET puede reducir la capacidad fecundante y la tasa de implantación con disminución del número de nacimientos vivos (Gil-Slalomy col., 1996; De Croo y col., 1998; Wood y col., 2002). Sin embargo el uso de EE criopreservados no mostró diferencias significativas en las tasas de fertilización, tasa de división embrionaria, calidad embrionaria y tasas de preñez comparadas con las del uso de los EE frescos (Friedler y col., 1998; Hutcheon y col., 1998; Tournaye y col., 1999; Cayan y col., 2001).

Por lo tanto, si bien pueden recuperarse ET éstos podrían utilizarse con buenos resultados sólo aplicando ICSI y con menor tasa de fecundación comparada con el uso de EE. La principal ventaja de la recuperación espermática epididimal es que nos permite colectar y criopreservar espermatozoides ya maduros y fértiles.

La recuperación de EE se realiza de la cola del epidídimo, allí los espermatozoides son potencialmente fértiles, ya maduros y se almacenan esperando el momento de la eyaculación. Existen muchos trabajos que solventan y acreditan esta práctica. En rumiantes, al utilizar y comparar EE de la cabeza, del cuerpo y de la cola se observó que al trabajar con los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, éstos fueron inmóviles y no fertilizaron ovocitos luego de inseminación artificial (IA) en el cuerno uterino. Cuando se utilizaron espermatozoides del cuerpo epididimal invariablemente ocurrió muerte embrionaria temprana y, finalmente al utilizar espermatozoides de la cola la mayoría de los ovocitos fertilizados resultaron en

corderos nacidos. Estos resultados demuestran que ocurre una mejora de la funcionalidad espermática entre la parte distal del cuerpo y la cola del epidídimo, siendo estos últimos equivalentes al espermatozoide eyaculado (Fournier-Delpech, 1979). En el toro, gato y conejo se ha observado que las proporciones de anomalías espermáticas observadas en el testículo disminuyen durante el transporte epididimal, probablemente por el reconocimiento de espermatozoides anormales y su posterior fagocitosis por las células del epidídimo (Murakami y col., 1984; Axner y col., 1999; Johnston y col., 2001). En gatos domésticos se demostró una disminución en la proporción de espermatozoides con anomalías de cabeza, acrosoma y pieza intermedia durante el tránsito epididimal. En contraposición se detectó un aumento en la proporción de espermatozoides con anomalías de cola que podría deberse a la influencia osmótica del fluido seminal durante la eyaculación (Tebet y col., 2006).

Esta biotecnología tuvo su origen en 1930 con Walton, quien recuperó espermatozoides vivos de vasos deferentes de conejos. A partir de allí, se han realizado estudios sobre recuperación y criopreservación espermática epididimal en ratones (An y col., 1999; Sato y Ishikawa, 2004), ciervos (Yonai y col., 1998; Hishinuma y col., 2003), equinos (Bruemmer y col., 2002), ovinos (Kaabi y col., 2003) y caninos y felinos (Hay y Goodrowe, 1993; Pope y col., 1998; Baterman y col., 2000; Peña y Forsberg, 2000; Pushett y col., 2000; Stille y col., 2000).

Desde las primeras observaciones realizadas por Walton (1930) hasta la actualidad, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar si los EE pueden ser usados para producir embriones viables y nacimiento de crías vivas. Iwamatsu y McChang, (1971) comunicaron fertilizaciones exitosas de ovocitos de ratón utilizando EE. Fuller y Whittingham, (1996) informaron la obtención de fetos

normales de ratones luego de FIV con EE refrigerados a 4°C inmediatamente después de la colección. Los mismos investigadores obtuvieron crías vivas de ratas mediante el uso de EE y, más recientemente, a partir de espermatozoides congelados-descongelados recuperados de epidídimos (EPI; Songsasen y col., 1997). También en caprinos, se logró la producción de embriones hasta la etapa de blastocisto utilizando EE mediante FIV como así también, el nacimiento de crías vivas por IA (Song y col., 1988; Blash y col., 2000). Por otra parte en bovinos, Graff y col., (1996) obtuvieron preñeces implementando FIV realizada con EE y, posteriormente, Foote, (2000) logró el nacimiento de crías vivas mediante IA de EE. Así mismo en equinos, Barker y Gandier, (1957) obtuvieron nacimientos de potrillos por IA con espermatozoides de EPI criopreservados y descongelados. Por último, en cebras, Meintjes y col., (1997) comunicaron el uso de EE en FIV logrando el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocito.

En pequeños animales, si bien existen trabajos sobre la recuperación de espermatozoides de la cola del EPI (Hay y col., 1993; Stilley y col., 2000), son escasas las comunicaciones en relación al efecto que poseen sobre la viabilidad espermática las diferentes condiciones de almacenado de los EPI (Savignone y col., 2004b; Gañán y col., 2009). El medio de almacenado, la temperatura y el tiempo que transcurre desde la muerte del animal hasta la recuperación de las células espermáticas, resultan ser de gran importancia ante la muerte inesperada de un animal y la necesidad de trasladar los testículos y EPI a un laboratorio de andrología preparado para la recuperación y criopreservación de EE.

La influencia del tiempo transcurrido entre la obtención de los órganos reproductivos y la recuperación espermática fue analizada por diversos investigadores. Aguado y col., (1994) estudiaron la viabilidad de espermatozoides

ovinos recuperados de EPI almacenados a temperatura ambiente por 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h. Estos autores obtuvieron mayor viabilidad espermática (precongelado y posdescongelado) cuando la recuperación se realizó dentro de las 3 h post-mortem. Bajo condiciones similares, Garde y col., (1994) no encontraron diferencias en la capacidad fecundante de los espermatozoides de carnero obtenidos dentro de las primeras 24 h luego de la muerte. Sin embargo, se evidenció un marcado descenso de la viabilidad espermática al prolongar el período de almacenado. Estos estudios, no analizaron el efecto de la temperatura sobre la calidad de los espermatozoides obtenidos. Trabajos realizados en diferentes especies muestran que la temperatura de almacenado influencia la viabilidad espermática epididimal. Foote (2000) comunicó que los espermatozoides de toros permanecieron viables al ser usados en IA aún después de haberlos almacenado por 60 h a 5°C. Kaabi y col., (2003) indicaron que la refrigeración del epidídimo permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparados con el almacenado del órgano a temperatura ambiente. Stillely y col., (2000) comprobaron en caninos que a temperatura ambiente (20-22°C) se produce autólisis de los tejidos a las 54 h post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 h. Además, observaron que cuando los EPI se almacenan refrigerados a 4°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día.

Sin embargo hay que tener en cuenta que el uso de la refrigeración para disminuir el metabolismo celular y conservar mejor las células, genera algunos inconvenientes. Tanto el refrigerado de espermatozoides como el descenso y la estabilización a 4°C ocurrida durante la congelación, afectan a las gametas alterando principalmente sus membranas, fenómeno conocido como shock de frío o shock térmico. La yema de huevo (YH) es uno de los crioprotectores utilizados para

minimizar los efectos nocivos de las bajas temperaturas sobre los espermatozoides. Las características protectoras contra el frío de la YH son conocidas desde los trabajos de Phillips y Lardy (1940). Posteriormente, Kampschmidt y col., (1953) propusieron que la yema contribuía beneficiosamente de dos maneras distintas: por resistencia, protegiendo contra el choque térmico y por conservación, consiguiendo la supervivencia del espermatozoide. Luego se supo, que la porción lipídica de la YH constituida por los fosfolípidos, era efectiva en la protección contra el choque térmico; hecho confirmado por Blackshaw (1954), quien precisó que la fosfatidilcolina era el principal fosfolípido protector. Es así que la YH ha sido y sigue siendo un componente de la mayoría de los (DIL) seminales. Sin embargo existen pocos datos de la influencia del medio de almacenado sobre la viabilidad espermática epididimal. Trabajos preliminares realizados en chinchillas (Savignone y col., 2004b) comunicaron mejores parámetros espermáticos al recuperar espermatozoides de EPI almacenados a 4°C durante 24 h en Tris YH (TYH) o MRA[®] comparados con los almacenados en SF. Los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en SF tuvieron menor motilidad, vigor y porcentaje de membranas íntegras en el test hiposmótico comparados con los almacenados en TYH o MRA[®] (Martín Rilo-Arias). Asimismo, los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron mayor motilidad, vigor, porcentaje membranas íntegra en el test hiposmótico y acrosomas intactos comparados con los recuperados de EPI almacenados en MRA[®] (Savignone y col., 2004b).

A pesar de que los EE son almacenados dentro del epidídimo y como consecuencia estarían protegidos del shock térmico directo durante el refrigerado (Shankai y col., 2001; Yu y Leibo, 2002), la incorporación de un medio de almacenado con YH protegería aún más a los espermatozoides del shock de frío. Por

otra parte, Kishikawa y col. (1999), obtuvieron mejor calidad espermática al recuperado epididimal previniendo la deshidratación de los tejidos. Es así que el medio de almacenado, actuaría previniendo la deshidratación del epidídimo, mejorando la conservación del mismo y conservando de esta manera las características del medio interno del órgano lo cual resultaría en una mejor conservación de los EE.

En virtud de lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta tesis fue estudiar la sobrevivencia de EE almacenados en EPI modificando las condiciones y el tiempo de almacenado transcurrido hasta la recuperación de las gametas, con el fin de aumentar el número de espermatozoides viables obtenidos. Para alcanzarlo se plantearon 4 objetivos específicos a saber:

1. Comparar el efecto de diferentes medios sobre la supervivencia de EE caninos y felinos almacenados a 4°C durante diferentes períodos dentro del epidídimo (Capítulo II).
2. Evaluar el efecto de diferentes medios sobre la temperatura alcanzada en el interior del epidídimo canino y felino luego de 24 h de almacenado a 4°C (Capítulo III).
3. Evaluar el efecto de diferentes medios sobre los fenómenos de autólisis de las células epididimales de caninos y felinos durante el almacenamiento del órgano a 4°C a lo largo de diferentes períodos (Capítulo III).
4. Estudiar el efecto de dos DIL para criopreservación sobre la supervivencia de EE al descongelado (Capítulo IV).

Para cumplir con los mismos se desarrollaron 4 experimentos que se describen en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO II

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE EPIDÍDIMOS ALMACENADOS EN DOS MEDIOS DE TRANSPORTE A 4°C DURANTE DIFERENTES PERÍODOS

INTRODUCCIÓN

La recuperación y posterior criopreservación de espermatozoides obtenidos de EPI luego de la muerte de un animal (recuperación posmortem) o posterior a una orquiectomía son herramientas importantes para preservar espermatozoides y generar bancos de reserva genética. Muchas veces, la única opción para salvar las gametas de un animal es transportar los testículos y EPI a un laboratorio equipado para el procesamiento espermático. Las condiciones (tiempo, temperatura y medio de almacenado) en las cuales los testículos y EPI son transportados y almacenados hasta la recuperación espermática pueden causar daños importantes en la viabilidad de las gametas. Si bien existen trabajos sobre la recuperación de espermatozoides de las colas epididimales en caninos (Yu y Leibo, 2002; Angrimani y col., 2013; González Santos y col., 2013;) y felinos (Axnér y col., 1999; Harris y col., 2001; Gañán y col., 2009) no se ha estudiado la influencia de estos factores sobre la viabilidad de los EE obtenidos en pequeños animales. En la actualidad existe pocos datos sobre las condiciones de transporte y almacenado de los órganos reproductivos y sobre cuál sería la mejor manera de proceder para lograr obtener mayor cantidad de EE viables. Trabajos realizados en diferentes especies muestran que la temperatura de

almacenado influencia la viabilidad espermática epididimal. Foote (2000) comunicó que los espermatozoides de toros permanecieron viables al ser usados en IA aún después de haberlos almacenado por 60 h a 5°C. Kikuchi y col., (1998) en cerdos y Kishikawa y col., (1999) en ratones, sugieren que, ante la muerte repentina de un animal, cuando no es posible recuperar y criopreservar inmediatamente las células, el almacenado temporal de los EPI a 4°C puede ayudar a conservar las gametas. De igual manera Kaabi y col., (2003) comunicaron que la capacidad fecundante de espermatozoides ovinos criopreservados y descongelados obtenidos de EPI almacenados a 5°C por 24 h fue similar a los espermatozoides criopreservados y descongelados de eyaculado. Sus informes indican que la refrigeración del epidídimo permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparados con el almacenado de estos órganos a temperatura ambiente. El almacenado de los EPI a 4°C evita un rápido descenso de la motilidad de los espermatozoides en ratones (Kishikawa y col., 1999) y ciervos (Axner y col., 1998). Los mejores resultados con la refrigeración a 5°C en varios parámetros seminales, especialmente en la motilidad, podrían ser explicados por la disminución del metabolismo celular de los espermatozoides cuando se almacenan a 5°C (Salamon y col., 2000). En relación a estas observaciones, Sankai y col., (2001) encontraron que la motilidad de espermatozoides de ratones disminuía con el aumento de la temperatura de almacenado, sugiriendo que estos cambios se relacionan con la variación en la actividad metabólica celular.

Stilley y col., (2000) comprobaron en caninos que a temperatura ambiente (22°C) se produce autólisis de los tejidos a las 54 h post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 h. Además, observaron que

cuando los EPI se almacenan refrigerados a 4°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día.

Por otra parte Kikuchi y col., (1998) comunicaron que la motilidad de espermatozoides porcinos almacenados a 4°C por 1 ó 2 días baja significativamente comparada con la de los espermatozoides no refrigerados tomados como control. Este hecho podía relacionarse con la especial sensibilidad de los espermatozoides porcinos a las bajas temperaturas, habiéndose comunicado que a temperaturas <15°C ocurre cambio de fase en las membranas espermáticas (Althouse y col., 1998). Posteriormente se estableció como crítica una temperatura <12°C (Althouse y col., 1998). Yu y Leibo (2002) observaron que la motilidad de EE caninos almacenados a 4°C bajó significativamente (de 50% a 30%) dentro de las primeras 5 h de almacenado, aunque no hubo disminución significativa de la integridad de membrana ni en la integridad acrosomal dentro de las 48 h de refrigeración. Estos resultados evidenciarían que existen diferencias entre las distintas especies en el mantenimiento de la viabilidad de los EE almacenados post-mortem en los EPI.

El descenso de temperatura a la que son sometidos los espermatozoides en la refrigeración y/o criopreservación prolonga la vida de las gametas al descender su metabolismo celular, pero también puede provocar un daño conocido como “shock térmico o shock de frío” (Watson, 1981). La susceptibilidad de los espermatozoides al shock de frío está relacionada con la composición de la membrana plasmática no sólo entre diferentes especies, sino también entre diferentes individuos (White, 1993).

Dentro de los componentes de los DIL para criopreservación se encuentra la yema de huevo, sus propiedades protectoras durante el enfriamiento y congelación de semen se conocieron en 1940 (Phillips y Lardy, 1940). Luego se descubrió que no

solo tenía la habilidad de proteger a los espermatozoides de condiciones ambientales desfavorables, como el shock de frío, sino que también contribuye de alguna manera a la mantención de la vida del espermatozoide, conformando así un factor de resistencia y un factor de almacenamiento respectivamente. En el mismo estudio se definió que los fosfolípidos que componen la yema de huevo actúan como el factor de resistencia, mientras que los complejos de lipoproteínas actúan como factor de resistencia y factor de almacenamiento (Betancur y col., 2009). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que contiene la YH se unen fuertemente a la membrana espermática gracias a su componente proteico, ya que los fosfolípidos por sí solos no se unen a la membrana. Además se sugiere que la presencia de proteínas aumenta la acción de los fosfolípidos en la protección espermática, especialmente cuando hay altas concentraciones de fosfolípidos durante el almacenamiento en frío (Watson, 1981).

Actualmente se cree que la LDL, los fosfolípidos y el colesterol son los factores en la yema de huevo que proporcionan protección a los espermatozoides durante el almacenamiento en frío (Betancur y col., 2009). La YH recubre la membrana celular a modo de camisa reversible a través de una unión lábil que se realiza entre los lípidos y las lipoproteínas de la membrana bloqueando la entrada de calcio a la célula, disminuyendo el efecto de las fosfolipasas y manteniendo entonces, la integridad celular (Watson, 1976; Palacios Angola, 1994; Garde López Brea, 1995). La misma fue utilizada en trabajos previos como medio de almacenamiento de los EPI comparándola con la SF para el mismo fin. La viabilidad espermática en EE de chinchillas fue superior cuando se utilizó como medio de almacenado el Tris yema de huevo (TYH) comparado con el uso de la solución fisiológica (SF) para transportar y almacenar los testículos y los EPI (Savignone,

2004b). En concordancia, Hernández y col., (2006) señalan la conveniencia del uso de un diluyente como la yema de huevo y fructuosa que siendo fuente de energía para las células proporciona condiciones más favorables que la SF para la recuperación espermática.

Existen comunicaciones contradictorias respecto a las susceptibilidades de las distintas membranas al frío no sólo entre especies sino también entre individuos (White, 1993); al cambio de sus propiedades a través del efecto de la yema de huevo y a la mayor o menor resistencia al shock térmico de los EE comparados con los de un eyaculado (White, 1993; Axner y col., 1998) e incluso con aquellos espermatozoides obtenidos a través de la electroeyaculación (Hermansson y col., 2007). Asimismo, se obtuvieron resultados discordantes en relación al uso de yema de huevo con espermatozoides de distintas especies (White, 1993; Gilmore y col., 1998), Harris y col., (2001) demostraron un efecto positivo de la yema de huevo sobre la motilidad y viabilidad de EE felinos durante el almacenamiento en frío, superando la protección ejercida sobre los espermatozoides eyaculados. Es así que, evaluar el efecto de la adición de yema de huevo como parte de un medio de transporte de testículos y EPI hasta el laboratorio y de almacenado hasta el momento de la recuperación espermática podría mejorar la calidad de las células recuperadas post-almacenado.

OBJETIVO

- Comparar el efecto de diferentes medios sobre la supervivencia de EE caninos y felinos almacenados dentro del epidídimo a 4°C durante diferentes períodos.

HIPÓTESIS

- Mediante el uso de TYH puede aumentarse la sobrevivencia de espermatozoides recuperados de EPI almacenados a 4°C durante 24, 48 ó 72 h.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento I

Animales experimentales, tratamientos y recolección de EE

Se utilizaron 140 testículos y EPI provenientes de 35 caninos y de 35 felinos adultos en estado de salud incluidos en un plan de control de la reproducción. Los EPI se dividieron aleatoriamente en tres grupos (Fig.2.1). En el primer grupo (TRT 1) se incluyeron 10 EPI por especie. Luego de la orquiectomía bilateral, los testículos derechos con sus correspondientes EPI se colocaron rápidamente en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, y los izquierdos en TYH [Tris 3,025g, ácido cítrico 1,7g, fructosa 1,25g, agua destilada csp 100ml, 20% de YH y 100 IU/ml de penicilina, (Rota y col., 1995)], se mantuvieron a temperatura ambiente y se enviaron rápidamente al laboratorio. Los EPI fueron procesados dentro de las 4 h posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tardó desde la cirugía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. De los testículos y del plexo pampiniforme se diseccionaron los EPI usando una tijera y se removieron también los pequeños vasos para reducir la contaminación con sangre. Finalmente se separaron las colas de cada epidídimo macroscópicamente (Varesi y col., 2013). La cola epididimal se atemperó en un baño termostático a 37°C por 10 minutos en 1,5 ml (perros) o 0,7 ml (gatos) de Tris Base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,7g, fructosa 1,25g y agua destilada csp 100ml).

Posteriormente se realizó la recuperación de los espermatozoides a través del corte (cutting) de la cola del epidídimo (Yu y Leibo, 2002). Se colocó el Tris Base y la cola epididimal sobre una placa de Petri apoyada sobre una platina térmica a 37°C. Luego de la recuperación espermática, se realizaron pruebas de contrastación microscópicas *in vitro* por duplicado. Los espermatozoides obtenidos a la hora (h) cero, no refrigerados, fueron tomados como controles.

En el segundo grupo (TRT 2) se incluyeron 30 EPI derechos por especie. Luego de la orquiectomía bilateral, el testículo y el epidídimo derecho de cada animal fueron rápidamente colocados en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina.

En el tercer grupo (TRT 3) se incluyeron los 30 EPI izquierdos por especie remanentes de los 30 animales utilizados en el TRT 2. Luego de la orquiectomía bilateral, el testículo y el epidídimo izquierdo de cada animal fueron rápidamente colocados en TYH.

Posteriormente, los testículos del TRT 2 y del TRT 3 se dividieron al azar en tres lotes de 10 EPI cada uno almacenando cada lote a 4°C durante diferente período (24, 48 y 72 h), conformando seis subgrupos por especie. Antes del procesado, las muestras refrigeradas se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C-22°C) por 30 minutos. Se realizó la obtención de los EE según lo descripto para el primer grupo y se continuó con las pruebas de contrastación *in vitro* microscópicas por duplicado.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Teriogenología de la FCV-UNLP.

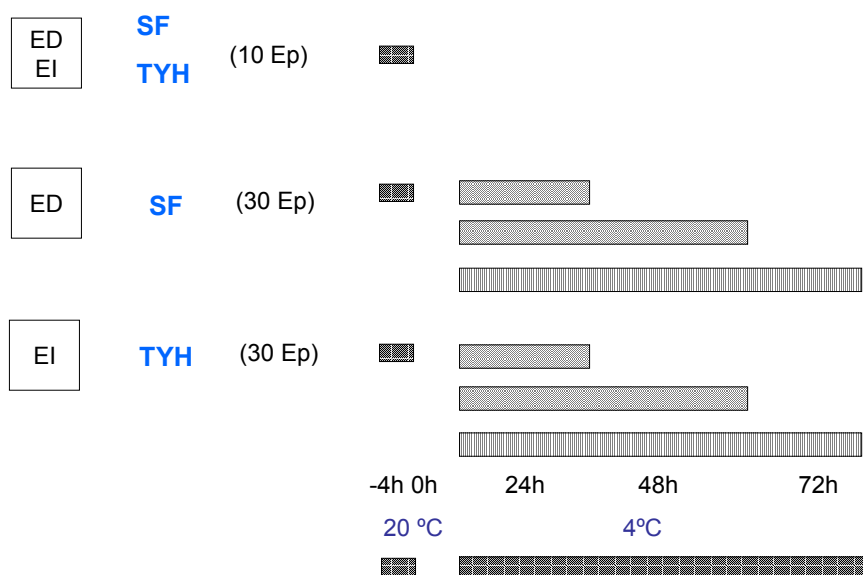


Figura 2.1. Diseño experimental por especie. ED: epidídimo derecho, EI: epidídimo izquierdo.

Pruebas de contrastación del material espermático

Los espermatozoides se evaluaron mediante las siguientes pruebas de contrastación microscópicas:

Motilidad individual (MI): 10 μ l de suspensión conteniendo EE recuperados, se colocaron en un portaobjetos sobre platina térmica a 37°C. Luego se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en microscopio óptico con una magnificación de 400X. Se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en 5 a 7 campos (Axnér y Linde-Fosberg, 1998; Johnston y col., 2001).

Vigor (VI): se evaluó conjuntamente con la motilidad individual. Para establecer este parámetro se utilizó una escala de 1 a 5, en donde 1 y 2 corresponde a los espermatozoides con movimiento en el lugar, 3 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo lento, 4 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo rápido y 5 corresponde a los espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.

Acrosomas intactos (AI, % Acrosomas intactos): la observación de la integridad acrosómica se realizó mediante microscopía de contraste de fase con fijación en glutaraldehído al 2% (Pursel y Jonshon, 1974) y con microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin - isotiocianato de fluoresceína (Mendoza y col., 1992; Kawakami y col., 1993).

Porcentaje de vivos (PV), 10 μ l de suspensión conteniendo E recuperados se colocaron con 10 μ l de colorante eosina-nigrosina sobre un portaobjetos a 37°C. Se mezclaron las gotas durante 30 segundos sobre platina térmica a 37°C. Se realizó un extendido y se contaron 100 células, las cuales se clasificaron en espermatozoides vivos y muertos con microscopio óptico con una magnificación de 1000X (Johnston, 1991).

Integridad de membrana: HOS (Test hiposmótico, % colas enrolladas): se utilizó una solución hipotónica de 150 mOsm de fructosa y citrato de sodio para producir el hinchamiento de los espermatozoides, éste se evidenció por un enrollamiento de la cola en espermatozoides intactos. Se evaluó con microscopio óptico con una magnificación de 1000X el porcentaje de células que manifestaron colas enrolladas (Hideki y col., 1993; Rodríguez-Gil y col., 1994).

Análisis estadístico

Para determinar si era necesario transformar los datos se utilizaron el procedimiento UNIVARIATE de SAS[®] (SAS Institute Inc., 1996). Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS[®] para las variables de respuesta ordinales y el procedimiento CATMOD de SAS[®] para las variables de respuesta nominales. Se

utilizaron contrastes ortogonales para realizar la comparación entre las medias de los tratamientos estudiados. El nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS

En caninos, no se encontraron diferencias significativas entre los medios de almacenado al evaluar los parámetros MI, VI, PV y HOS estudiados en todos los tiempos. Tampoco se observaron diferencias en el % de AI ni con microscopía de contraste de fase ni con microscopía de fluorescencia al comparar los medios (Tabla 2.1). Por otro lado (Fig. 2.2 y 2.3) en todos los parámetros estudiados se observó un efecto del tiempo de almacenado ($p < 0,001$), aumentando los daños espermáticos con el incremento del tiempo (Tabla 2.1). Luego de las 24h de almacenado disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) los valores de MI ($52,2 \pm 3,7$ vs. $26,8\% \pm 3,2$), VI ($3,7 \pm 0,28$ vs. $2,6 \pm 0,24$), AICF ($94,5 \pm 3,0$ vs. $73,3 \pm 2,6$) AIFL ($77,2 \pm 3,7$ vs. $62 \pm 3,0$) y PV ($94,1 \pm 2,8$ vs. $65,7 \pm 2,4$). Sin embargo, el HOS ($90,4 \pm 4,1$ vs. $65,4 \pm 3,1$) fue significativamente menor 72h post-almacenado ($p < 0,05$). No hubo interacción entre el medio de transporte y el tiempo de almacenado en ninguna de las variables estudiadas.

En felinos, los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron mayor MI ($22,8 \pm 2,3$ vs. $16,6 \pm 2,5$) y VI ($3,2 \pm 0,2$ vs. $2,5 \pm 0,2$) en comparación con aquellos almacenados en SF $p < 0,05$ (Fig. 2,6 y Tabla 2.2). Sin embargo, no hubo ningún efecto del medio de transporte sobre AI, HOS ni en PV ($p > 0,05$).

Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en función del tiempo de almacenado, disminuyendo los parámetros a medida que se prolongó el

tiempo de recuperación (Fig.2.4 y Fig. 2.5). A las 24h todos los parámetros fueron inferiores en comparación con la cero h: MI ($37,6 \pm 5$ vs. $22,2 \pm 3,8$), AICF ($93,5 \pm 2,8$ vs. $79,5 \pm 3,8$) y PV ($94,2 \pm 1,1$ vs. $69,4 \pm 2,8$) salvo en AIFL y en VI donde los valores bajaron significativamente a las 48h.

No hubo interacción entre el medio de transporte y el tiempo de almacenado en ninguno de los parámetros estudiados.

Tabla 2.1. Medias (%) y error estándar para motilidad (MI), integridad de membrana (HOS), acrosomas intactos por contraste de fase (AICF), acrosomas intactos con fluorescencia (AIFL), vivos (PV) y velocidad (VI) de espermatozoides caninos recuperados de epidídimos almacenados en tris yema de huevo (TYH) o solución fisiológica (SF) a 4°C durante 0, 24, 48 ó 72 horas (h).

Intervalo (h)	MI		HOS		AI CF		AI FL		PV		VI	
	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH
0	47,2±8,4 ^A	57,2±7 ^A	92,4±1,9 ^A	89,4±4 ^A	92,8±1,3 ^A	96,2±1 ^A	75±6,5 ^A	79,5±6,5 ^A	94,2±0,7 ^A	94,1±0,9 ^A	3,5±0,3 ^A	3,9±0,3 ^A
24	30,8±4,9 ^B	22,9±4,6 ^B	85,1±2,9 ^A	86,5±2 ^A	72,3±3,7 ^B	74,4±3,6 ^B	58,2±6,5 ^B	65,7±6,5 ^B	65,5±2,5 ^B	65,6±2,7 ^B	2,5±0,3 ^B	2,8±0,3 ^B
48	15,4±3,6 ^C	19,6±3,8 ^C	81,5±4,1 ^A	90,4±1,8 ^A	57,3±5,0 ^C	67,8±4,6 ^C	35,2±6,5 ^C	33,0±8,4 ^C	56,1±5,1 ^C	59,2±4,8 ^C	2,5±0,3 ^B	2,4±0,3 ^B
72	15,0±3,9 ^C	23,4±4,7 ^C	66,8±7,1 ^B	64,1±7,3 ^B	36,8±5,0 ^D	46,1±5,8 ^D	15,0±6,5 ^D	19,2±6,5 ^D	49,2±5,7 ^C	50,0±5,6 ^C	1,9±0,4 ^B	2,3±0,4 ^B

En el grupo control (0h) se utilizaron diez epidídimos. En cada grupo horario se incluyeron diez epidídimos por medio de almacenado. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$; 0 vs. 24, 24 vs. 48, 48 vs. 72h) entre tiempos (entre columnas).

Tabla 2.2. Medias (%) y error estándar para motilidad (MI), integridad de membrana (HOS), acrosomas intactos por contraste de fase (AICF) acrosomas intactos por fluorescencia (AIFL), vivos (PV) y velocidad (VI) de espermatozoides felinos recuperados de epidídimos almacenados en tris yema de huevo (TYH) o solución fisiológica (SF) a 4°C durante 0, 24, 48 ó 72 horas (h).

Intervalo (h)	MI,		HOS,		AICF,		AIFL		PV,		VI,	
	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH	SF	TYH
0	38,7±4,6 ^A	36,2±5,4 ^A	85,4±1,7 ^A	82,2±2,8 ^A	95,2±0,6 ^A	91,7±2,1 ^A	76,5±12,0 ^A	70,2±12,0 ^A	94,2±1,3 ^A	94,2±1,0 ^A	3,7±0,2 ^A	3,5±0,2 ^A
24	16,7±3,8 ^{B1}	27,8±3,9 ^{B2}	76,4±3,6 ^B	82,1±1,9 ^B	79,2±4,2 ^B	79,9±3,4 ^B	67,8±8,4 ^A	72,1±8,4 ^A	69,5±2,8 ^B	69,3±2,9 ^B	2,5±0,4 ^{A1}	3,9±0,2 ^{A2}
48	9,5±2,7 ^{C1}	19,5±2,6 ²	78,4±2,2 ^B	82,4±2,4 ^B	71,4±3,5 ^B	74,0±3,6 ^B	42,0±8,4 ^B	48,5± 8,4 ^B	60,5±3,6 ^C	64,8±3,4 ^C	2,7±0,4 ^{A1}	3,4±0,2 ^{A2}
72	6,0±2,6 ^{D1}	11,0±2,4 ^{D2}	75,1±3,2 ^B	79,1±4,5 ^B	58,4±8,8 ^C	60,4±6,6 ^C	9,4±8,4 ^C	17,5±8,4 ^C	61,1±3,6 ^C	62,5±3,2 ^C	1,2±0,4 ^{B1}	2,2±0,4 ^{B2}

En el grupo control (0h) se utilizaron diez epidídimos. En cada grupo horario se incluyeron diez epidídimos por medio de almacenado. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$; 0 vs. 24, 24 vs. 48, 48 vs. 72h) entre tiempos (entre columnas). Números diferentes (**1 y 2**) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre **medios** (entre filas).

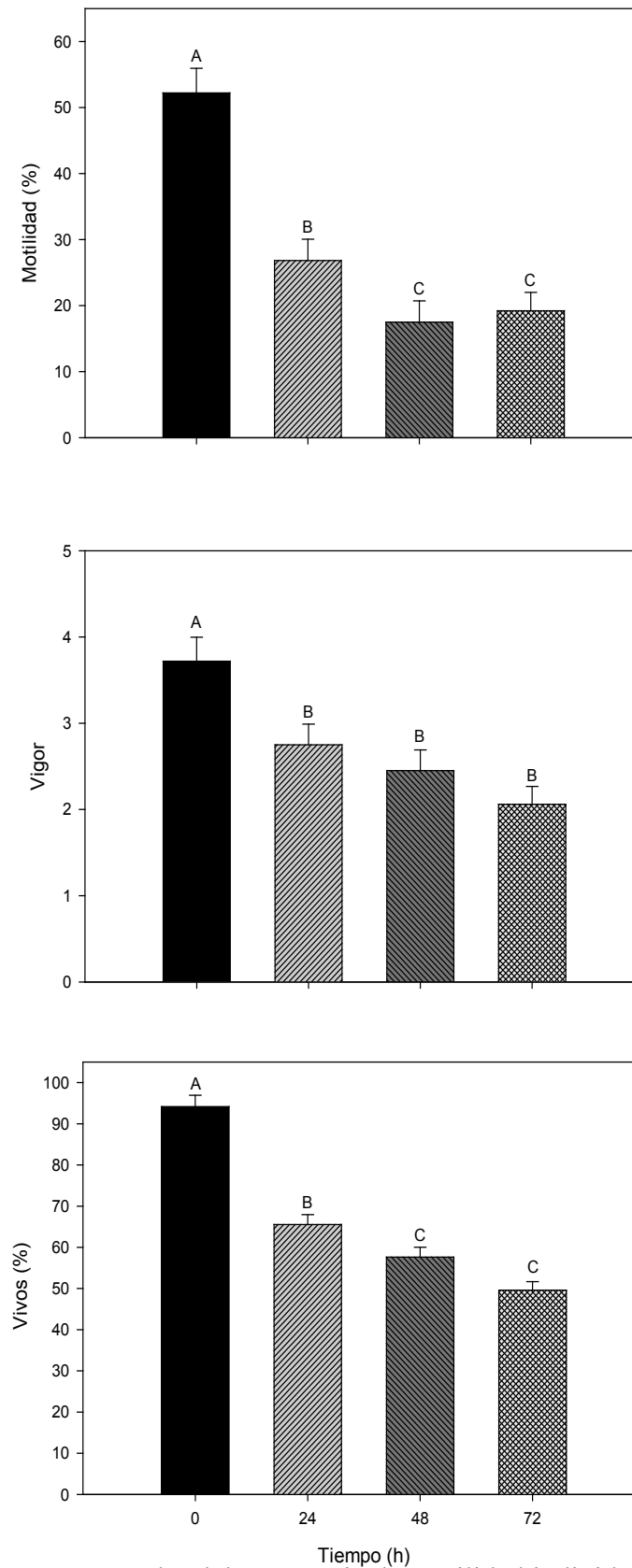


Figura 2.2. Media y error estándar del porcentaje de motilidad individual (MI), vigor (VI) y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales caninos almacenados a 4°C por 24, 48 y 72h posmortem. Barras con diferentes letras (A, B, C) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$).

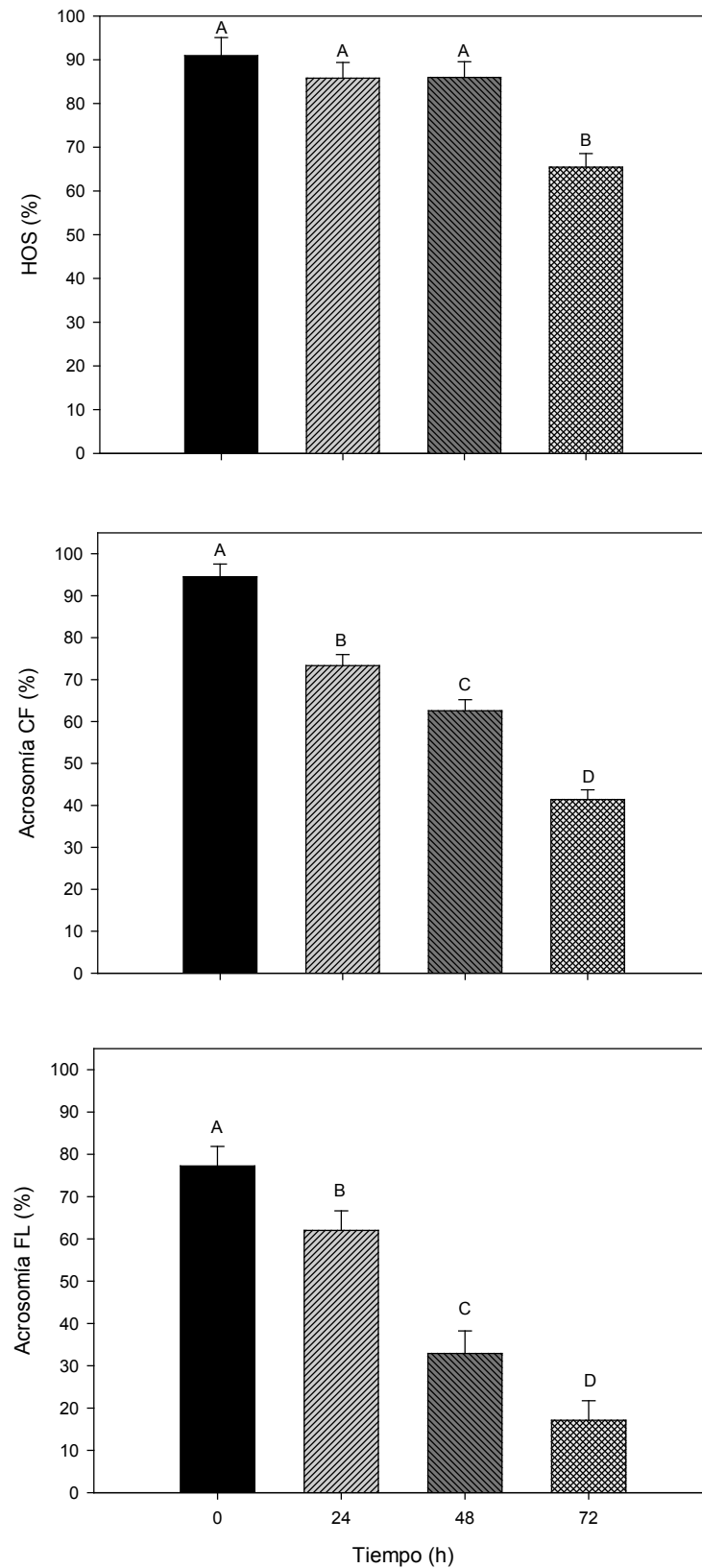


Figura 2.3. Media y error estándar del porcentaje de HOS, acrosomía por contraste de fase (AICF) y acrosomía por fluorescencia (AIFL) de EE caninos almacenados a 4°C por 24, 48 y 72h posmortem. Barras con diferentes letras (A, B, C, D) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$).

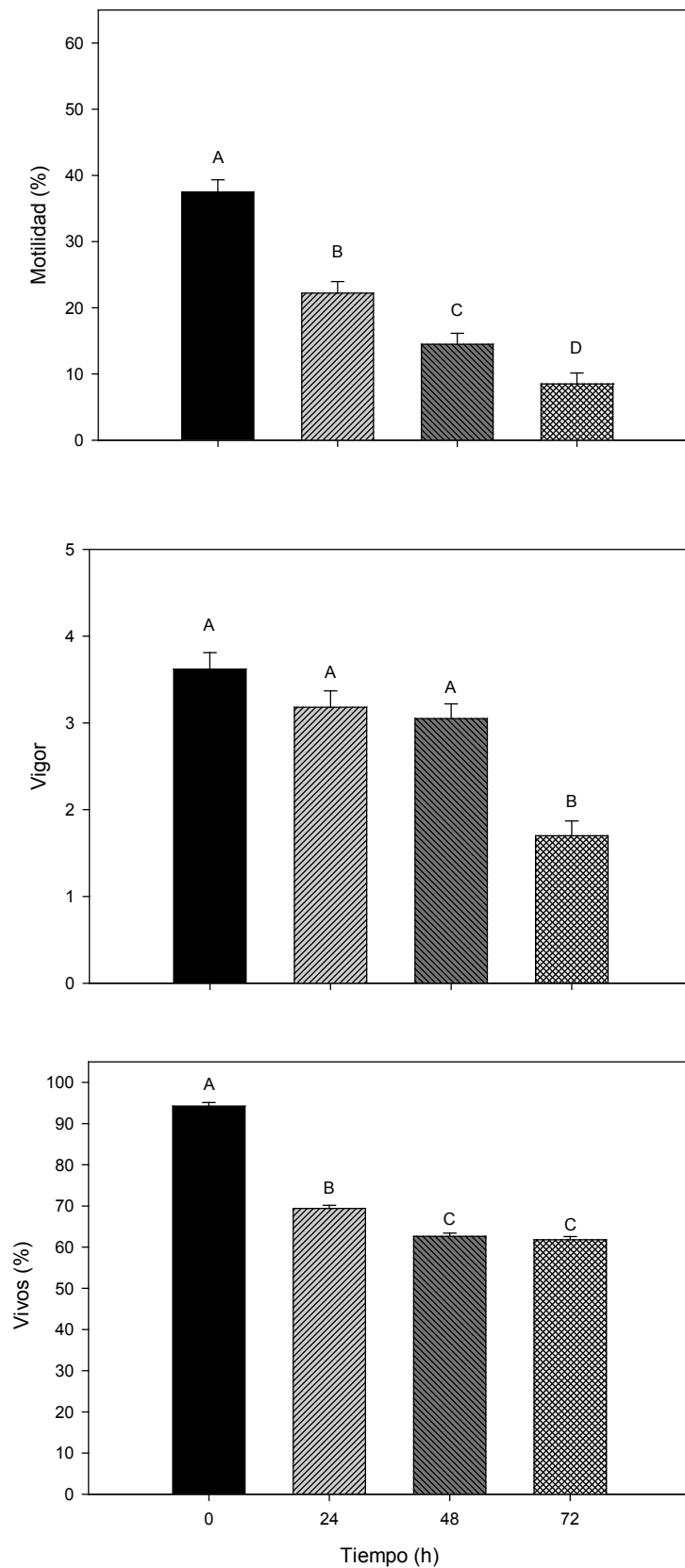


Figura 2.4. Media y error estándar del porcentaje de motilidad individual (MI), vigor (VI) y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales felinos almacenados a 4°C por 24, 48 y 72h posmortem. Barras con diferentes letras (A, B, C, D) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,001$).

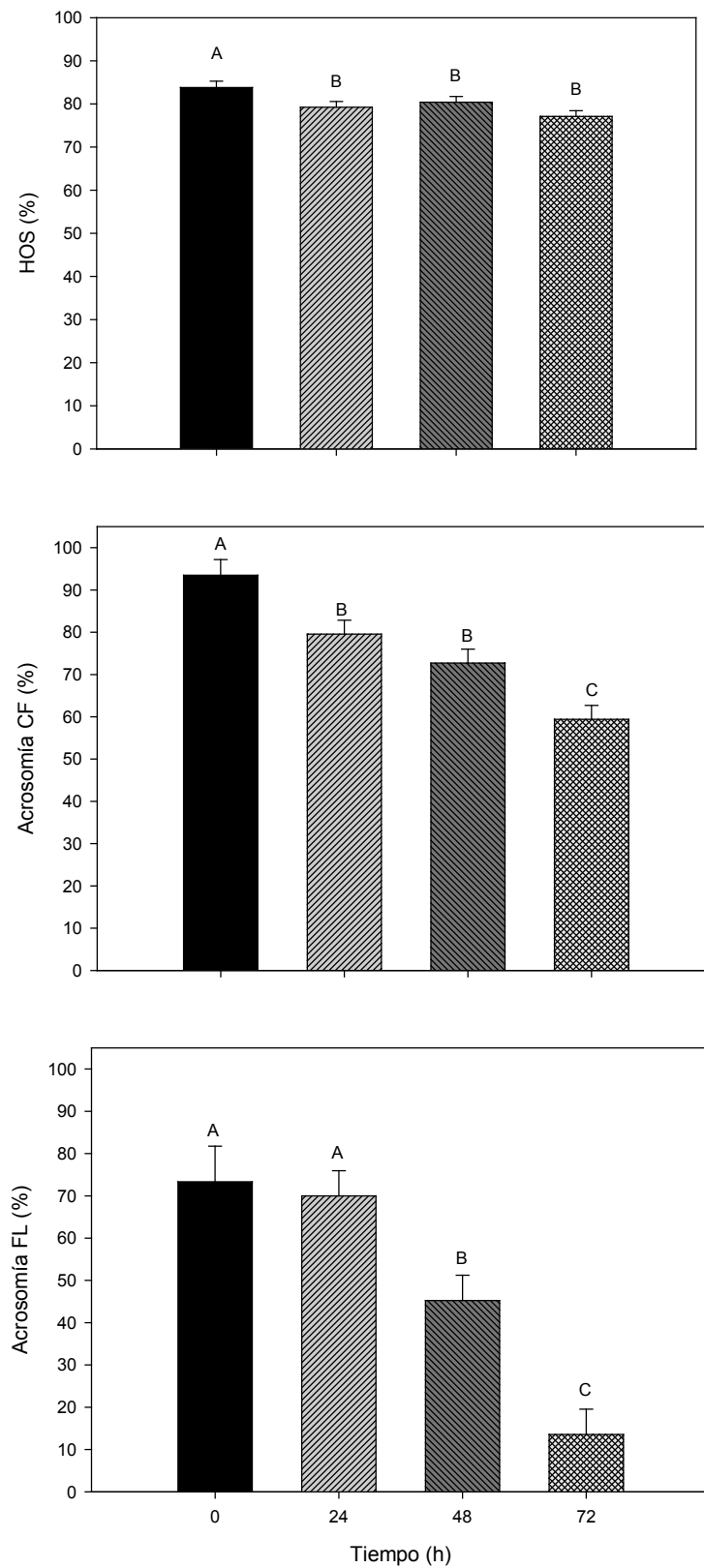


Figura 2.5 Media y error estándar del porcentaje de HOS, acrosomía por contraste de fase (AICF) y acrosomía por fluorescencia (AIFL) de espermatozoides epididimales felinos almacenados a 4°C por 24, 48 y 72h posmortem. Barras con diferentes letras (A, B, C) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$).

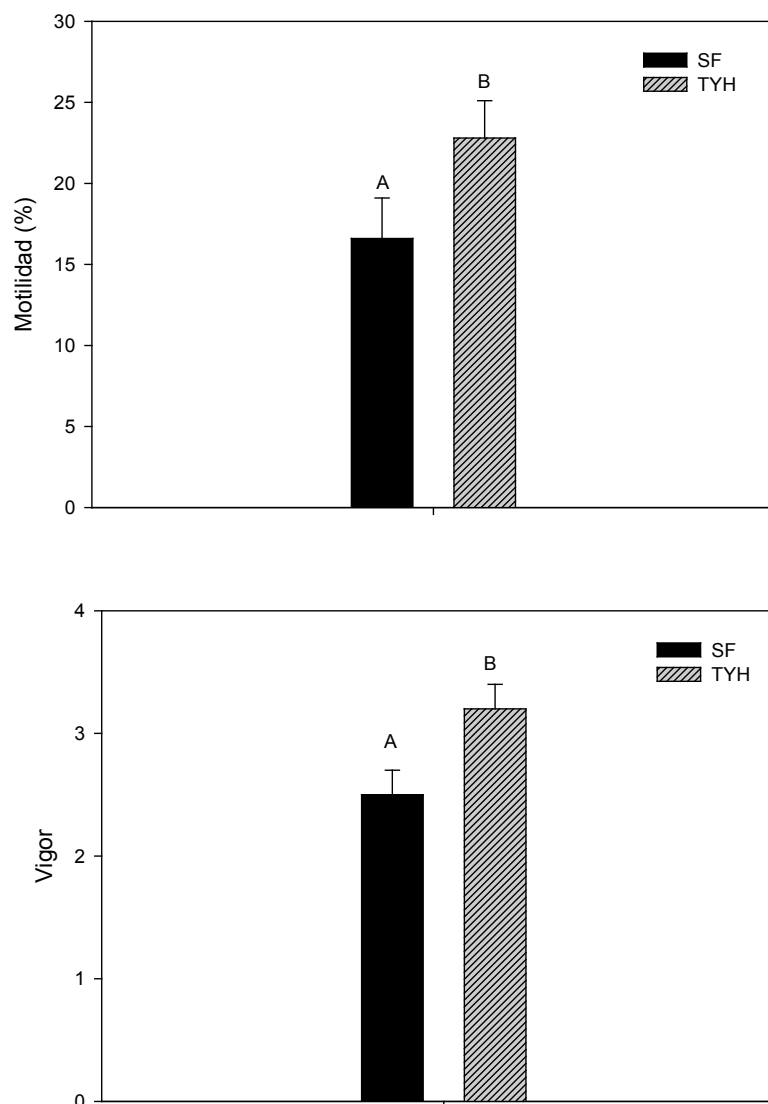


Figura 2.6. Media y error estándar del porcentaje de motilidad individual (MI), vigor (VI) de espermatozoides de epididimos felinos almacenados a 4°C por en solución fisiológica (SF) o en Tris yema de huevo (TYH). Barras con diferentes letras (A, B) muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Nuestra hipótesis fue que el uso del TYH como medio de almacenado aumentaría la sobrevivencia de los espermatozoides caninos y felinos recuperados de EPI (EPI) conservados a 4°C durante distintos periodos. Por lo tanto, un medio de almacenado que preserve las células del epidídimo permitiría una mejor conservación del medio

interno epididimal que contiene las gametas, posibilitando así, una mayor recuperación de EE viables.

Aunque la integridad de membrana y el PV se mantuvieron alrededor del 50% y el vigor por encima de 1,9 en los espermatozoides almacenados 72h en los caninos, la motilidad disminuyó significativamente a partir de las 24h tanto en esta especie como en los felinos.

Estos resultados concuerdan con Armas y col., (2011) y con Goodrowe y Hay (1993), quienes observaron un descenso de la motilidad al comparar EE frescos con los EE recuperados a las 24h. Del mismo modo, Yu y Leibo (2002), al almacenar EPI a 4°C durante 8 días, observaron que la motilidad de EE caninos bajó significativamente (de 50% a 30%) dentro de las primeras 5h de almacenado, además de observar un descenso significativo de esta variable durante las primeras 72h. Contrariamente no registraron disminución significativa de la integridad de membrana ni en la integridad acrosomal dentro de las 48h de refrigeración. En nuestro estudio la integridad acrosomal se modificó a las 24h en ambas especies. La integridad de membrana se mantuvo sin cambios en los caninos hasta las 72h pero en los felinos esta variable fue significativamente menor ya a las 24h. Estos resultados evidenciarían que existen diferencias entre las distintas especies en el mantenimiento de la viabilidad de los EE almacenados posmortem en los EPI.

Gañan y col., (2009) a diferencia de lo observado en nuestro estudio no encontraron diferencias en la motilidad de EE felinos entre las 0 y las 24h utilizando Tris como medio de almacenado observando que el porcentaje de espermatozoides móviles fue significativamente menor a las 72h, sin comprobar diferencias en el

porcentaje de acrosomas intactos ni en las morfoanomalías con el incremento del tiempo.

Los cambios autolíticos que sufren las células epididimales producto de la anoxia tisular, podrían causar cambios en el fluido epididimal afectando la viabilidad de los EE, hecho que podría explicar las modificaciones observadas en los parámetros espermáticos. Es así que el TYH como medio de almacenado dentro del proceso de la recuperación espermática epididimal, no tuvo efectos sobre los espermatozoides caninos, no mejoró los parámetros estudiados en los espermatozoides de esta especie. Por el contrario, en los felinos, la motilidad y el vigor espermático fueron en distintos periodos preservados más con TYH que con SF. Estos resultados concuerdan con estudios de Glover y Watson (1985) quienes determinaron que la YH provee una gran protección contra el shock de frío sobre los espermatozoides de eyaculados de gatos sometidos a enfriamiento a 4°C minimizando significativamente el descenso de la motilidad de estas células. Sin embargo, los mismos autores en un estudio posterior (1987) encontraron que la YH no incrementaba la supervivencia de espermatozoides felinos sometidos a 5°C. Contrariamente, Pukazhenthí y col., (1999), observaron que la motilidad en felinos fue mantenida en presencia de YH por largos períodos tanto en los controles como en los espermatozoides refrigerados. En síntesis, si bien los resultados son contradictorios, en nuestro estudio fueron claras las diferencias observadas entre felinos y caninos en relación al efecto del TYH, queda por explicar si la YH actuó como medio protector del shock térmico sobre las células epididimales felinas, con la consecuente mantención del medio interno epididimal, y/o finalmente sobre los propios espermatozoides de la cola del epidídimo; o bien, variando la curva de descenso de temperatura durante la refrigeración a 4°C modificando el pasaje del frío

desde la SF al epidídimo o desde la YH al epidídimo. Con respecto a las diferencias entre especies y dentro de un abanico de posibilidades que podrían haber influido sobre el efecto benéfico del TYH en una especie sí y en la otra no, podríamos mencionar las diferencias morfológicas (tamaño y espesor) de sus EPI que podrían modificar la magnitud de la influencia del medio de transporte y/o almacenado sobre los espermatozoides contenidos en su interior. Esta hipótesis concuerda con estudios previos en chinchillas cuyos EPI son más pequeños y más finos comparados con los del gato (Savignone y col., 2004a). En la *chinchilla laniger* el uso del TYH mejoró significativamente la motilidad, viabilidad y vigor de los espermatozoides almacenados en EPI por 24h comparados con aquellos almacenados en SF (Savignone y col., 2004b).

Es probable que los cambios autolíticos ocurridos en el epidídimo sean los responsables de la reducción de los parámetros espermáticos. Es probable que a pesar de que los espermatozoides estén dentro del epidídimo, los componentes de la YH mejoren la protección del órgano e indirectamente la que éste ejerce sobre los espermatozoides contenidos en su interior, preservando el medio ambiente epididimal y aumentando la calidad de los mismos al ser recuperados luego de un período de almacenado.

Nuestros resultados demuestran que los espermatozoides de felinos y caninos pueden ser recuperados luego del almacenado en EPI por 24h con una motilidad de alrededor del 60% de la inicial, con cerca del 80% de membranas integra y 60% de acrosomas intactos y con no menos de un 60% de espermatozoides vivos. Estos porcentajes en los parámetros espermáticos son interesantes a la hora de transportar material genético valioso de perros y gatos hasta un laboratorio en el cual se puedan implementar técnicas de reproducción asistida. Teniendo en cuenta que en ambas

especies, los EE recuperados a las 72h mostraron un descenso significativo en todos los parámetros estudiados en comparación con aquellos recuperados a las 24h, si fuera necesario hacer el envío de los órganos recomendamos hacerlo dentro de los EPI, refrigerados a 4°C y dentro de las 24h esperando obtener entre el 50 y el 60% de viabilidad. Considerando el efecto positivo del TYH, podemos aconsejar el uso del TYH para el transporte de EPI felinos.

CAPÍTULO III

TEMPERATURA ALCANZADA EN EL INTERIOR DEL EPIDÍDIMO LUEGO DE 24 HORAS DE ALMACENADO A 4°C EN DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE

INTRODUCCIÓN

Trabajos realizados en diferentes especies muestran que la temperatura de almacenado influencia la viabilidad espermática epididimal. Los estudios indican que la refrigeración del epidídimo a 4-5°C permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparada con el almacenado de estos órganos a temperatura ambiente (Kikuchi y col., 1998; Kishikawa y col., 1999; Foote, 2000; Kaabi y col., 2003). Trabajos realizados en ciervos, carneros y ratones indican que el almacenado de EPI a 4-5°C permite obtener mayor cantidad de espermatozoides viables que el almacenado a temperatura ambiente, probablemente por la disminución del metabolismo celular de los espermatozoides (Kishikawa y col., 1999; Salamon y Maxwell, 2000; Hishinuma y col., 2003; Kaabi y col., 2003;). En relación a estas observaciones, Sankai y col., (2001), encontraron que la motilidad y fertilidad de espermatozoides murinos almacenados a 5°C y 10°C disminuía en el tiempo con el aumento de la temperatura de almacenado, sugiriendo que estos cambios se relacionan con la variación en la actividad metabólica celular.

Durante los procesos fisiológicos ocurridos dentro del epidídimo sobre el espermatozoide éste se vuelve cada vez más susceptible a las especies reactivas de oxígeno (ROS) a las cuales está expuesto dentro del órgano. Las ROS causan

importantes daños sobre la membranas celulares, afectando principalmente su estructura lipídica. Angrimani y col., (2013) han postulado que el epidídimo protegería a los espermatozoides almacenados dentro del órgano mediante la producción y secreción de sustancias antioxidantes presentes en el plasma seminal. Las enzimas antioxidantes responsables de la reducción de ROS dentro del epidídimo serían superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Estos autores demostraron una correlación positiva entre SOD y la GPx; y entre la SOD y la motilidad espermática en el cuerpo y cola epididimal. Adicionalmente la actividad de la GPx fue mayor en la cola del epidídimo destacando la importancia de estas enzimas en la protección del espermatozoide durante el tránsito a lo largo del epidídimo.

Son conocidas las modificaciones que sufre la célula espermática en el epidídimo. Ha sido claramente definida la adquisición de motilidad, migración de la gota citoplásmica distal, remodelación del acrosoma y aumento del porcentaje de AI en la cola epididimal (Varesi y col., 2013). En la cabeza epididimal ocurre reabsorción y secreción de diferentes compuestos. El segmento medio (mayor parte de la cabeza y cuerpo) interviene en la maduración influenciado por la testosterona-dihidrotestosterona del epitelio epididimal. Las células no “nadan” por la luz del órgano sino que son transportadas por el músculo liso epididimal. El almacenado, como se ha mencionado, ocurre en la cola del epidídimo (Hafez, 2002).

Los espermatozoides epididimarios, potencialmente fecundantes en la cola del epidídimo, protegidos por la composición del fluido epididimal, son almacenados aquí hasta el momento de la eyaculación. Las células espermáticas son generadas de manera continua a nivel testicular y en el macho, sin eyaculaciones frecuentes,

pueden ser removidos de manera retrógrada hacia la vejiga y eliminados durante la micción (Man, 1964; Amann, 1989; Johnston y col., 2001).

Todo lo mencionado anteriormente muestra como los espermatozoides son protegidos y almacenados viables hasta la eyaculación. Asimismo varios trabajos demostraron que estas células se mantienen en la cola epididimal por horas y días posmortem o poscastración (Armas y col., 2011).

Hemos analizado la influencia de la temperatura de almacenado de los EPI y el posible efecto benéfico de conservar a los espermatozoides dentro del medio ambiente epididimal. Por otra parte, debemos recordar el daño que se produce sobre las células espermáticas cuando las mismas son sometidas a bajas temperaturas sin ningún tipo de protección. El estrés sufrido por las mismas durante el descenso de temperatura es conocido como shock de frío y puede instaurar daños irreversibles en las células, por lo que deben ser protegidas para soportar este tipo de estrés (Paulens, 1993; Watson, 1995). El shock térmico se manifiesta con pérdida irreversible de la viabilidad celular relacionada con el descenso de temperatura a 0°C. Esta alteración es causada por la disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana y se evidencia con la pérdida de motilidad espermática (Quinn y White, 1966). Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación debe realizarse cuidadosamente de manera de alterar lo menos posible la estructura lipídica de la membrana (Watson, 2000). Estos hallazgos podrían indicar que el epidídimo también interviene en la protección de la acción directa del frío sobre los espermatozoides y en la velocidad de enfriamiento celular.

Se ha demostrado que el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia. Por

lo tanto, durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico (White, 1993).

El epidídimo protegería a los espermatozoides del shock de frío directo. Kikuchi y col., (1998) propusieron que aunque las causas que influyen sobre la supervivencia de los espermatozoides dentro de los EPI a 4°C no están completamente definidas, una de ellas podría relacionarse con un factor protector del shock de frío presente en el fluido epididimal. La composición del líquido epididimal provee un medio ambiente especializado para la maduración de los espermatozoides, estando los fosfolípidos involucrados en este proceso (Evans y Setchell, 1979a,b). Dentro de ellos tienen relevancia la glicerofosfocolina (GPC), la fosfocolina y los fosfatos inorgánicos (Hinton y Setchell, 1980).

La fosfatidilcolina es uno de los principales constituyentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Este fosfolípido es también el componente más abundante de la fracción fosfatídica que puede extraerse de la YH. La fosfatidilcolina o lecitina resulta entonces un componente por un lado del fluido epididimal y por otro, de la YH. Por ser este fosfolípido una sustancia esencial para el mantenimiento de cada célula del organismo algunos investigadores, en modelos de roedores, han investigado el rol del mismo para desacelerar el envejecimiento oxidativo. La fosfatidilcolina protege a las células del stress oxidativo y de los radicales libres, incrementando por ejemplo, la síntesis celular de enzimas inactivadoras de derivados tóxicos del oxígeno (Mei-Chu Hung y col., 2001). Estos mecanismos protegerían a las células espermáticas y epiteliales epididimales del shock de frío.

Se ha descrito que la refrigeración produce cambios similares a la capacitación (Watson, 1996; Green y Watson, 2001); fenómeno observado a nivel de

la fluidez de la membrana y de las concentraciones celulares de iones, como el Ca^{+2} . El aumento intracelular de este ión durante la refrigeración es similar a los cambios ocurridos durante la capacitación, al igual que el fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Martins de Carvalho, 2005).

Quinn y White (1966), constataron que la fosfatidilcolina impide el influjo y la acumulación de Ca^{+2} en el espermatozoide de toro y carnero. También se demostró una débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (Quinn y col., 1980). Esta interacción entre la membrana espermática y las lipoproteínas de baja densidad de la YH (Watson, 1975), es la responsable del efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana (Pace y Graham, 1974; Foulkes, 1977; Watson, 1981).

Los estudios de Quinn y col. (1980) sobre la susceptibilidad de las células espermáticas al shock térmico demostraron que el efecto protector de la fosfatidilcolina exógena se debe a su interacción reversible con los fosfolípidos de las membranas espermáticas. En sus experimentos con espermatozoides lavados, la protección al shock térmico fue inmediata por la adición 0,5 o 1 mg/ml de fosfatidilcolina (Hellemann y Jara, 1997).

También se ha estudiado la velocidad de enfriamiento en relación al daño celular ocurrido. Asimismo se ha demostrado que la velocidad de enfriamiento se encuentra directamente relacionada con la densidad del fluido a enfriar. En relación a este fenómeno el TRIS se enfría más rápidamente que el TYH. Es así que los resultados obtenidos en el Capítulo II podrían deberse a diferentes velocidades de descenso de temperatura dentro de las colas epididimales de caninos y felinos durante el almacenado a 4°C.

El uso de un medio de almacenado para los EPI con el agregado de YH podría por un lado potenciar la protección brindada por el epidídimo sobre los espermatozoides y por otro lado, podría actuar protegiendo las membranas celulares del epitelio epididimal. Es así que un medio de almacenado que contenga YH podría mejorar la protección del shock de frío que el órgano ejerce sobre los espermatozoides así como también permitir una mayor sobrevivencia de la célula epididimal con el consecuente mantenimiento del medio interno del órgano. Todos estos factores aumentarían la viabilidad de los espermatozoides al ser recuperados luego de un período de almacenado.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto de diferentes medios sobre la temperatura alcanzada en el interior del epidídimo canino y felino luego de 24h de almacenado a 4°C.

HIPÓTESIS

- El uso de un medio de transporte para los EPI con el agregado de YH modificaría el descenso de temperatura dentro del órgano pudiendo mejorar la protección del shock de frío que el órgano ejerce sobre los espermatozoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento II

Animales experimentales y tratamientos

Se utilizaron testículos de 5 caninos adultos de entre 2 y 7 años de edad y de 5 gatos de entre 1 y 3 años de edad. Estos animales estaban incluidos en un plan de control de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral, un testículo y epidídimo de cada animal fue rápidamente colocados en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, (n= 5 EPI, de cada especie), y el otro testículo y epidídimo se colocó en TYH (n= 5 EPI, de cada especie). Las muestras se transportaron al laboratorio siguiendo el esquema del experimento I, se colocaron termocuplas dentro de las colas epididimales para luego ser almacenadas en heladera a 4°C. Se midió mediante termocupla y termómetro digital la temperatura en el interior de la cola epididimal una vez realizada la ablación, antes de la refrigeración a 4°C y luego de la misma cada 30 minutos hasta obtener temperatura interna epididimal constante.

El refrigerador contó con 1 termocupla de control de temperatura, registrándola en el interior del mismo, asegurando la estabilidad del aire interno de la heladera y un termómetro que aseguraba una temperatura de 4°C en el agua contenida dentro de un recipiente plástico.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron como se detalló en el Experimento I. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple entre la temperatura y el tiempo utilizando el PROC REG de SAS[®] (SAS[®] User Guide, 1996).

RESULTADOS

La temperatura dentro de los EPI descendió gradualmente hasta alcanzar valores cercanos a los 5°C cinco horas después de la llegada de los EPI al laboratorio, para estabilizarse y conservar la misma temperatura en la siguiente medición (Fig. 3.1). En los gatos, se observó un descenso más rápido de la temperatura dentro del epidídimo en comparación con los perros ($p < 0,001$; Fig. 3.1). Por otra parte, en los gatos, la temperatura obtenida dentro del epidídimo en cada medio en cada tiempo siempre tendió a ser más alta en los órganos almacenados en tris YH ($p = 0,097$; Fig. 3.2). Contrariamente, en los caninos no hubo diferencias en las curvas de descenso obtenidas al comparar los dos medios ($p = 0,95$; Fig. 3.3).

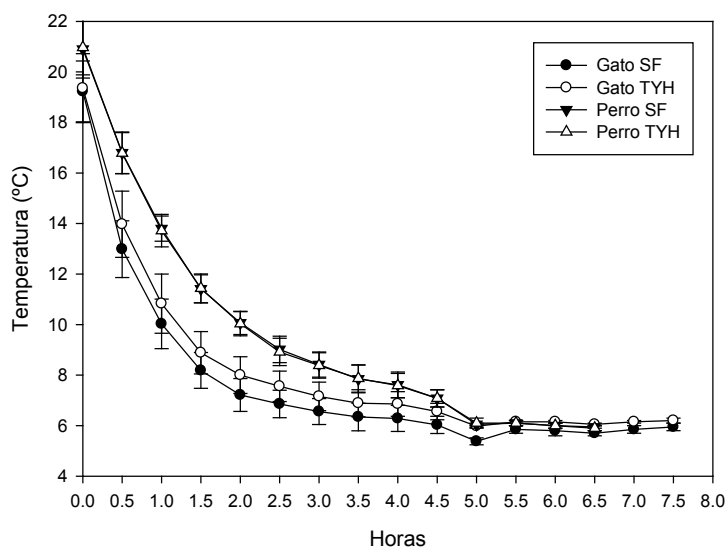


Figura 3.1. Curva de descenso de la temperatura dentro de colas de EPI sometidos a 4°C en dos especies y dos medios (SF, solución fisiológica; TYH, tris yema de huevo).

En gatos, el descenso de la temperatura en el tiempo dentro de las colas de EPI en SF y TYH fue explicado por una función polinomial de segundo grado (cuadrática; SF: $y = 15,6 + (-4,2)x + 0,41x^2$; $R^2 = 0,85$; Figura 3.2, panel medio; TYH: $y = 16,2 + (-4,1)x + 0,41x^2$; $R^2 = 0,87$; Figura 3.2, panel inferior). En perros, también,

el descenso de la temperatura en el tiempo dentro de las colas de EPI en SF y TYH fue explicado por una función polinomial de segundo grado (cuadrática; SF: $y=15,6 + (-4,2) x + 0,41 x^2$; $R^2=0,85$; Figura 3.3. panel medio; TYH: $y=16,2 + (-4,1) x + 0,41 x^2$; $R^2=0,87$; Figura 3.3. panel inferior).

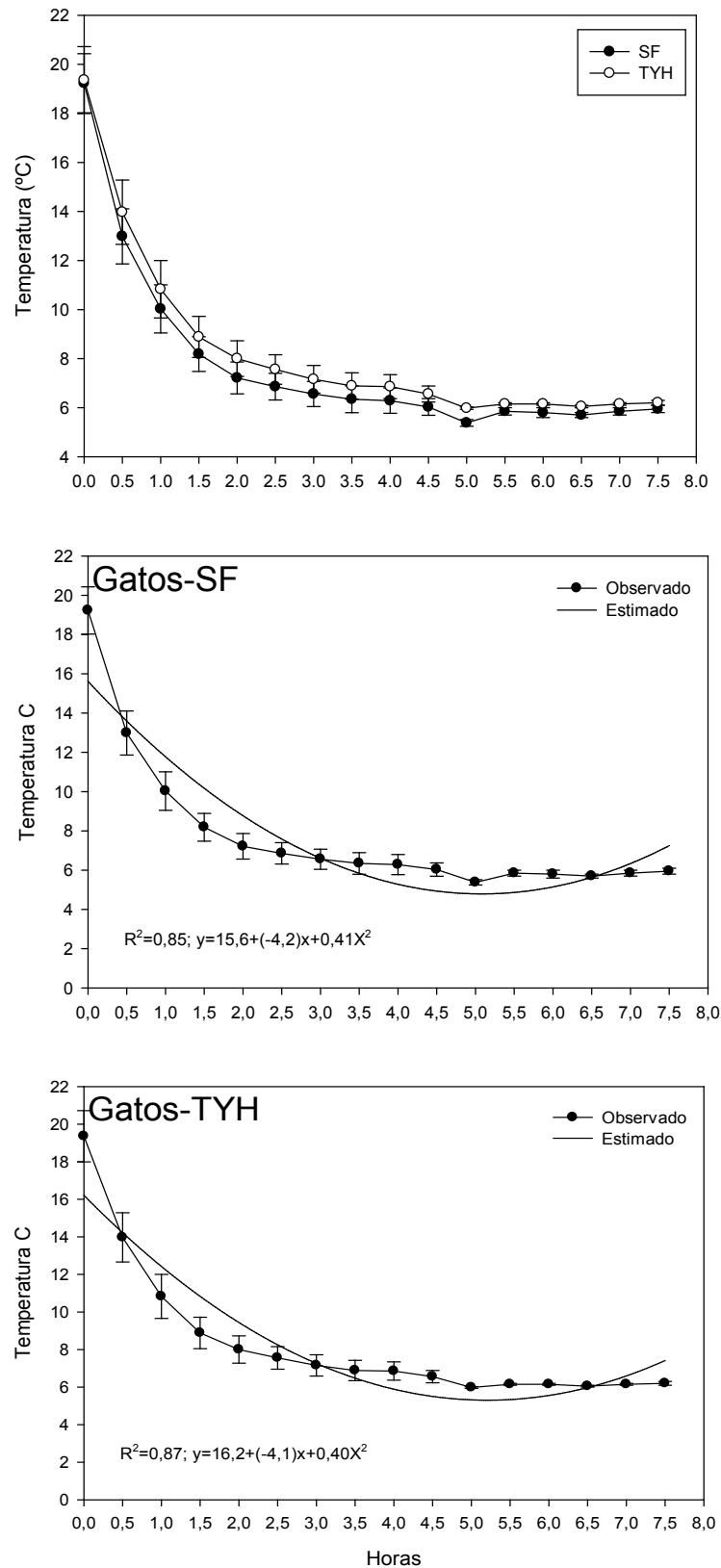


Figura 3.2. Curva de descenso de la temperatura (media \pm ES) dentro de colas de epidídimos felinos sometidos a 4°C en dos medios (SF, solución fisiológica; TYH, tris yema de huevo; panel superior) y análisis de regresión múltiple entre la temperatura y el tiempo utilizando un modelo polinomial (SF, panel medio; TYH, panel inferior).

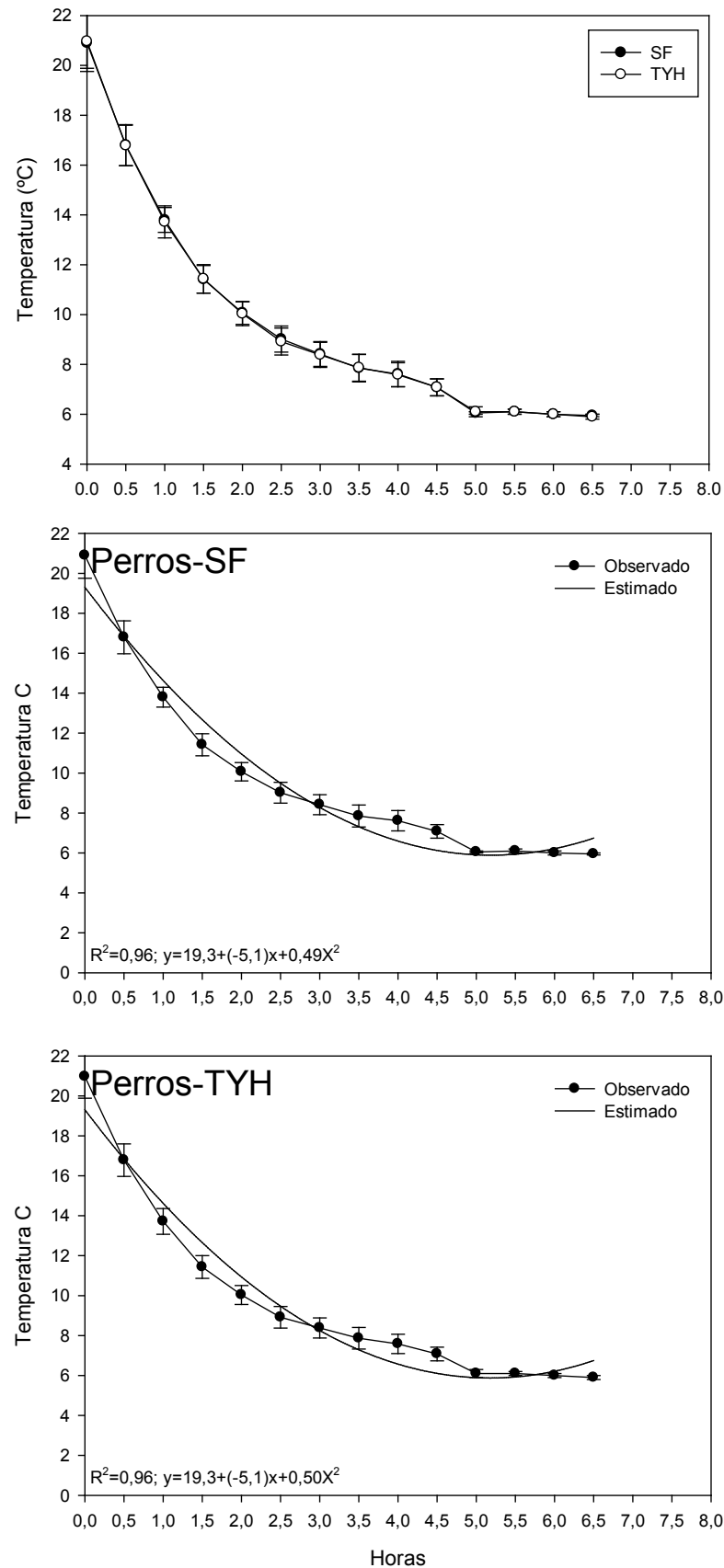


Figura 3.3. Curva de descenso de la temperatura (media \pm ES) dentro de colas de epidídimos caninos sometidos a 4°C en dos medios (SF, solución fisiológica; TYH, tris yema de huevo; panel superior) y análisis de regresión múltiple entre la temperatura y el tiempo utilizando un modelo polinomial (SF, panel medio; TYH, panel inferior).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Se ha estudiado ampliamente en la industria alimenticia que la velocidad de enfriamiento depende de la cantidad de alimento a enfriar y, que los alimentos de mayor tamaño toman más tiempo en enfriarse debido a la masa y volumen de los cuales debe ser removido el calor (Alvarado, 2009). El descenso más rápido de la temperatura dentro de los EPI de gatos en comparación con aquel ocurrido en los perros puede ser explicado por el menor tamaño de los EPI felinos. Durante la conservación de los EPI a 4°C la YH al aumentar la densidad del medio de almacenado, modifica la velocidad de enfriamiento del Tris y por lo tanto del epidídimo y su medio interno. La protección observada con la YH en los gatos podría relacionarse también con la curva de descenso de temperatura que ocurre en un medio de almacenado con este componente que posee mayor densidad que la SF y por lo tanto, menor velocidad de enfriamiento.

Por otra parte, en los felinos, la temperatura medida dentro del epidídimo en cada medio en cada tiempo siempre tendió a ser más alta en los órganos almacenados en TYH en comparación con los almacenados en SF. Esto podría explicarse, como se ha mencionado anteriormente, por la densidad del medio de almacenado ya que el TYH es más denso y por lo tanto se enfría más lentamente que SF. Este hecho sería el responsable de la diferente velocidad de enfriamiento en el interior de la cola epididimal en un medio en comparación con el otro.

En los caninos, no se observaron diferencias entre las curvas de descenso de temperatura intraepididimal al comparar los dos medios. Este hecho podría relacionarse con el mayor tamaño y espesor de la pared de los EPI caninos que aislarían el medio ambiente intraepididimal de los cambios externos de temperatura. Estos hallazgos concuerdan con los resultados del Capítulo II donde no hubo

diferencias en la calidad de espermatozoides caninos recuperados de EPI almacenados en los dos medios. Es así que en los EPI felinos de menor tamaño y pared más delgada, el TYH sumaría el efecto protector al que brinda solamente el órgano. Este efecto protector del TYH ha sido previamente observado en chinchillas en las cuales los EPI almacenados en TYH tuvieron mejores parámetros espermáticos en todas las variables estudiadas comparados con aquellos almacenados en SF (Savignone y col., 2004b). La mejor calidad observada en todos los parámetros en TYH en chinchilla en comparación con la mejor calidad observada sólo en algunos parámetros en TYH en el gato podría relacionarse con el menor tamaño y espesor de la pared epididimal de la chinchilla en relación con el gato. Es así que en la chinchilla el TYH ejercería mayor efecto protector sobre las células del interior del órgano.

El Experimento I se demostró que el TYH permite recuperar mayor cantidad de EE viables que la SF en felinos. Sin embargo, este hecho no fue observado en caninos. Las diferencias halladas en ese experimento concuerdan con las diferentes curvas de descenso de temperatura obtenidas entre las dos especies y la tendencia a observarse un descenso de temperatura más lento dentro de los EPI almacenados en TYH en felinos.

El shock térmico que altera las distintas membranas celulares puede afectar tanto a las membranas del espermatozoide como a las membranas de la célula epididimal. Adicionalmente, es conocido que la susceptibilidad al choque térmico varía entre las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles, hecho que se evidencia por sus marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación intracelular de Ca^{+2} y pérdidas de K^{+} y Mg^{2+} (Quinn y White, 1966; De Leeuw y col., 1990). Por el contrario, los

espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidencian alteraciones tan notorias (Quinn y White, 1966; Martins de Carvalho, 2005). Una posible explicación a estas disparidades estaría dada por las diferencias en la composición lipídica de las distintas membranas plasmáticas en cada especie, esto es, los fosfolípidos y los ácidos grasos (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974). De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y carnero, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada proporción entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados (2,5:3,3) mientras que espermatozoides de conejo y hombre presentan una proporción menor (1:1). Dicha proporción tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionada con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973). Este hecho permitiría hipotetizar que la influencia sobre las membranas de otras células diferentes al espermatozoide también podría ser variable. Por lo tanto, la protección del shock térmico que ejerce el TYH sobre los EEfelinos podría deberse, como mencionamos; a la delgadez de la pared del epidídimo, a la propia composición de la membrana espermática o de la célula epididimal, o a ambos factores. Por el contrario, el mayor grosor epididimal en caninos reduciría el efecto protector del TYH ya que por sí mismo, el órgano ejerce una mayor protección de los espermatozoide al shock térmico; no permitiendo la manifestación del efecto benéfico del medio de almacenado sobre los EE. Asimismo las diferencias en la composición lipídica de la membrana de ambas especies podrían ser las responsables de las diferencias observadas.

Los resultados obtenidos indican que el tamaño del órgano y espesor de la pared epididimal estarían relacionadas con la expresión del efecto protector del TYH en los órganos de pared más delgada (gatos y chinchillas) y no en los de pared más

gruesa (perros). Asimismo el efecto del TYH sobre la supervivencia de las células epiteliales epididimales y el mantenimiento del medio interno del epidídimo podría influenciar la supervivencia espermática dentro de los órganos almacenados a 4°C. Un estudio sobre el efecto del TYH sobre la supervivencia de las células epididimales en ambas especies permitiría arribar a una conclusión más certera respecto al efecto benéfico de este medio de almacenado en comparación con la SF en los gatos.

CAPÍTULO IV

EFEECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE SOBRE EL PROCESO DE AUTÓLISIS DE LAS CÉLULAS EPIDIDIMALES DURANTE EL ALMACENADO DEL ÓRGANO A 4°C DURANTE 24, 48 Y 72 HORAS

INTRODUCCIÓN

El epidídimo es una estructura tubular donde desembocan los conductos eferentes, posee un recorrido muy tortuoso que desemboca en el conducto deferente. Tiene actividad absortiva y secretora, recibe y almacena los espermatozoides produciendo en ellos cambios morfológicos, fisiológicos y madurativos. Se divide morfológica e histológicamente en 5 zonas donde las zonas IV y V corresponden a la cola epididimal (parte proximal y distal respectivamente), Axnér y col. (1999) sin embargo, divide el EPI del gato en 6 zonas, correspondiendo la última a la cola epididimal. La transición entre las zonas es gradual por lo cual se produce un solapamiento de las características morfológicas entre zonas adyacentes. Está constituido por un epitelio cilíndrico seudoestratificado con tres tipos celulares: células principales, basales y apicales. En el gato se ha observado al MO la presencia de células principales claras y oscuras (Axnér, 1999). En el perro se han identificado al ME células claras en la porción media y terminal de la cola. Estas células poseen vesículas poco densas de varios tamaños con cuerpos electrodensos y lisosomas en la región supranuclear (Schimming y Vicentini, 2001). Las células principales, son las más abundantes en ambas especies, están presentes en todas las zonas del epidídimo. Son células altas que pueden extenderse desde la lámina basal hasta la luz del túbulo.

La posición y forma de su núcleo es variable aunque suele ser redondeado con uno o dos nucleolos evidentes, posee esterocilias regulares (inmóviles), cortas y densas, formando un ribete en cepillo. La actividad absorptiva se refleja con la presencia de vesículas y cuerpos vesiculares más numerosos en el gato. Realizan también una secreción apócrina, rica en proteínas, en forma de exosomas (epididimosomas) hacia la luz epididimal. Estas células seleccionan a los espermatozoides, modifican sus membranas celulares y su estructura, proceso en el que colaboran los macrófagos presentes en el epitelio epididimal y no en la luz del mismo (Sullivan y Saez, 2013). Las células principales poseen retículo endoplásmico rugoso (RER) laminar bien desarrollado, Golgi ancho y supranuclear, poblaciones de mitocondrias heterogéneas a lo largo del citoplasma y abundantes cuerpos densos que al microscopio electrónico muestran gran cantidad de lisosomas. Las células basales y apicales son menos frecuentes en la cola y sin características distintivas en relación a las otras zonas (Arrighi y col., 1986; Schimming y Vicentini, 2001).

Los avances obtenidos en biotecnología de la reproducción en pequeños animales han sido sustanciales para avanzar en el conocimiento de la fisiología reproductiva de félidos y cánidos silvestres. Este hecho ha permitido mejorar las técnicas de reproducción asistida que ayudan a conservar animales amenazados o en peligro de extinción. La recuperación y la criopreservación de espermatozoides de los EPI obtenidos ya sea luego de la muerte de un animal (recuperación post-mortem), o luego de una orquiectomía, nos permiten preservar las gametas masculinas generando y manteniendo bancos de material genético.

En muchas ocasiones, la única opción para la recuperación de gametas es el transporte de los testículos y EPI a un laboratorio que esté equipado para el procesamiento de semen. Las condiciones de almacenado de los EPI como por

ejemplo el tiempo y el medio de almacenado influyen en la cantidad de espermatozoides viables recuperados en caninos y felinos (Gañán, 2009). Este hecho pudo evidenciarse en los resultados obtenidos en el Experimento I.

Los espermatozoides pueden sobrevivir durante algún tiempo dentro de los EPI de animales muertos y los cambios en la calidad del fluido epididimal y de los EE, acompañan a los cambios posmortem del organismo. Songsasen y col. (1998), determinó que la integridad de membrana de EE recuperados de ratones sacrificados y mantenidos a temperatura ambiente por más de 24h, fue similar a aquella de los EE recuperados inmediatamente luego de la muerte. Por su parte, Kishikawa y col. (1999) demostraron que si los cadáveres de los ratones se cubrían con bolsas plásticas para prevenir la deshidratación y se conservaban a 4°C, la recuperación espermática podía arrojar buenos resultados aun varios días después de la muerte (65% de motilidad, 5 días posmortem). Esto demuestra que los EE pueden conservarse viables dentro del epidídimo luego de la muerte del animal por diferentes periodos.

La motilidad de los espermatozoides de un eyaculado canino sin diluir refrigerado a 4°C baja de 92% a las 24h a 37% luego de las 48h de almacenado (Morton y Bruce, 1989). Yu y Leibo (2002), encontraron que la motilidad de los EE baja significativamente a las 5h de almacenados los EPI a 4°C. Estos estudios muestran la mayor sensibilidad los EE al shock térmico en comparación con los del eyaculado a pesar de estar los primeros protegidos, del frío directo, dentro del epidídimo durante la refrigeración. Es así que se ha demostrado ampliamente que el almacenado de los EPI a 4°C, permite conservar la viabilidad de los espermatozoides almacenados en su interior (Stilley y col., 2000; Sankai y col., 2001; Kaabi y col., 2003). Si bien como hemos mencionado anteriormente los espermatozoides dentro

del epidídimo estarían protegidos del shock térmico directo durante el refrigerado (Sankai y col., 2001, Yu y Leibo, 2002), la incorporación de un medio de almacenado aumentaría esta protección. Asimismo, el medio de almacenado actuaría previniendo la deshidratación del epidídimo, mejorando la conservación de este órgano y manteniendo las características del medio interno epididimal lo que redundaría en una mejor conservación de los espermatozoides (Kishikawa y col., 1999; Sankai y col., 2001).

Está demostrado, que luego de la muerte se inicia rápidamente un proceso de autodigestión y disolución tisular como resultado de la acción de enzimas liberadas desde el citoplasma de las células. La autólisis se inicia como consecuencia de la hipoxia que produce cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana celular y de las organelas membranosas. Es así, que inicialmente se liberan hidrolasas lisosomales a las que se les suman otras enzimas hidrolíticas. A este proceso de autólisis le sucede la putrefacción. Los fenómenos autolíticos se presentan más rápidamente en aquellos tejidos con mayor contenido de enzimas como por ejemplo las células de la hilera seminal y a su vez, están influenciados por factores endógenos y exógenos muy variados (Kitt y Schulz, 1985). Uno de estos factores es la temperatura, el frío (almacenado a 4°C) inhibe el proceso de autólisis mientras que las altas temperaturas lo aceleran. Es así que el mantenimiento del calor corporal acelera los procesos autolíticos (Kitt y Schulz, 1985). En síntesis, la muerte da inicio a los procesos autolíticos, por anoxia celular, alteración de membranas, y liberación enzimática, este proceso se incrementa con el mantenimiento de la temperatura corporal, acelerando el paso hacia la putrefacción tisular.

En el examen histológico de EPI obtenidos luego de distintos periodos posmortem reveló que los cambios autolíticos epididimales se evidencian a las 12h

posmortem. Estos cambios incluyen “pícnosis”, liberación del contenido intracelular e interrupción de los puentes intercelulares de las células germinales (Sonsagen y col., 1998). Considerando que estos cambios posmortem se presentan en el epidídimo, el mantenimiento de la integridad celular de este órgano con la consecuente preservación de su medio interno, permitiría recuperar mayor cantidad de espermatozoides viables almacenados en su interior. El objetivo primordial del almacenado epididimal es mantener la viabilidad de las células espermáticas contenidas en los EPI posmortem. La viabilidad de los EE depende de diferentes factores a saber: el medio de almacenado usado para los órganos, la temperatura de conservación del epidídimo, y el tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la recuperación de los EE.

La refrigeración a 4°C para preservar los órganos, frena los procesos autolíticos posmortem suprimiendo el metabolismo y la actividad de las enzimas catabólicas. El descenso de temperatura enlentece la actividad enzimática disminuyendo los requerimientos de oxígeno e incluso anulándolo por debajo de los 0°C (Levy, 1959). El descenso de la actividad celular con consumos mínimos de ATP es fundamental para controlar las cascadas de la lesión isquémica (Southard y col., 1980). La mayoría de las enzimas en los animales normotérmicos reducen su actividad de 1,5 a 2 veces por cada 10°C de descenso de la temperatura, pero todavía hay una importante actividad a 1°C (Clavien y col., 1992; Belzer y col., 1995). Por ello, enfriando el órgano de 37°C hasta 2-4°C, puede alargarse el tiempo de preservación por un período de 12-13h (Clavien y col., 1992). Este período de almacenado puede alargarse de forma significativa sí, además, se utiliza una solución de preservación apropiada (Collins y col., 1969).

Con respecto a las soluciones de preservación se han estudiado medios que permitan preservar la viabilidad de órganos utilizados para trasplantes, de manera de asegurar el éxito de esta práctica médica. Estos medios de almacenado y transporte de órganos a trasplantar poseen una serie de sustancias que les confieren propiedades nutritivas. Estos medios están compuestos por sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, azúcares y otras sustancias, con el fin de mantener la presión oncótica, evitar el edema celular, frenar el metabolismo, evitar la oxidación celular y retrasar consecuentemente la destrucción celular y tisular (Escalante Cobo y del Río Gallegos, 2009).

Es así entonces, que un medio de almacenado que permita preservar los tejidos epididimales y enlentecer la muerte celular favorecería en forma indirecta la sobrevivencia de los espermatozoides contenidos en su interior. En síntesis, la conservación de la homeostasis de las células del epitelio epididimal permitiría mantener potencialmente fértiles a las células espermáticas dentro de la luz del epidídimo.

Por consiguiente, un medio de almacenado epididimal como el TYH que posee ácido cítrico que controla el pH y es antioxidante; Tris base, tris (hidroximetil aminometano), que establece el equilibrio ácido base (tampón); fructosa monosacárido que la célula utiliza como fuente de energía, 20% de YH, poderosa fuente de vitaminas y minerales que contiene vitaminas A, E, D, ácido fólico, B12, B6, B2, B1 y posee efecto protector del shock térmico celular, y por último penicilina para inhibir el desarrollo bacteriano sería útil para retrasar los procesos autolíticos y conservar la viabilidad de las células epididimales.

Como han comunicado otros autores y se ha demostrado en el CAPÍTULO II en los felinos, el medio en el que se almacenan los EPI tiene influencia sobre la

calidad de las células espermáticas recuperadas (Yonai y col., 1998). Este hecho podría deberse a la diferente viabilidad de las células epididimales durante el almacenado y evidenciarse a través de cambios morfológicos celulares.

Considerando que la autólisis posmortem se lleva a cabo en todas las células del organismo induciendo alteraciones (Myers y McGavin, 2007), el estudio morfológico y ultraestructural de las células epididimales haría posible evaluar el daño ocurrido en ellas durante el almacenado de los EPI posmortem y estimar su potencial para mantener viables a los espermatozoides contenidos en el medio interno epididimal.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto de diferentes medios sobre los cambios histológicos y ultraestructurales en las células principales de EPI caninos y felinos durante el almacenado del órgano a 4°C.

HIPÓTESIS

- El TYH enlentece la autólisis de las células epiteliales favoreciendo indirectamente la sobrevivencia de los EE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento III

Animales experimentales y tratamientos

Se utilizaron testículos de 13 caninos adultos, en estado de salud de entre 2 y 7 años de edad y de 13 gatos, en estado de salud de entre 1 y 3 años de edad. Estos animales formaron parte de un plan de control de la reproducción. En cada especie, luego de la orquiectomía bilateral, los testículos con sus correspondientes EPI se dividieron aleatoriamente en 3 lotes. En el primer lote se incluyeron 4 EPI derechos de cada animal y de cada especie (n= 4). Las colas epididimales se separaron y se fijaron inmediatamente luego de la ablación para la realización del estudio morfológico. En el segundo lote, 9 testículos derechos de cada especie (n= 9) fueron rápidamente colocados en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, y en el tercer lote, 9 testículos izquierdos de cada especie (n= 9) se colocaron rápidamente en TYH. Las muestras de los lotes 2 y 3 se transportaron al laboratorio en heladera de poliuretano con refrigerantes para luego ser almacenadas en heladera a 4°C. Los testículos y EPI de los lotes 2 y 3 fueron almacenados en uno de los 3 períodos (24, 48 ó 72h) con una distribución aleatoria en cada tratamiento (3 animales/especie/tratamiento; Fig. 4.1)

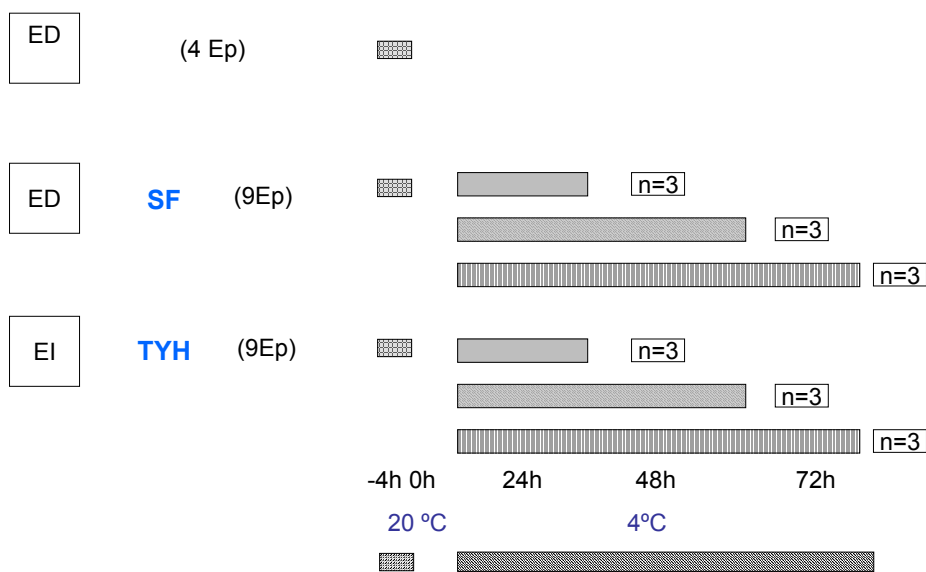


Figura 4.1. Diseño experimental por especie. ED: epidídimo derecho, EI: epidídimo izquierdo.

Se evaluaron los cambios autolíticos ocurridos en las colas de los EPI a las 24, 48 y 72 h de almacenado mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (Hayat, 1986). El estudio se realizó sobre las células principales del epitelio epididimal, siguiendo los pasos detallados a continuación.

Microscopía óptica y Microscopía electrónica de transmisión

Las colas de los EPI de cada animal se cortaron en pequeñas piezas (1mm^3), se fijaron por inmersión con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,3) durante 2 h a 4°C y se posfijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 1h. A continuación, las muestras se deshidrataron en una escala creciente de alcoholes y posteriormente se incluyeron en resina Epon. Como orientación para la selección de campos, se realizaron cortes semifinos ($1\ \mu\text{m}$) que se colorearon con azul de

toluidina, se observaron y se fotografiaron en un microscopio óptico (1000X) con sistema de video incorporado conectado a una PC. Estos cortes se utilizaron para el estudio histológico donde se observaron las características nucleares y la morfología de las estereocilias realizando una tabla ad-hoc clasificando los cambios celulares en grados del 0 al 3 desde características celulares normales, pasando por daños compatibles con lesiones iniciales hasta llegar a daños celulares avanzados (Tabla 4,1 y 4,2; Figuras 4.2 y 4.3) (Myers y McGavin, 2007).

Se realizaron cortes ultrafinos (90 nm) de los campos seleccionados, con un ultramicrotomo Súper Nova Reichert-Jung (Wien, Austria) y se montaron en grillas de cobre (200 mesh). Luego se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd. Tokio, Japón). Las imágenes observadas se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA).

Sobre estos cortes ultrafinos dentro del estudio ultraestructural se evaluó la distribución de la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias, y se clasificaron con una tabla ad- hoc en grados del 0 al 3 (Tabla 4.3; Figuras 4.4 y 4.5).

Tabla 4.1. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos felinos.

Grados	Características nucleares	Morfología de estereocilias
0	Eucromatina	Morfología normal (homogéneas)
1	Cromatina condensada en gránulos	Heterogéneas
2	Condensada en gránulos, morfología nuclear irregular	Agrupadas en su base
3	Pérdida de cromatina “núcleo fantasma”	Rotas, destruidas o perdidas

Adaptado de: Arrighi y col., 1986; Myers y McGavin, 2007.

Tabla 4.2. Grados de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos caninos.

Grados	Características nucleares	Morfología de estereocilias
0	Eucromatina	Morfología normal (heterogéneas)
1	Cromatina condensada en gránulos	Agrupadas en su base
2	Condensada en gránulos, morfología nuclear irregular	Rotas, destruidas o perdidas
3	Pérdida de cromatina “núcleo fantasma”	

Adaptado de Arrighi y col., 1986; Myers y McGavin, 2007

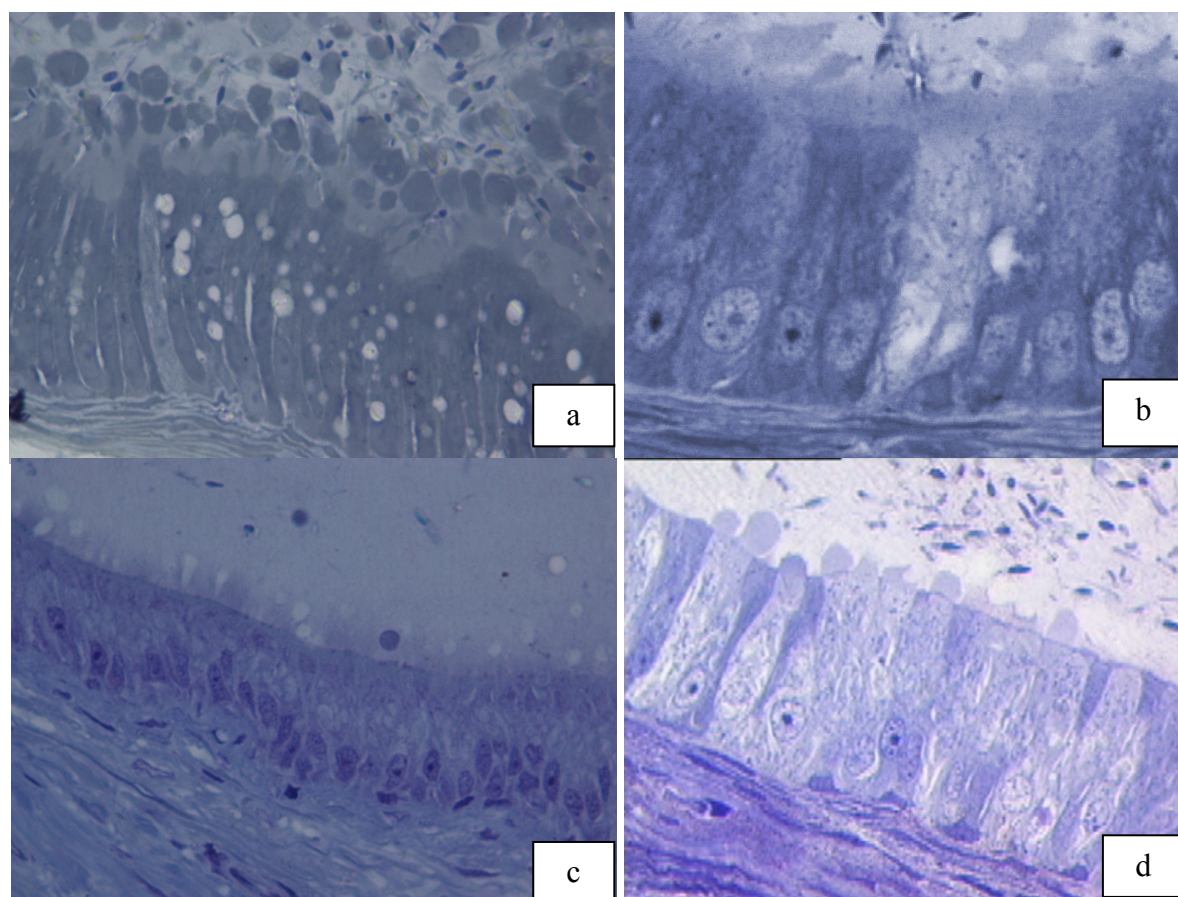


Figura 4.2. Grados (G) de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos felinos, a) G0, Eucromatina y estereocilias normales (homogéneas); b) G1, Cromatina condensada en gránulos y estereocilias heterogéneas; c) G2, Cromatina condensada en gránulos, morfología nuclear irregular, y estereocilias agrupadas en su base; d) G3, Pérdida de cromatina “núcleo fantasma” y estereocilias rotas o perdidas, Azul de toluidina, Obj, 100X.

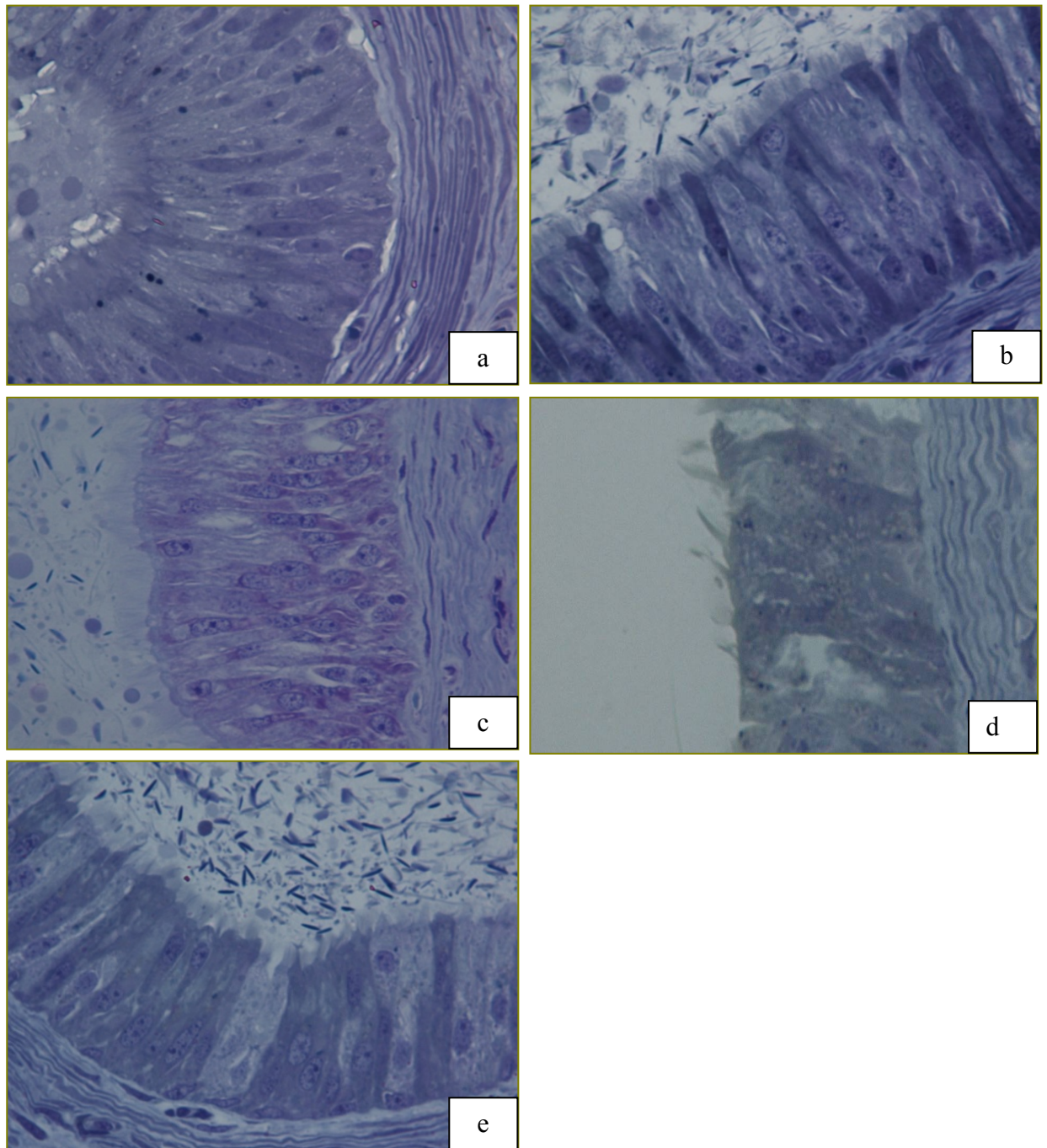


Figura 4.3. Grados (G) de cambios histológicos de características nucleares y morfología de estereocilias en células principales de epidídimos caninos, a) G0, Eucromatina y estereocilias normales (heterogéneas); b) G1, Cromatina condensada en gránulos y estereocilias agrupadas en su base; c) G2, Cromatina condensada en gránulos, morfología nuclear irregular, d) estereocilias rotas, destruidas o perdidas; e) G3, Pérdida de cromatina “núcleo fantasma”, Azul de toluidina, Obj, 100X.

Tabla 4.3. Grados de cambios ultraestructurales de la distribución de la cromatina nuclear y morfología de las estereocilias en células principales de epidídimos felinos y caninos

Grados	Distribución de cromatina nuclear	Morfología de estereocilias
0	Núcleo normal, eucromático	Morfología normal
1	Grandes gránulos. En parte dispersa y en parte marginal	Agrupadas en su base
2	Pequeños gránulos. En parte dispersa y en parte marginal	Escasas y desparejas
3	Fragmentada, Nucleoplasma claro	Destruídas o perdidas

Adaptado de Arrighi y col., 1986; Myers y McGavin, 2007.

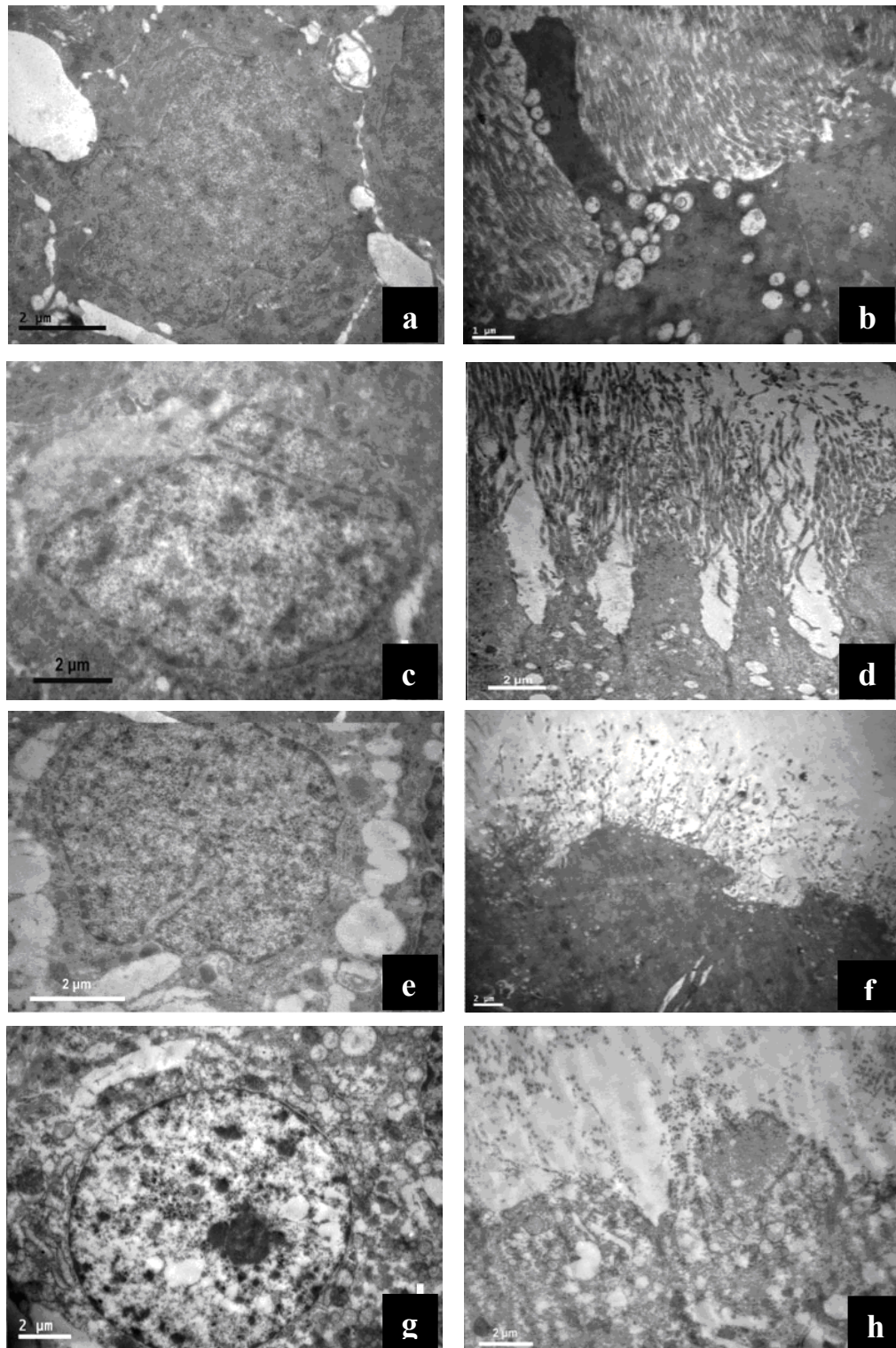


Figura 4.4. Grados (G) de cambios de cromatina nuclear (a, c, e, g) y morfología de estereocilias (b, d, f, h) a nivel ultraestructural de células epididimales felinas, a) G0, núcleo normal; b) G0, estereocilia normal; c) G1, Grandes gránulos de cromatina, en parte dispersa y en parte marginal; d) G1, estereocilias agrupadas en su base; e) G2, Pequeños gránulos de cromatina, en parte dispersa y en parte marginal; f) G2, estereocilias escasas; g) G3, cromatina fragmentada, nucleoplasma claro; h) G3, destruidas o perdidas.

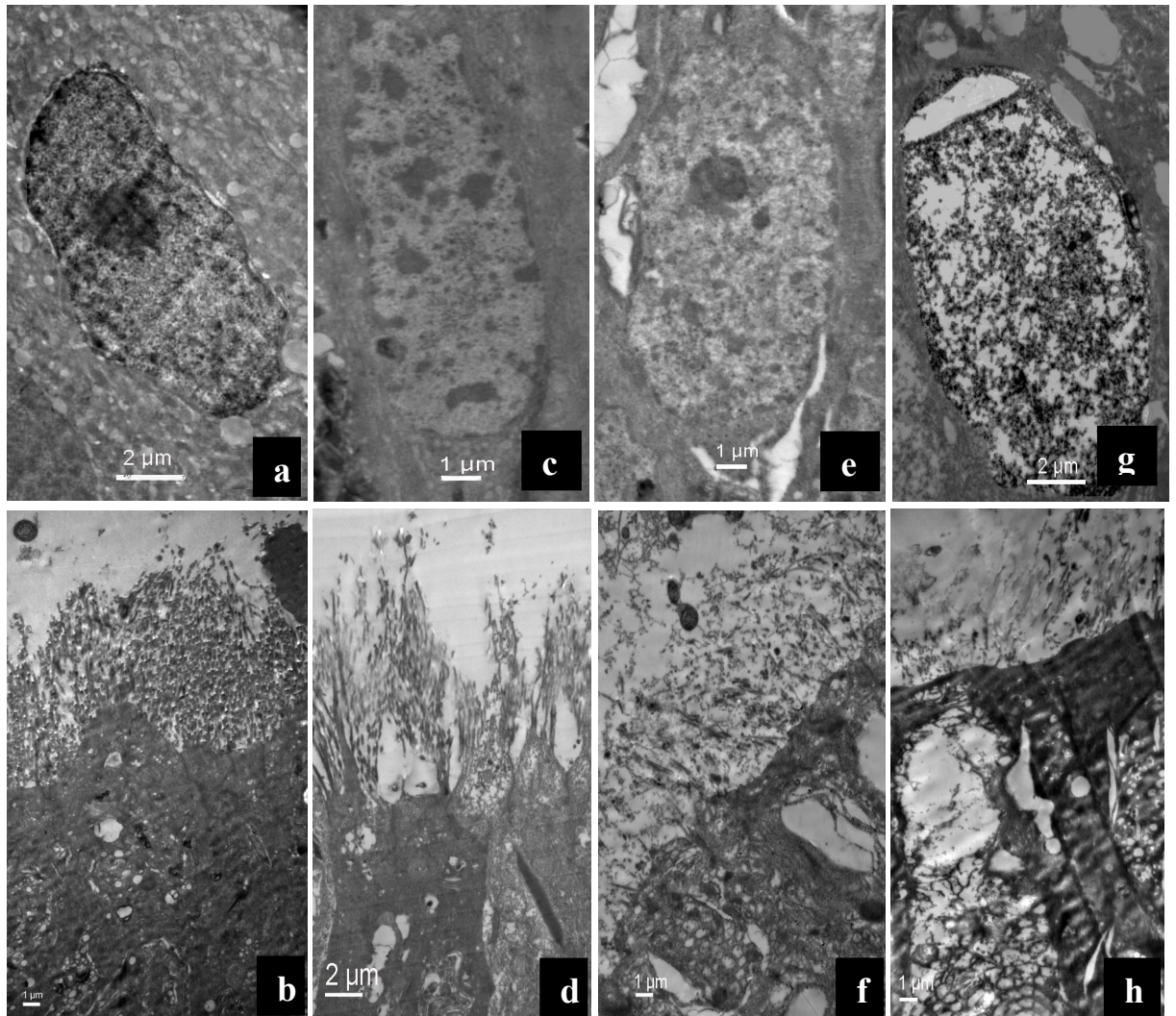


Figura 4.5. Grados (G) de cambios de cromatina nuclear (a, c, e, g) y morfología de estereocilias (b, d, f, h) a nivel ultraestructural de células epididimales caninas, a) G0, núcleo normal; b) G0, estereocilia normal; c) G1, Grandes gránulos de cromatina, en parte dispersa y en parte marginal; d) G1, estereocilias agrupadas en su base; e) G2, Pequeños gránulos de cromatina, en parte dispersa y en parte marginal; f) G2, estereocilias escasas; g) G3, cromatina fragmentada, nucleoplasma claro; h) G3, destruidas o perdidas.

Análisis morfométrico ultraestructural

El análisis morfométrico de las microfotografías electrónicas se realizó mediante un analizador de imágenes Image J 1,43e (Ferreira y Rasband, 2010). Se registraron los parámetros morfológicos en 360 microfotografías por especie que permitieron el análisis de los cambios observados en las colas epididimales ($n = 44$). Se realizaron estudios morfométricos sobre el número de mitocondrias (NM), el área mitocondrial (AM), el número de núcleos (NN) y el área nuclear (AN), tomando como referencia una unidad de área citoplasmática fija de $50 \mu\text{m}^2$ para el análisis de área y número de mitocondrias, y una unidad de área citoplasmática fija de $100 \mu\text{m}^2$ para el análisis de área y número de núcleos. Las unidades de área citoplasmáticas fijas se establecieron de esa manera debido a que en microscopía electrónica se visualizan escasas células o una porción de la célula en estudio. Las diferencias de las áreas tomadas como referencia se deben al tamaño de lo que se mide. Para poder medir organelas se trabaja con mayores aumentos, lo que facilita su observación y medición por lo tanto el área citoplasmática comprendida es menor. En contraposición, para ver los núcleos completos se trabaja a menor aumento, por lo que el área citoplasmática observada es mayor.

Por otro lado, dicha unidad de área citoplasmática fija permitió realizar la comparación mediante análisis estadístico de los distintos tratamientos. Cada uno de los parámetros morfológicos analizados se delineó de modo manual sin utilizar el delineado automático que posee el programa Image J, a fin de no incluir áreas de espacio intercelular y asegurar una mayor precisión en el registro de los mismos.

Cada microfotografía individual se calibró mediante una barra de escala (μm de longitud) presente en cada una de ellas según su magnificación, con el fin de unificar la escala de medición de la microfotografía ampliada.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas entre los diferentes tratamientos para variables cuantitativas fueron realizadas utilizando el Análisis de Varianza con el procedimiento GLM de SAS® y para variables cualitativas fueron realizadas utilizando el procedimiento GENMOD de SAS ® (SAS 1996). Los parámetros morfológicos fueron expresados como la media \pm E.S. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

En los felinos, el estudio histológico reveló que los parámetros cambiaron con el tiempo y el medio ($p < 0,01$). Se observó un efecto significativo del tiempo (Fig. 4.6) en las características nucleares y la morfología de las estereocilias (0 vs. 72 h; $0 \pm 0,12$ vs. $2,66 \pm 0,13$, $p < 0,01$; $0 \pm 0,26$ vs. $2,66 \pm 0,31$, $p < 0,01$; respectivamente).

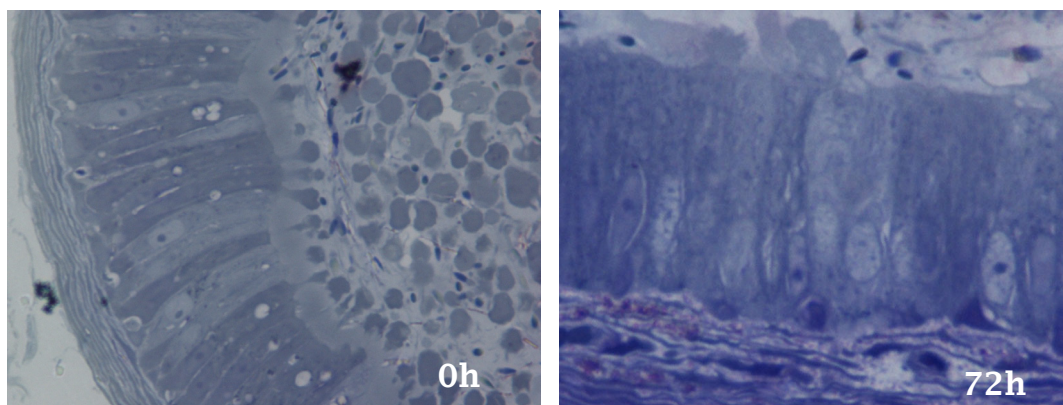


Fig. 4.6: Cambios morfológicos en epidídimos **felinos** entre 0 y 72 **horas** (h)

Cuando se estudió el efecto de los medios de almacenado (Fig. 4.7), los grados de cambios morfológicos en las estereocilias y de las características nucleares fueron mayores en SF que en TYH ($1,33 \pm 0,12$ vs. $1,16 \pm 0,13$, $p < 0,05$; $1,71 \pm 0,30$ vs. $1,38 \pm 0,3$, $p < 0,05$; respectivamente).

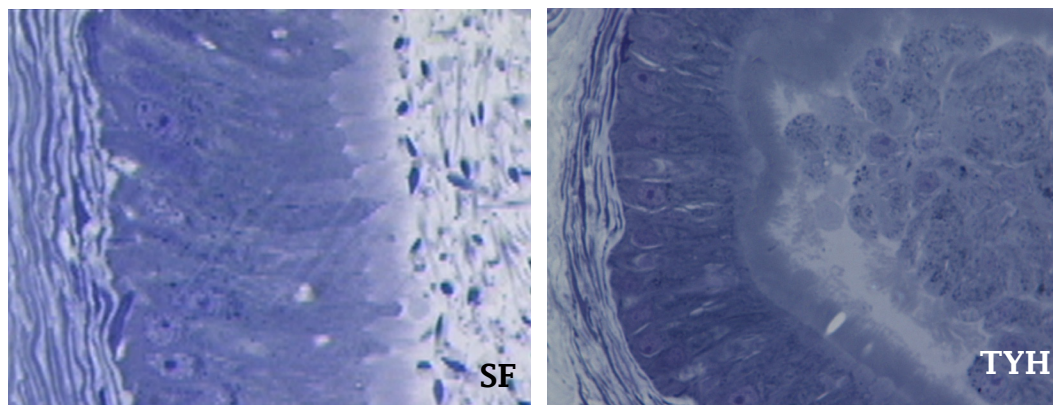


Fig.4.7: Cambios morfológicos de núcleos y estereocilias de epidídimos **felinos** en dos **medios**: Solución fisiológica (SF) y Tris yema de huevo (TYH).

En el estudio ultraestructural, la distribución de la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias cambió con el tiempo (0 vs. 72 h, $0 \pm 0,13$ vs. $1,50 \pm 0,15$, $p < 0,01$; $0,00 \pm 0,17$ vs. $1,66 \pm 0,20$, $p < 0,01$; respectivamente) y entre los distintos medios de almacenado (SF vs. TYH, $0,93 \pm 0,09$ vs. $0,73 \pm 0,09$, $p < 0,01$; $1,40 \pm 0,12$ vs. $0,86 \pm 0,12$ $p < 0,01$; respectivamente). Fig. 4.8 y 4.9 respectivamente.

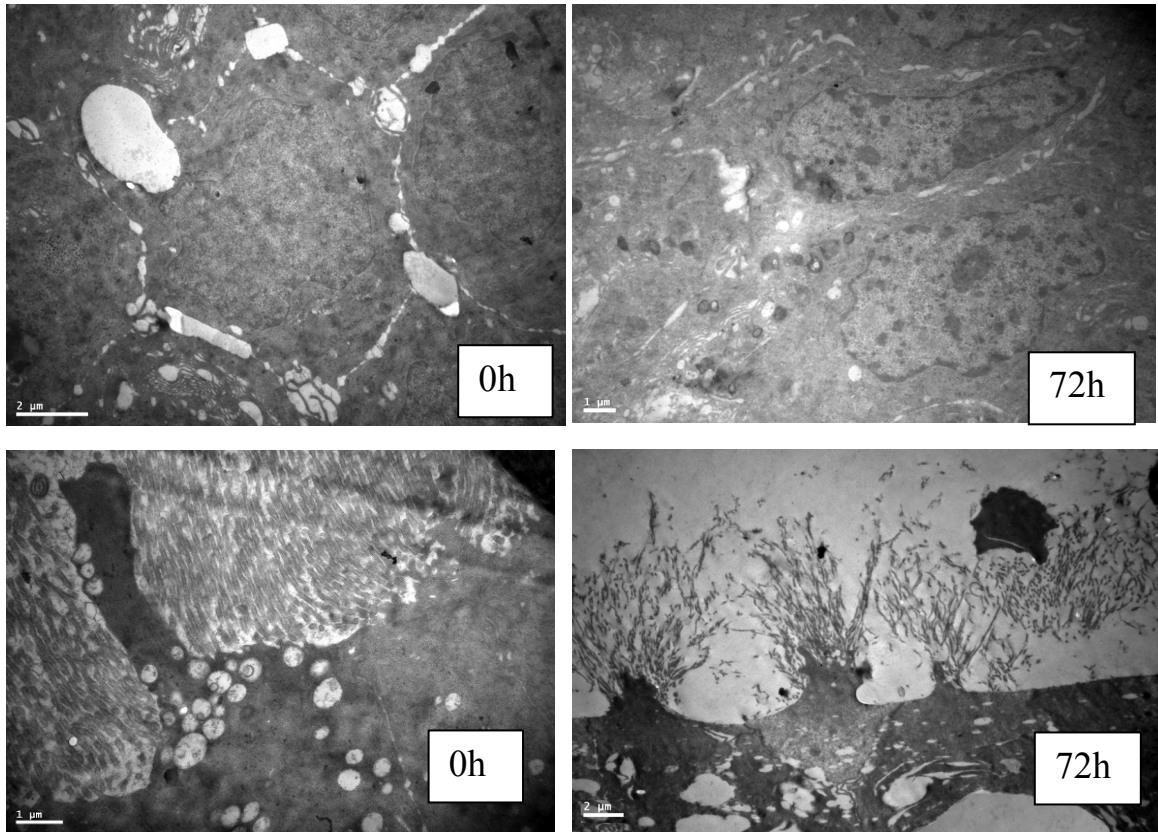


Fig. 4.8: Microfotografía de cambios en núcleos y esterocilias de epidídimos felinos entre 0 y 72 horas (h).

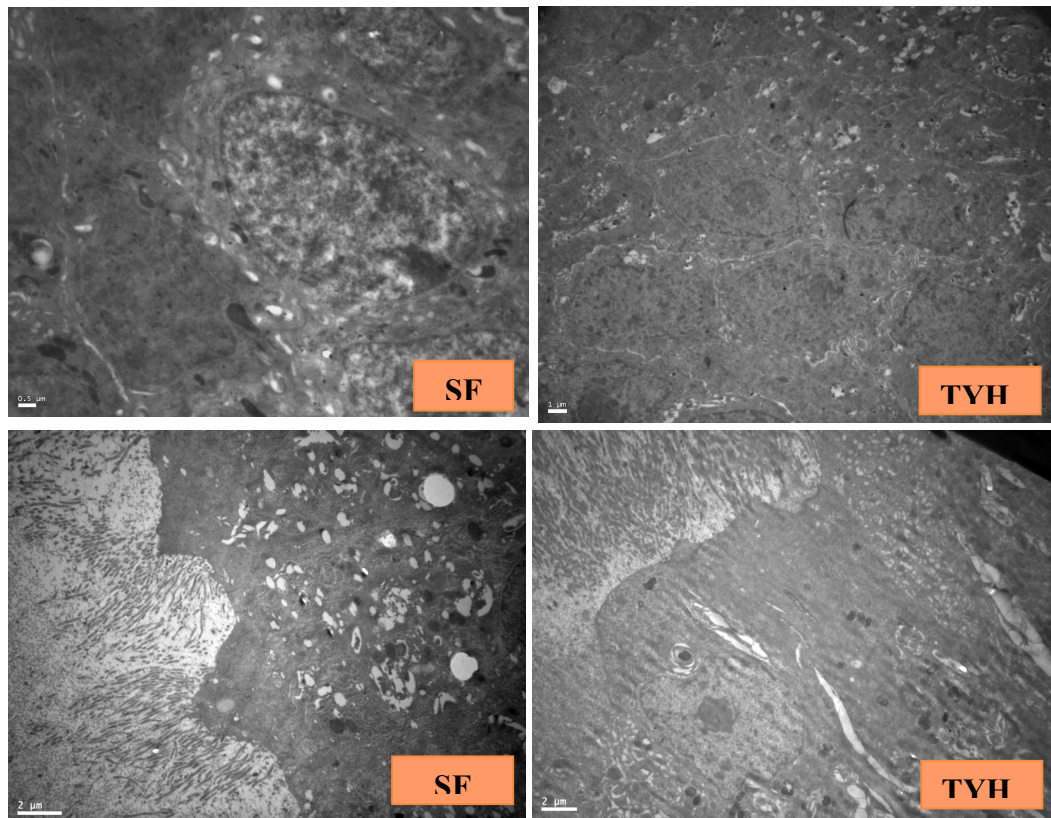


Fig.4.9: Microfotografía mostrando cambios en núcleos y esterocilias de epidídimos **felinos en distintos medios**.

Sin embargo, los estudios morfométricos revelaron que el NN y el AN disminuyeron con el tiempo: ($p < 0,004$; $p < 0,001$) pero no con el medio, mientras que el NM y el AM no se modificaron con ninguna de las dos variables ($p > 0,05$).

En los caninos, el estudio histológico reveló que las características nucleares y la morfología de las esterocilias cambiaron con el tiempo (0 vs. 72 h; $0 \pm 0,23$ vs. $3 \pm 0,19$, $p < 0,01$; $0 \pm 0,15$ vs. $1,5 \pm 0,12$, $p < 0,01$; respectivamente) aumentando los grados de cambios con el transcurso de las horas de almacenado (Fig.4.9.1). Cuando se estudió el efecto de los medios de almacenado, los cambios morfológicos no mostraron diferencias entre los dos medios ni para las características nucleares ni para la morfología de las esterocilias ($p > 0,05$).

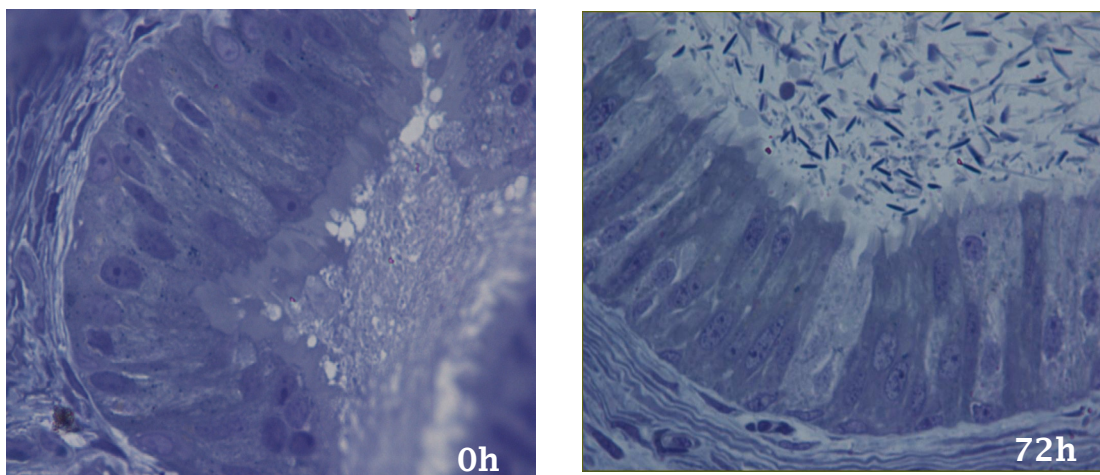


Fig. 4.9.1: Cambios morfológicos en epidídimos **caninos** entre 0 y 72 **horas (h)**.

En el estudio ultraestructural, la distribución de la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias mostraron mayores cambios compatibles con autólisis al aumentar el tiempo de almacenado (0 vs. 72 h, $0 \pm 0,17$ vs. $1,84 \pm 0,19$, $p < 0,01$; $0 \pm 0,18$ vs. $2,33 \pm 0,20$, $p < 0,01$; respectivamente) pero no al comparar los diferentes medios ($p > 0,05$). Asimismo, el NM disminuyó con el aumento del tiempo de almacenado 0h vs.72h; $2,53 \pm 0,3$; $1,32 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) sin observarse efectos del medio ni del tiempo sobre NN, AN ni AM ($p > 0,05$).

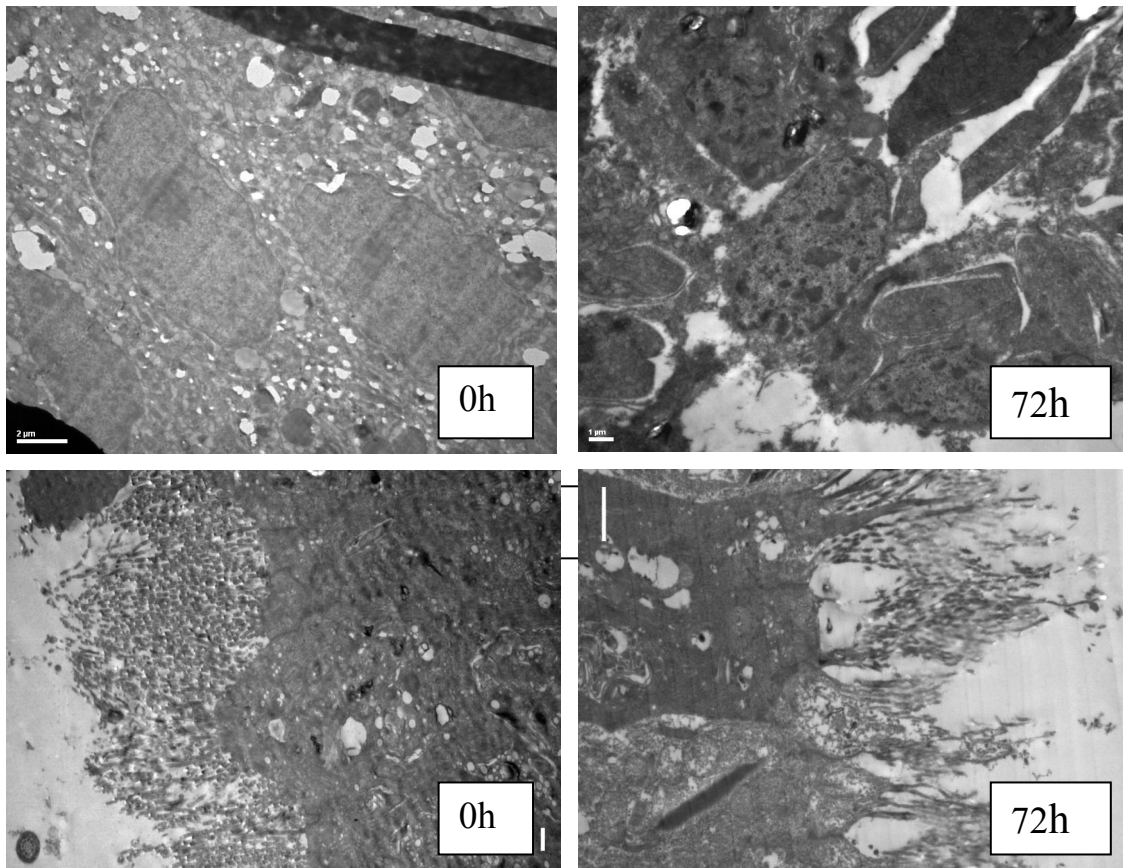


Fig. 4.9.2: Microfotografía mostrando cambios en núcleos y estereocilias de epidídimos **caninos** entre **0y 24horas (h)**.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, el medio de almacenado conservaría a corto plazo el epitelio epididimal viable por horas durante el transporte y almacenado de manera similar a los medios que preservan los órganos para trasplantes. Esta conservación del órgano enlentecería la autólisis epididimal, preservaría el medio interno del epidídimo y lograría conservar la viabilidad de los EE almacenados en su interior.

Los resultados obtenidos en el Experimento I y hallazgos de estudios previos (Gañán y col., 2009; Armas y col., 2011) que examinaron la calidad de los EE almacenados y recuperados, han demostrado que la viabilidad espermática disminuye

a medida que aumenta el tiempo de almacenado. Esta observación podría estar relacionada con el desarrollo del proceso autolítico en las células epididimales y la consecuente variación del medio interno epididimal (Gañan y col., 2009). Concordando con estos estudios, nuestros resultados muestran que el tiempo de almacenado incrementa los cambios en la morfología de las células del epidídimo. Las características histológicas y ultraestructurales de las células principales del epidídimo en órganos no almacenados (0h) coinciden con los descriptos anteriormente por otros autores (Arrighi y col., 1986; Axner y col., 1999). Asimismo, los cambios morfológicos y ultraestructurales observados en EPI almacenados concuerdan con cambios celulares relacionados con el proceso de muerte celular (Myers y McGavin, 2007). En el estudio óptico observamos que los cambios morfológicos de las células incrementaron con el aumento del tiempo de almacenado. Los resultados de este experimento coinciden con lo observado en el Experimento I en el que los valores de los AI, la MI y el PV fueron mas bajos en espermatozoides recuperados a las 72h comparados con aquellos recuperados a las 24h de almacenado. En el mencionado experimento, los espermatozoides felinos recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron parámetros superiores (MI y VI) comparados con los almacenados en SF en diferentes tiempos. Esta observación concuerda con nuestros hallazgos los cuales muestran que los daños celulares histológicos y ultraestructurales en gatos fueron mayores en las células de EPI almacenados en SF comparados con aquellas de EPI almacenados en TYH. Asimismo, en los caninos, especie en la cual no se hallaron diferencias en los parámetros espermáticos al comparar los distintos medios de almacenado en el Experimento I, no se evidenciaron tampoco cambios histológicos ni ultraestructurales significativos al comparar los órganos almacenados en SF y TYH

en el presente experimento. Estos resultados coinciden con lo observado en el CAPÍTULO III, en el cual al comparar las curvas de descenso de temperaturas en las colas epididimales se evidenciaron diferencias entre las dos especies. En los gatos, se observó un descenso más rápido de la temperatura dentro del epidídimo en comparación con los perros. Por otra parte, en los gatos, la temperatura ocurrida dentro del epidídimo en cada medio y en cada tiempo mostró una tendencia a ser siempre más alta en los órganos almacenados en TYH. Esta diferencia podría influir en las variaciones encontradas entre ambas especies en los cambios morfológicos celulares y ayudaría a explicar la mayor recuperación de EE viables de EPI felinos almacenados en TYH, hecho observado en el CAPÍTULO II.

El espermatozoide en su recorrido hacia la maduración se torna más sensible a las (ROS) presentes en el epidídimo que causan importantes daños sobre la bicapa lipídica (Irvine y col., 2000), Angrimani y col., (2013) observaron que el epidídimo produce y secreta sustancias antioxidantes, presentes en el plasma seminal, las cuales tendrían efecto protector sobre los espermatozoides. Es así que la conservación de la estructura morfológica de la célula epididimal se relacionaría con el mantenimiento de la fisiología celular y permitiría conservar la composición del fluido epididimal y en consecuencia la viabilidad espermática.

Las diferencias encontradas entre especies en los cambios morfológicos celulares en los distintos medios de almacenado, podrían también estar relacionadas con el diferente efecto protector de la YH contra el enfriamiento en las diferentes especies (Quinn y White, 1966; De Leeuw y col., 1990). También podrían relacionarse con la diferente interacción de la YH con las distintas membranas plasmáticas o bien, con la diferente composición de la membrana plasmática en

relación a la especie. Es así que la conservación de la estructura morfológica celular podría relacionarse con el diferente efecto de la YH en las dos especies estudiadas.

En conclusión nuestros resultados demuestran que, en felinos, el TYH ejerce un efecto protector del shock térmico celular a través de la YH y retrasa los procesos autolíticos. Los EPI almacenados en TYH evidencian un enlentecimiento en los procesos autolíticos de la célula epitelial epididimal y un retraso en la aparición de cambios morfológicos celulares. Este hecho retrasaría los cambios ocurridos en el medio ambiente epididimal relacionados con la autólisis celular y podría explicar la mayor cantidad de espermatozoides viables recuperados en el Experimento I con el uso del TYH.

CAPÍTULO V

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE 0,25% de SODIO DODECIL SULFATO AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POS-DESCONGELACIÓN

INTRODUCCIÓN

En el marco de la biotecnología, el estudio de la conservación de células y tejidos relacionados con la reproducción cobra especial importancia. La criopreservación de semen en bancos de recursos genéticos permite mantener la variabilidad genética de una especie, lo que posibilita asegurar su continuidad y reducir las posibilidades de extinción. Es así que el semen de los animales de compañía o de los animales silvestres, que se almacene en estos bancos, puede utilizarse durante muchos años después de la muerte del individuo. Ante la muerte repentina o la orquiectomía por problemas médicos la criopreservación de EE es la biotecnología que hace posible preservar el material genético de ese individuo.

Si bien la criopreservación de semen canino es una herramienta importante para preservar espermatozoides de reproductores considerados valiosos y existen técnicas sencillas para la toma de muestra de semen en los caninos; no pueden descartarse eventos impredecibles como accidentes, intoxicaciones o enfermedades, que súbitamente pueden desencadenar en una orquiectomía, muerte o eutanasia de perros de alto valor genético o afectivo. En estos casos, los propietarios no sólo deben afrontar la pérdida del animal, sino también la pérdida del material genético deseable (Armas, 2011). En ese sentido, cobra importancia el poder obtener y

criopreservar espermatozoides después de la muerte del animal, recuperados de la cola del epidídimo, con motilidad y capacidad fecundante (Yu y Leibo, 2002).

En el epidídimo se realizan dos eventos importantes, la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del mismo (Hafez, 2002). Varesi y col., (2013) demostraron que la motilidad espermática es significativamente mayor en la cola comparada con la cabeza y el cuerpo, como así también, que la mayor proporción de espermatozoides con morfología normal fue encontrada en la cola, seguida por el cuerpo y por último en la cabeza. Adicionalmente la cola presentó el mayor porcentaje de AI, y la mayor cantidad de morfoanomalías de las colas espermáticas se encontraron en el cuerpo. Las gotas citoplasmáticas disminuyeron desde la cabeza a la cola.

Es así que la obtención y posterior criopreservación de EE recuperados de la cola, nos permiten preservar un buen material genético posmortem. Diversos estudios han sido realizados sobre recuperación y criopreservación de EE en bovinos (Amann y Griel, 1976), equinos (Bruemmer y col., 2002), caprinos (Blash y col., 2000), ovinos (Kaabi y col., 2003) y porcinos (Ikeda y col., 2002). Asimismo en equinos, Barker y Gandier (1957) obtuvieron nacimientos de potrillos por IA con EE criopreservados y descongelados. Más recientemente, Heise y col., (2010) obtuvieron alrededor de un 40% de porcentajes de preñez en equinos utilizando IA con EE congelados-descongelados. Okazaki y col. (2012) lograron un mínimo de 55% de preñez y un promedio de 5 lechones utilizando mediante IA y EE congelados-descongelados. Kozdrowski y col., (2011) lograron sentar el primer precedente de

dos nacimientos con EE congelados de Bisonte Europeo (*Bison bonasus*), uno de los mamíferos más amenazados en Europa, a través de la IA en vacas y vaquillonas.

En la especie canina, existen algunos estudios sobre recuperación, refrigeración y criopreservación de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. Hewitt y col., (2001) evaluaron la supervivencia de EE congelados-descongelados con diferentes porcentajes de glicerol, Yu y Leibo (2002) estudiaron el efecto sobre la motilidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal de la refrigeración de EE. En esta especie la habilidad para la fertilización de los EE se ha demostrado con el nacimiento de crías luego de IA con gametas recuperadas de los EPI (Marks y col., 1994; Hori y col., 2011).

Es así que los EE pueden ser almacenados por largo tiempo en bancos de semen, preservando el material genético, y posibilitando el uso de un reproductor mucho tiempo después de su muerte. Cuando pensamos en el uso de esta biotecnología en animales en vía de extinción de inmediato se hace presente el esfuerzo de los científicos que alertan y tratan de concientizar sobre las consecuencias del aumento de especies en riesgo de desaparición definitiva de nuestro planeta, llevándose consigo sus características genéticas y probables adaptaciones específicas al medio que habitaban. La criopreservación de EE caninos y felinos es útil como modelo experimental para cánidos y félidos silvestres en vías de extinción aumentando su posibilidad de preservación (Fougner, 1989; Fastard, 1992; Fastard, 1996; Pukazhenth, 2004). En Latinoamérica, el Aguará-Guazú (*Chrysocyon brachyurus*) es el cánido silvestre sudamericano más grande que existe. En un reporte de la UICN publicado en 2013 su estado es "Amenazado", coincidiendo con la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres [prohíbe, reglamenta y/o vigila el

comercio]) apéndice II (Inskipp y Gillett, 2005). Este apéndice incluye a todas las especies que, si bien en la actualidad no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, podrían llegar a esta situación a menos que el comercio en especímenes de dichas especies esté sujeto a una reglamentación estricta. Los esfuerzos realizados para preservar los cánidos y félidos silvestres en peligro se sumarían al esfuerzo mundial para evitar las pérdidas de especies en nuestro planeta. Estas razones, hacen necesarios estudios sobre la criopreservación espermática epididimal. Los avances en los procesos de congelación permitirán optimizar los resultados obtenidos luego del descongelado de los EE.

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no sólo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fertilización (Morris, 1981). La membrana plasmática es considerada el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (Mahadevan, 1984).

La naturaleza de la membrana plasmática también se ha relacionado en espermatozoides seminales con diferencias observadas en la resistencia al proceso de congelación-descongelación entre distintos individuos en varias especies, tanto domésticas (Curry, 2000) como silvestres (Leibo y Songsasen, 2002). Así, los donantes de semen se han clasificado de forma rutinaria como “buenos” o “malos” congeladores de forma individual.

La congelación permite preservar el material genético por un periodo indefinido. Sin embargo, es un proceso que destruye un porcentaje considerable de espermatozoides. Watson (2000) comprobó que aproximadamente el 50% de los espermatozoides viables se pierde durante el proceso de congelación, incluso utilizando las mejores técnicas de preservación. De ahí la necesidad de desarrollar

técnicas de criopreservación más eficaces que preserven el mayor porcentaje de espermatozoides conservando motilidad, integridad de membrana y acrosomas intactos.

La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Mazur, 1970; Mazur y col., 1972; Watson, 1976). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas. Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica, el acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurre la fertilización.

El estudio de la acción de diferentes sustancias adicionadas a los DIL y su efecto sobre la criopreservación de los EE permitirá obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad de los EE al descongelado, posibilitando en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología.

Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la YH mejora el efecto crioprotector de los DIL de semen en algunas especies (Graham y col., 1971a; Arriola y Foote, 1987; Pendfold y Moore, 1993; Peña y Forsberg, 2000; Asa, 2010). El SDS (Sodio dodecil sulfato) es un detergente aniónico que solubiliza eficazmente los lípidos (Helenius y Simons, 1975). Compuestos detergentes que contienen sodio dodecil sulfato sólo o como un componente del Equex STM[®] paste o Orvus ES Paste[®] han sido incluidos en DIL de semen.

Los primeros trabajos que informaron sobre la inclusión de detergentes en los DIL de congelación de semen, se efectuaron en cerdos (Graham y col., 1971a,b), y

hacían referencia a sus efectos beneficiosos en la preservación de la motilidad y en la integridad del espermatozoide posdescongelación como así también, en la preservación del acrosoma y de su capacidad fecundante. Posteriormente, fueron constatados sus efectos beneficiosos en la motilidad y en la preservación de los acrosomas en espermatozoides de bovinos (Ahmad y Foote, 1986), de ciervos (Cheng y col., 2004), de carneros (El-Alamy y Foote, 2001), de machos cabríos (Aboagla y Terada, 2004), de caninos (Peña Martínez, 1997; Peña y Forsberg, 2000; Stornelli y col., 2002) y en EE de ratón (Nakatsukasa y col., 2001).

Si bien en animales de compañía se han utilizado diferentes protocolos para congelación de semen y de EE (Shafer y Holzman, 2000; Stornelli, 2002; Zambelli, 2010; Stornelli, 2004; Savignone y col., 2007; Lenin y col., 2011), la incorporación de SDS puro o como parte de Equex STM Paste u Orvus ES Paste[®] al DIL, ha sido evaluada en semen en algunos trabajos y mucho menos extensamente en EE (Quinn y col., 1980; Thomas y col., 1992; Fosberg, 1995; Nothling y Volkman, 1997; Rota, 1997; Fosberg, 1999; Peña y Fosberg, 2000; Ponglowhapan y Chatdarong, 2008). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia de espermatozoides caninosal descongelado (Rota y col., 1997; Peña y Fosberg, 2000a; Stornelli y col., 2001). Peña y col, (2000), observaron un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al incorporar Equex STM paste al DIL seminal en caninos.

Si bien en los primeros trabajos los efectos protectores de estos compuestos eran atribuidos a una interacción con la YH o con la membrana del espermatozoide (Graham y col., 1971a), luego se postuló que solubiliza eficazmente los lípidos de membrana modificando la misma (Helenius y Simons, 1975). Trabajos posteriores han precisado que su acción principal es la modificación de los componentes de la

YH (Penfold y Moore, 1993), concretamente de los fosfolípidos, aumentando la permeabilidad de la membrana del espermatozoide y reduciendo el stress osmótico en la congelación y la descongelación (Arriola y Foote, 1987; Deneb y col., 2013).

Peña y col., (1994) y Rota y col., (1997) demostraron que el SDS aumenta el porcentaje de espermatozoides caninos móviles, vivos y con membranas intactas, mejorando la supervivencia luego de la descongelación.

La adición de estos compuestos detergentes a DIL desprovistos de yema acarrea marcados efectos nocivos en el acrosoma y en la motilidad (Pursel y col., 1978) recomendándose que siempre que se reduzca el porcentaje de yema también se reduzca proporcionalmente la concentración de detergentes (Arriola y Foote, 1987). Este hecho fue demostrado por Aboagla y Terada, (2004) quienes observaron que concentraciones elevadas de SDS producen efectos nocivos sobre la motilidad e integridad acrosomal, que pueden atribuirse al aumento de moléculas libres del SDS, no unidas a la yema, y que se unen directamente a la membrana del espermatozoide causando efectos perjudiciales. Coincidiendo con los hallazgos de Thomas y col., (1992) y Rota y col., (1997); Peña y col., (1998) demostraron que el agregado de 0,25% de SDS al DIL TRISBA 10% de YH ejercía un efecto protector al descongelado. Otros trabajos demostraron mejora en la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos al agregar este detergente (Ström Holst y col., 2000). Asimismo, Rota y col. (1999) obtuvieron buenos resultados utilizando IA intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste.

Si bien se ha trabajado en criopreservación de semen canino con DIL que poseen detergentes en su composición, existe escasa información respecto a la congelación de espermatozoides recuperados de EPI refrigerados, así como sobre la

adición de SDS y su efecto sobre la calidad de los EE antes y después del proceso de criopreservación (Ponglowhapan y Chatdarong, 2008). Lo anteriormente mencionado explica la necesidad de conocer si el agregado de SDS al DIL utilizado en el proceso de congelación es favorable para la criopreservación de espermatozoides recuperados de la cola epidídimal de perros post-mortem o post-orquiectomía.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto de dos diluyentes para criopreservación sobre la supervivencia de EE al descongelado en caninos.

HIPÓTESIS

- El uso del TRISBA con el agregado de 0,25 % de SDS como DIL para la criopreservación permite obtener mayor sobrevivencia de los EE durante el proceso de congelación - descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento IV

Animales experimentales y tratamientos

Se utilizaron EPI de 15 caninos adultos de entre 2 y 7 años de edad, en estado de salud incluidos en un plan de control de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral, los testículos con sus correspondientes EPI se colocaron rápidamente en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina y se enviaron rápidamente al laboratorio. Los EPI fueron procesados dentro de las 4 h posteriores a la orquiectomía (Dong y col., 2008; Gañan y col., 2009; Gonzalez Santos, 2013),

tiempo en que se tardó desde la cirugía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se diseccionaron los EPI y se separaron las colas de cada epidídimo macroscópicamente (Varesi y col., 2013). Cada cola epididimal se atemperó en un baño termostatzado a 37°C por 10 minutos en 1,5 ml de TRISBA (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,7g, fructosa 1,25g y agua destilada csp 100ml).

Posteriormente se realizó la recuperación de los espermatozoides a través del corte (cutting) de la cola del epidídimo con el mismo procedimiento que en el Experimento I (Yu y Leibo, 2002). Luego de la recuperación espermática, se realizaron las pruebas de contrastación microscópicas *in vitro* por duplicado. Los EE obtenidos no refrigerados, fueron tomados como frescos.

El pool de EE se dividió en 2 alícuotas de igual volumen. Se utilizaron dos DIL diferentes (DIL=2): a) Tris base sin agregado de SDS (TRISBA) y b) Tris base con el agregado de 0,25% de SDS¹, 0,25mg/100ml (TRIS SDS 0,25). Cada una de las alícuotas se mezcló con un volumen calculado de cada DIL para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. El DIL TRISBA que se utilizó tuvo la siguiente composición: 198, 2 mM Tris, 72,9 mM ácido cítrico, 44,4 mM glucosa, glicerol 5% (v/v), YH 20% (v/v), penicilina sódica (0,06 g/l), sulfato de estreptomicina 0,1 g/l (Aisen y Alvarez, 2000), Luego de un tiempo de equilibración de 2h a 4°C (Peña, 1997), los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,5 ml y congelados de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (1980). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 1 minuto (Norton, 1988). En los EE frescos y en posdescongelados se realizaron las pruebas *in vitro* microscópicas descriptas en el CAPÍTULO II a excepción de AICF que no fue realizada.

¹ Debido a que no pudo adquirirse Equex STM[®] Paste por discontinuarse la comercialización del producto y, considerando que el mismo posee SDS (sodio dodecil sulfato) como principio activo se reemplazó el Equex STM[®] Paste por SDS,

Análisis estadístico

Las comparaciones de los parámetros espermáticos entre EE antes y después de la congelación y entre DIL se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS (SAS 1996)

RESULTADOS

Todas las variables estudiadas fueron significativamente diferentes entre los EE recuperados frescos y los congelados-descongelados ($p < 0,001$). La mayor diferencia se registró en la MI donde el descenso posdescongelado superó el 50% (de $66,7 \pm 1,5$ a $30,8 \pm 1,5$). Los demás parámetros mostraron un descenso significativo pero inferior al 50 % (Fig. 5.1 y 5.2).

Cuando se compararon los espermatozoides congelados descongelados en ambos DIL, VI, MOT; PV fueron significativamente superiores en el TRIS SDS en comparación con el TRIS BASE ($3,3 \pm 0,05$ vs $2,9 \pm 0,05$ [$p < 0,001$]; $51,7 \pm 2,2$ vs $45,9 \pm 1,5$; $70 \pm 1,29$ vs. $66 \pm 1,29$; [$p < 0,05$]; Fig. 5.1). En el HOS sólo se observó una tendencia a ser mayor el porcentaje de colas enrolladas en los EE congelados con TRIS SDS en comparación con los congelados con TRISBA ($70,6 \pm 1,4$ vs. $66,8 \pm 1,4$ [$p < 0,06$]; Fig. 5.2). No se observaron diferencias en el porcentaje de AI (Fig.5.2).

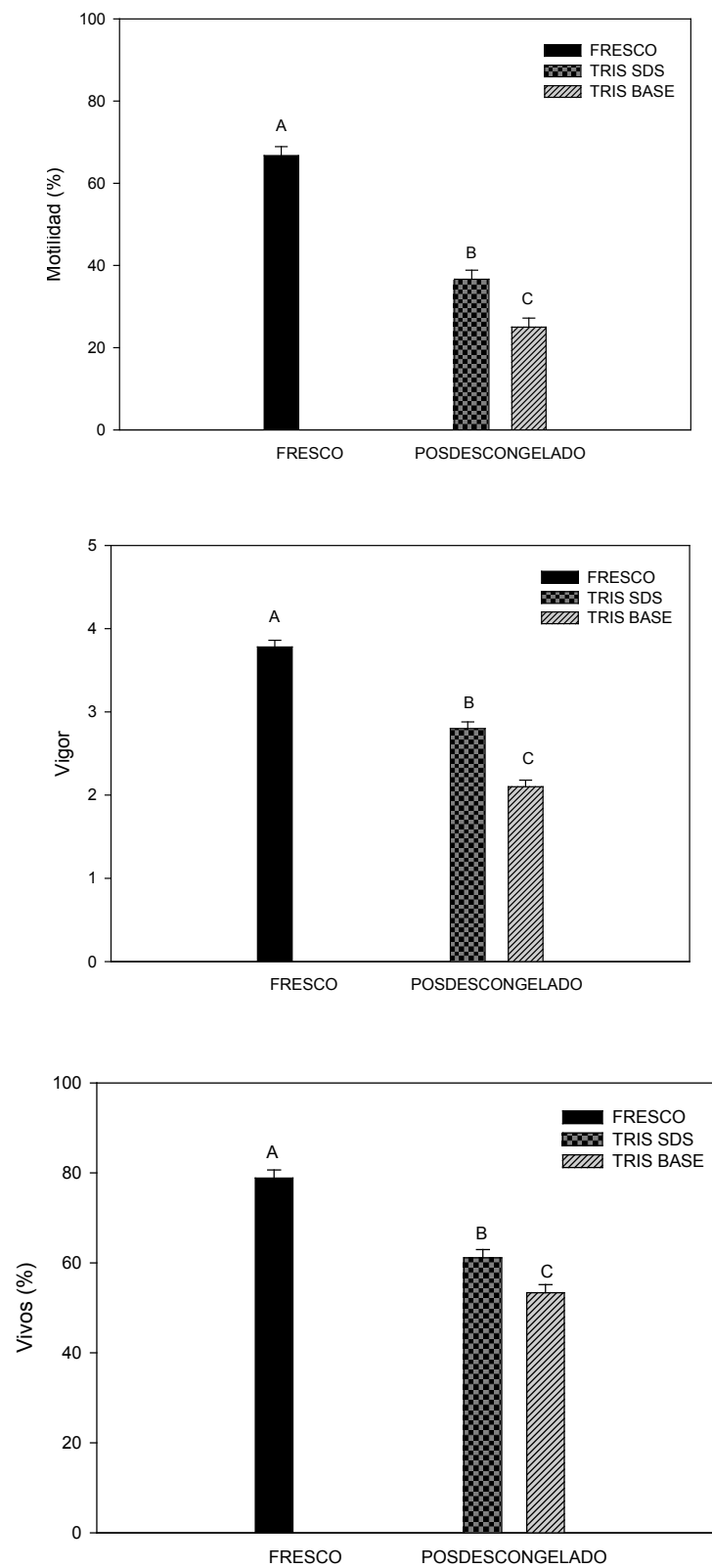


Figura 5.1. Cuadrados medios mínimos \pm ES de la motilidad, el vigor, y porcentaje de vivos de espermatozoides epididimales caninos congelados-descongelados en Tris Base y Tris base con 0,25% de Sodio dodecil sulfato, Diferentes entre barras indican diferencias significativas.

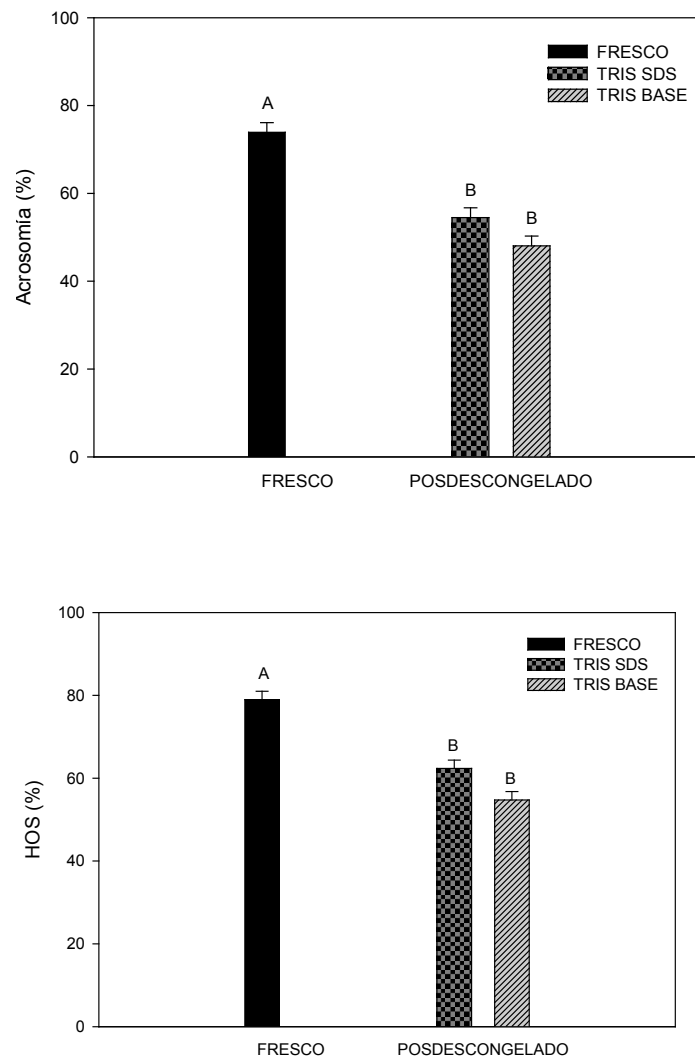


Figura 5.2. Cuadros medios mínimos \pm ES del porcentaje de acrosomas intactos y el test hiposmótico (HOS de espermatozoides epididimales caninos congelados-descongelados en Tris Base y Tris base con 0,25% de Sodio dodecil sulfato. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La adición de SDS en las condiciones experimentales y a la concentración utilizada en este estudio produjo mejoras en varios de los parámetros celulares evaluados. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo observado por Helleman y Jara (1997) quienes, en espermatozoides ovinos congelados-descongelados, demostraron que la adición del SDS al DIL aumentó cerca de 60% los espermatozoides intactos posdescongelación en comparación al diluyente sin SDS. Asimismo el uso de SDS en espermatozoides ovinos, permitió obtener una mejor calidad de semen congelado al ser adicionado al 1% al DIL Triladyl[®] siendo el medio de primera elección para la crioconservación de semen ovino de raza Pelibuey (Valdez, 2013).

Las pérdidas espermáticas observadas en este estudio luego del proceso de congelación fueron similares a las encontradas en felinos por Bonaura y col., (2012). Asimismo fue comprobado un efecto benéfico con la adición de 0,25% de SDS al TRISBA sobre los espermatozoides de gato congelados-descongelados. Al igual que lo observado en nuestros resultados en caninos, en felinos pudo observarse un efecto benéfico sobre MI no registrándose un efecto protector sobre la integridad acrosómica ni el VI (Bonaura y col., 2012). Por el contrario, Axnér y col. (2004) sólo encontró un efecto benéfico sobre porcentaje de AI con el agregado de 0,5% de Equex STM paste en EE felinos, postulando un efecto tóxico del Equex STM como causante de la disminución de la longevidad al descongelado. Al igual que en nuestro trabajo, Zambelli y col., (2010) al utilizar Equex STM paste al 0,5% obtuvo mayor porcentaje de espermatozoides móviles en semen felino congelado-descongelado. Asimismo observó efectos positivos en la integridad de membrana evaluada con eosina nigrosina.

La adición de Equex STM paste a un DIL con base Tris mejoró en este trabajo la supervivencia de EE caninos al descongelado al igual que lo observado en espermatozoides seminales caninos en varios trabajos (Rota y col., 1997; Peña y Fosberg, 2000a; Stornelli y col., 2001; Ponglowhapan y Chatdarong, 2008).

Nuestros resultados demuestran que la adición de 0,25% de SDS al DIL TRIS BA produce mayor cantidad de EE caninos viables al descongelado. La incorporación de este detergente a la concentración utilizada produjo un efecto benéfico al descongelado sobre VI, MI y PV de EE caninos. Podemos concluir que el SDS genera un mayor aprovechamiento de los EE recuperados contribuyendo al conocimiento de esta biotecnología de gran importancia para preservar gametas de especies de alto valor genético en el planeta.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES FINALES Y PROSPECTIVA

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se puede inferir, que la cantidad de EE viables recuperados puede mejorarse transportando los EPI felinos en TYH, mientras que en los caninos el envío de muestras refrigeradas solamente en SF nos asegura una buena recuperación. Según nuestras observaciones si bien pueden recuperarse EE hasta 72h posmortem o poscastración, cuanto antes podamos hacer la recuperación de las gametas más cantidad de EE viables obtendremos. Por otro lado, el uso del Tris base con el agregado de 0,25% de SDS como diluyente para la criopreservación permite obtener mayor sobrevida de los EE caninos durante el proceso de congelación - descongelación.

Por tanto, la utilización de medios que permitan conservar los EPI a 4°C logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante mayores períodos, hará posible el traslado de los testículos a laboratorios que posean tecnología para la recuperación espermática epididimal desde diferentes puntos de nuestro país. Estos conocimientos sobre recuperación y criopreservación de EE caninos y felinos podrán ser utilizados en cánidos y félidos silvestres en vías de extinción aumentando sus posibilidades de preservación en nuestro planeta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amann P, Structure y function of the normal testis and epididymis, *Journal of the American Collage of Toxicology* 1989; 8 (3): 457-471,
2. Aboagla EM, Terada T, Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa, *Theriogenology* 2004; 62: 809-818,
3. Aguado MJ, Garde J, Madriadano JM, Pérez S, Garrido D, Montoro V, Congelación post-mortem de semen de epidídimo de morrucco, En: resúmenes de las VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial; 1994; Murcia, España; p 283,
4. Ahmad K, Foote RH, Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent, *J Dairy Sci* 1986; 69: 535-541,
5. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ, Effect of trehalosa and EDTA on cryopreservative action of ram semen diluents, *Theriogenology* 2000; 53:1053-1061,
6. Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M, Characterization of lower temperature limitations of fresh-extender porcine semen, *Theriogenology* 1998; 50:535-543,
7. Alvarado L, Propiedades Térmicas de los Alimentos, [scribd.com/doc/22440709/Propiedades-Termicas-de-los-Alimentos](https://es.scribd.com/doc/22440709/Propiedades-Termicas-de-los-Alimentos), Nov 12, 2009,
8. Amann RP, Griel LC, Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen, *J, Dairy Sci*, 1974; 57:212-219,
9. An TZ, Wada S, Edashige K, Sakuray T, Kasai M, Viable spermatozoa can be recuperated from refrigerated mice up to 7 days after death, *Cryobiology* 1999; 38: 27-34,
10. Andersen K, Artificial insemination and storage of canine semen, In: Morrow DA, Editor, *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*, WB Saunders Philadelphia, PA 1980, p, 661-5,
11. Angrimani DS, Lucio CF, Veiga GA, Silva LC, Regazzi FM, Nichi M, Vannucchi CI, Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa, *J Androl* 2013; 22: 1-15,
12. Armas S, Fernández V, Vásquez M, Santiani A, Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía, *Rev Inv Vet Perú* 2011; 22 (3):199-205,
13. Arrighi S, Romanello M, Domeneghini C, Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*), *Arch Biol* 1986; 97: 7-24,
14. Arriola J, Foote RH, Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders, *J Dairy Sci* 1987; 70: 1664-1670,
15. Asa CS, Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management, *Reproductive physiology* 2010; 411-428,

16. Asa CS, Valdespino C, A review of small canid reproduction, The swift fox: ecology and conservation of swift foxes in a changing world (M, Sovada and L, Carbyn, eds.), Canadian Plains Research Center, University of Regina, Regina, Saskatchewan, Canada, 2003, p, 117-124,
17. Axné E, Strom Holst B, Linde-Forsberg C, Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat, *Theriogenology* 1998a; 50:973-9,
18. Axné E, Linde-Fosberg C, Mating and artificial insemination, En: Small animal eproduction and neonatology, Cheltenham, UK, BSAVA, G, E, Simpson, G, C, and Harvey, M., 1998b; p, 105-111,
19. Axné E, Linde-Forsberg C, Einarsson S, Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat, *Theriogenology* 1999a; 52:767-778,
20. Axné E, Malmqvist M, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H, Regional Histology of the Ductus Epididymidis in the Domestic Cat J, *Reprod, Dev*, 1999b, 45 (2):151-160,
21. Axné E, Hermansson U, Linde-Forsberg C, The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa, *Anim Reprod Sci* 2004; 84:179-191,
22. Barker CAV, Gandier JCC, Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa, *Can J Comp Med Vet Sci* 1957; 21:45-51,
23. Baterman HL, Hay MA, Mastromonaco GF, Ryckman DP, Goodrowe KL, Characterization of canine epididymal spermatozoa, *Theriogenology* 2000; 53:486 abstr.
24. Belzer FO, Southard JH. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995; 46:235-47.
25. Betancur G, Vásquez A, Garcia A, Criopreservación De Semen Canino Y Su Aplicación En La Inseminación Artificial, *Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2009; 4 (2): 119-129.
26. Blackshaw AW, The prevention of temperature shock of bull and ram semen, *Aust J Biol Sci*, 1954 Nov; 7(4):573-82,
27. Blash S, Melican D, Gavin W, Cryopreservation of epi- didymal sperm obtained at necropsy from goats, *Theriogenology* 2000 1; 54(6):899-905,
28. Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA, Efecto de la adición de sodio dodecil sulfato a un diluyente tris base sobre la supervivencia de EEpóst descongelaación, XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, 2012; p: 137-138, Casilda Argentina
29. Bourne H, Richings N, Liu DY, Clarke GN, Harari O, Baker HW, Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results, *Reprod Fertil Dev*, 1995; 7 Supl 2:177-83,
30. Brousset Hernandez Jáuregui DM, Estrés y reproducción en felinos silvestres, *Imagen Veterinaria* 2002; 2 (4), p 23,
31. Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G, Squires EL, Effects of storage at 5 °C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa, *Theriogenology* 2002; 58: 405-407,
32. Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens C, Ryan I, Schriok E, A comparision of ICSI outcome with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples, *Hum Reprod* 2001; 16:495-499,
33. Cheng FP, Wu JT, Chan JPW, Wang JS, Fung HP, Colenbrader B, Tung KC, The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal

- integrity in cryopreserved semen of Formosa Sika deer and Formosa Sambar deer, *Theriogenology* 2004; 61: 1605- 1616,
34. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM, Preservation and reperfusion injuries in liver allografts, An overview and synthesis of current studies, *Transplantation*, 1992; 53:957-78,
 35. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI, Kidney preservation for transportation, Initial perfusion and 30 hours' ice storage, *Lancet* 1969; 2:1219,
 36. Curry MR, Cryopreservation of semen from domestic livestock, *J Reprod Fertil* 2000; 5:46-52,
 37. Darin-Bennett A, Poulos A, White IG, The phospholipids and phospholipid bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa, *J Reprod Fert* 1974; 41: 471-474,
 38. De Croo I, Vander Elst J, Everaert P, De Sutter P, Dhont M, Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates alter ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa, *Hum Reprod* 1998: 1893-1897,
 39. De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ, The role membrane plays in cold shock and freezing injury, *Reprod Dom Anim* 1990; Suppl 1: 95-104,
 40. Deneb P, Cob L, Rivera J, Domínguez Á, Baeza J, Ugalde J, Efecto de la adición de un surfactante (Orvus es paste®) en el diluyente de congelación sobre la calidad y la capacidad fecundante del semen ovino de pelo (*Ovis aries*) congelado, *Revista Científica, FCV-LUZ* 2013; XXIII, (1): 48 – 53,
 41. Diaz GB, Ojeda RA, Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina, (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos), Mendoza, SAREM, 2000, p 106,
 42. Diaz-Fontdevila M, Arguello B, Castro A, Lardone MC, Cornejo V, Peñaloza P, y col, Comparación de los resultados de ICSI realizados con espermatozoides obtenidos de testículo o epidídimo de pacientes azoospermicos, (Intracytoplasmatic sperm injection outcome using testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic men), *Int, J, Morphol*, 2006; 24 Supl 1:112-132,
 43. Dong Q, Rodenburg SE, Huang C, Vandervoort CA, Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage, *J Androl* 2008; 29(3):283-92,
 44. El-Alamy MA, Foote RH, Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders, *Anim Reprod Sci* 2001; 65:245-254,
 45. Escalante Cobo J y del Río Gallegos F, Preservación de órganos, *Medicina intensiva* 2009; 33(6):282-292,
 46. Evans RW, Setchell BP, Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year, *J, Reprod, Fert*, 1979a 57:197-203,
 47. Evans RW, Setchell BP, Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations in the flow and composition on the flow and composition of boar rete testis fluid, *J Reprod Fertil* 1979b: 57(1):189-96,
 48. Fastard W, Fougner JA, Torres CG, The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen, *Theriogenology* 1992; 37:699-711,
 49. Fastard W, Semen cryopreservation in dogs and foxes, *Anim Reprod Sci* 1996; 42:251-260.
 50. Ferreira, T. y Rasband, W., The ImageJ User Guide —Version 1.43, <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>, Apr 2010.

51. Foote R,H; Arriola J, Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent, *J Dairy Sci* 1987; 70: 2642-2647,
52. Foote RH, Letter to the editor, *J Androl* 2000; 21:355,
53. Fosberg CL, Strom B, Govette G, Comparison of fertility data from vaginal vs, intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study, *Theriogenology* 1999; 52:11-23,
54. Fosberg CL, Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog, *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery* 1995; 10:48-58,
55. Fougner JA, Artificial insemination in fox breeding, *J, Reprod Fertil* 1989; 39:317-323,
56. Foulkes JA, The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J Reprod Fert* 1977; 49:277-284,
57. Fournier-Delpech S, Colas G, Courot M, Ortavant R, Brice G. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. *Annls Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 1979; 19:597-605.
58. Friedler S, Raziell A, Soffer D, Strassburger D, Komarovskiy D, Ronel R, The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermatozoa: a comparative study, *Hum Reprod* 1998; 13:1872-1877,
59. Fuller SJ, Whittingham DG, Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development, *J Reprod Fertil* 1996; 108, 139-45,
60. Gañán N, Gomendio M, Roldan E, Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 or 8°C on sperm quality and cryopreservation, *Theriogenology* 2009; 72: 1268–1277,
61. Garde J, Aguado M, Montoro V, Perez Guzman MD, García O, Perz S, et al, Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morrueco, Resultados preliminares, En: resúmenes de las XVIII Jornadas de la SEOC, España; 1994; p,533-7,
62. Garde López Brea J, Congelación de semen en la especie ovina, Características biológicas de las dosis descongeladas, Tesis doctoral, Editorial Cuenca, Universidad de Castilla, La Mancha, 1995,
63. Gilmore JA, McGann LE, Ashworth E, Acker JP, Raath M, Bush M, et al, Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking, *Anim Reprod Sci* 1998; 53:277–97,
64. Gil-Slalom M, Romero J, Minués Y, Molero M, Remohi J, Pellicer A, Pregnancies alter intracytoplasmic spermatozoa injection with cryopreserved testicular spermatozoa, *Hum Reprod* 1996; 11:1309-1313,
65. Glover TE, Watson PF, Cold shock and its prevention by egg yolk in spermatozoa of the cat (*Felis catus*), *Cryo-Letters* 1985; 6: 239–244,
66. Glover TE, Watson PF, The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5 8C, *Anim Reprod Sci* 1987; 13:229–37,
67. González Santos J, Tadeo Rosa J, Ortega Camarillo C, Toledano Olivares M, Vergara Onofre A and Rodríguez A, Criopreservación de EE a diferentes

- tiempos Post-mortem en caninos, *Comunicación Corta, Rev, Salud Anim* 2013; 35 (2): 137-141,
68. Goodrowe KL, Hay M, Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa, *Theriogenology* 1993; 40: 967–975,
 69. Graff KJ, Chandler JE, Reggio BC, Lim JM, Canal A, Carter JA, et al, Pregnancies obtained from IVF with noncapacitated epididymal bovine spermatozoa, In: *Proceedings 3rd International Meeting of Biotechnology and Animal Reproduction*, Cairo, Egypt, 1996, p,19-21,
 70. Graham EF, Rajamannan AHJ, Schmehl MKL, Maki-Laurila M, Bower RE, Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen, *AI Digest* 1971a; 19: 12-14,
 71. Graham EF, Rajamannan AHJ., Schmehl MK, Maki-Laurila M., Bower R,E, Fertility studies with frozen boar spermatozoa, *AI Digest* 1971b; 19: 6-7, 16,
 72. Green CE, Watson PF, Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation, *Reproduction* 2001; 122: 889-898,
 73. Hafez ESE, Preservación y criopreservación de gametos y embriones, En: Hafez ESE, Hafez B, eds, *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 7^a ed, México: MacGraw-Hill, 2002, p, 441-452,
 74. Harris RS, Pope CE, Gomez MC, Leibo SP, Dresser BL, Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods a 4°C, *Theriogenology* 2001; 55:308,
 75. Hay MA, Goodrowe KL, Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat, *J Reprod Fertil* 1993; Suppl 47:297–305,
 76. Hayat MA, *Basic techniques for transmission electron microscopy*, Academic Press Inc, London; 1986; p, 1152,
 77. Heise A., Kahn W., Volkmann DH., Thompson PN., Gerber D, Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa *Anim Reprod Sci* 2010; 118 (1): 48-53,
 78. Helenius A, Simons K, Solubilization of membrane by detergents, *Biochimica et Biophysica* 1975; 415: 29-79,
 79. Hellemann C, Jara C, Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados, *Arch med vet* 1997; 29 (1): 153-160,
 80. Hermansson U, Axnér E, Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C, *Theriogenology* 2007; 67: 1239–1248,
 81. Hernández P, Fernández R, Cruz V y, Anistro J, Evaluación de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de gato doméstico, *Rev, Salud Anim*, 2006; 28 (1): 45-48,
 82. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW, Cryopreservation of epididymal dog sperm, *Anim Reprod Sci* 2001; 67:101-111,
 83. Hideki F, Masashi I, Takasashi K, Correlation between the hipoosmotic swelling test and various sperm function tests, *Int Fertil* 1993; 38:311-315,
 84. Hinton BT, Setchell BO, Concentrations of glycerophosphocholine, phosphocholine and free inorganic phosphate in the luminal fluid of the rat testis and epididymis, *J, Reprod, Fert*, 1980; 58: 401- 406,
 85. Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J, Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C, *Theriogenology* 2003; 59:813-820,

86. Hori T, Matsuda Y, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T, Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs, *J Vet Med Sci* 2011; 73:1685–1688,
87. Hutcheon S, Thornton S, May J, Bishop M, Frozen-thawed epididymal spermatozoa is effective for intracytoplasmic spermatozoa injection: implications for the urologist, *Br J Urol* 1998; 81:607-611,
88. Ikeda H, Kikuchi K, Noguchi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T, Kaneko H. 2002. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm
89. Inskipp T, Gillett HJ, (Eds.) 2005, Checklist of CITES species and Annotated CITES Appendices and reservations, Compiled by UNEP- WCMC, CITES Secretariat, Geneva, Switzerland and UNEP-WCMC, Cambridge, UK, p 339, (CD-ROM),
90. Irvine D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken R, DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality, *J Androl* 2000; 21:33-44,
91. IUCN 2013, The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013.2, <<http://www.iucnredlist.org>>, Downloaded on 21 November 2013,
92. Iwamatsu Y, Chang MC, Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro, *J Reprod Fertil* 1971; 26: 197-208,
93. Johnston SD, Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital, *Clin North Am Small Anim Pract*,1991; 21:545-551,
94. Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PNS, Canine and Feline Theriogenology, Editors SD Johnston, MV Root-Kustritz and Olson PNS, WB Saunders 2001,
95. Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiez P, Anel L, Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem, *Theriogenology* 2003; 60:1249–1259,
96. Kampschmidt, R.F.; Mayer, D.T.; Herman, H.A. (1953) - Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 36: 733-742.
97. Kawakami E, Vandevootr CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreer JW, Comparison of fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm, *J, Exp, Zool*, 1993; 265:599-603,
98. Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, et,al, Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C, *Theriogenology*1998; 50:615-623,
99. Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R, Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C, *J Reprod Fertil* 1999; 116:217-22,
100. Kitt T, Schulz L, Tratado de Anatomía Patológica General, 2^{da} ed, Barcelona (España): Labor; 1985,
101. Kozdrowski R, Nizański W, Dubiel A, Olech W, Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study, *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:31,
102. Leibo SP, Songsasen N, Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species, *Theriogenology* 2002; 57:303-326
103. Lenin S, Chiriboga P, Pereira Castro, Evaluación de la fertilidad del semen canino fresco y congelado, en un perro de raza Pitbull Terrier, utilizando 3 Diluyentes, Tesis Doctoral, Guaranda, Ecuador, 2011,

104. Levy MN, Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic perfused Kidney, *Am J Physiol* 1959; 197: 11,
105. Mahadevan MN, Trouson A O, Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen, *Fert Ster* 1984; 41:287-293,
106. Man T, The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, Methuen & Co Ltd, London 1964; p 379-396,
107. Marks SL, Dupuis J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CC Jr, Conception by use of Post-mortem epididymal semen extraction in a dog, *J Am Vet Med Assoc* 1994; 204:1639–1640,
108. Martins de Carvalho A, Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino, Tesis doctoral, Universidad Complutense De Madrid, Madrid, 2005,
109. Mazur P, Leivo SP, Chu EHY, A two-factor hypothesis of freezing injury, *Exper Cell Res* 1972; 71:345-355,
110. Mazur P, Cryobiology: the freezing of biological system, *Science*, 1970; 168: 939-949,
111. Mei-Chu Hung, Koji Shibasaki, Riki Yoshida, Masao Sato and Katsumi Imaizumi, Learning behaviour and cerebral protein kinase C, antioxidant status, lipid composition in senescence-accelerated mouse: influence of a phosphatidylcholine–vitamin B12 diet, *British Journal of Nutrition* 2001; 86: 163-171,
112. Meintjes M, C Bezuidenhout, P Bartels, DS Visser, J Meintjes, NM Loskutoff, et al, In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's Zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*), *J Zoo Wildl Med* 1997; 28, 251-9,
113. 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; 95:755-63,
114. Morris GJ, Liposomes as a model system for investigating freezing injury, En Morris, GJ, Clarke A, (eds), *Effects of low temperature on biological membranes*, Academic press, London, 1981, p, 241-262,
115. Morton DB, Bruce SG, Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs, *J Reprod Fertil* 1989; 39:311-6,
116. Murakami M, Nishida T, Iwanaga S, Shiromoto M, Scanning and transmission electron microscopic evidence of epithelial phagocytosis of spermatozoa in the terminal region of the vas deferents of the cat, *Experientia* 1984; 40:958-960,
117. Myers RK, McGavin MD, Cellular and tissue responses to injury, In: McGavin MD, Zachary JF (eds), *Pathological Basis of Veterinary Disease*, 4th edn, Mosby Elsevier, St, Louis, MO, 2007; p, 1–62,
118. Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N, Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at –196°C, *Reproduction* 2001; 122: 463-467,
119. Norton DB, Artificial insemination with frozen semen in the dog, In: Jones DE, Joshua JO, Wrigth editors, *Reproductive clinical problems in the dog*, 2nd ed, London: Wrigth, 1988, p,169-186,
120. Nothling JO, Volkman DH, Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs, *J Reprod Fertil* 1997; 51:109-116,
121. Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M, Artificial Insemination With Seminal Plasma Improves the Reproductive Performance of Frozen-Thawed Boar Epididymal Spermatozoa, *J Androl* 2012; 33: 990–998,

122. Pace M.M., Graham EF, Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing, *J Anim Sci*, 1974; 39: 1144-1149,
123. Palacios Angola A, Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen, *Vet, Mex*, 1994; 25 (3):207-210,
124. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr, Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia, *J Urol*, 2002; 167 Supl 4:1753-6,
125. Paulens H, The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock, *Norw J Vet Med* 1993; 105:1135-1142,
126. Pendfold LM, Moore HDM, A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa, *J Reprod Fertil* 1993; 99: 131-134,
127. Peña AI, Quintela LA, Barrio F, Herradón P, 1994: Efecto de la adición de Dodecil Sulfato Sódico sobre la supervivencia postdescongelación de espermatozoides caninos. In: Proc 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, p. 481.
128. Peña A, Barrio F, Quintela L, Herradón P, Effects of Sodium Dodecyl Sulphate on Post-thaw Dog Semen Quality, *Reprod Dom Anim* 1998; 33: 393-398,
129. Peña A, Forsberg LC, Effects of Equex, one- or twostep dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa, *Theriogenology* 2000a; 54:859-875,
130. Peña A, Linde-Forsberg C, Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa, *Theriogenology* 2000b; 54, 703-718,
131. Peña Martínez AI, Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación, Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 1997,
132. Phillips EJ, Lardy HA, A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen, *J Dairy Sci*, 1940; 23:399-404,
133. Ponglowhapan S, Chatdarong K, Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa, *Theriogenology* 2008; 69: 666–672
134. Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL, Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes, *Anim Reprod Sci* 1998; 53:221-36,
135. Poulos A, Darin-Bennett A, White IG, The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa, *Comp Biochem Physiol* 1973; 46B: 541-549,
136. Pukazhenth 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: 135–141,
137. Pukazhenth B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelikaan K, et al, Challenges in cryopreservation of Clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa, Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 2004, p, 134-135, San Pablo, Brazil,
138. Pukazhenth B S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J, y Wildt, D, The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives, *Theriogenology* 2006; 66(1): 112-121,

139. Pursel VG, Jonshon LA, Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation, *Theriogenology* 1974; 1 suppl,2:63-68,
140. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA, Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm, *J Anim Sci* 1978; 47: 198-202,
141. Pushett DA, Lacham-Kapln O, Gunn IM, Trounson AO., Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for en- dangered species, *Theriogenology* 2000; 53: 400,
142. Quinn P, White I, The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa, *J Reprod, Fert*, 1966; 12: 263-270,
143. Quinn PJ, Chow PJW, White IG, Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site, *J Reprod Fert* 1980; 60:403-407,
144. Rodriguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T, Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa, *Theriogenology* 1994; 44: 885-900,
145. Rota A, Strom B, Fosberg CL, Rodríguez-Martínez H, Effects of EQUEx STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C, *Theriogenology* 1997; 47:1093-1101,
146. Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C, Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste, *Theriognology* 1999; 51: 1045-1058,
147. Rota A, Strom B, Fosberg C, Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C, *Theriogenology* 1995; 44: 885-900,
148. Salamon S, Maxwell WM, Storage of ram semen, *Anim Reprod Sci* 2000; 62:77-111,
149. Sankai T, Tsuchiya H, Ogonuki N, Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa, *Theriogenology* 2001; 55:1759-1768,
150. SAS Institute Inc, SAS/C Compiler and Library User's Guide, Release 6,00, (4th edition), Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996, 433 pp,
151. Sato M, Ishikawa A, Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival, *Theriogenology* 2004; 61: 1455-1469,
152. Savignone C, Stornelli MA, Stornelli MC, Arnaudín E, Tittarelli CM, Reyna JC, Stornelli MA, de la Sota RL, Regional histology of the ductus epididymidis in the Chinchilla laniger, In: *Proceedings of IX Argentinean Congress of Anatomy and Cell Biology*, vol, 1, FCV-UNLP; 2004a, p, 48,
153. Savignone C, Tittarelli C, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL, Survival of chinchilla laniger spermatozoa stored in the epididymides at 4°C and transported in three different media, *Proceedings of the 5th International Symposium on Companion and Exotic Animals*; 2004b, p,261 – 262, San Pablo, Brazil,
154. Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Gimenez F, de la Sota RL, Stornelli MA, Criopreservación de semen canino, *Aplicaciones y desarrollo, Sociedad De Medicina Veterinaria Del Uruguay* 2007; 42(167): 15-22,

155. Schimming B, Vicentini C, Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris*, L.), *Anat Histol Embryol* 2001; 30(6):327-32,
156. Shafer S and Holzman A, The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa, *Anim Reprod Sci* 2000; 59: 201-211,
157. Shankai T, Tsuchiya H, Ogonuki N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 55:1759-1768.
158. Song HB, Melican D, Gavin W, In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa, *Korean J Anim Sci* 1988; 30: 636-42,
159. Songsasen N, Betteridge KJ, Leibo SP, Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa, *Biol Reprod* 1997; 56: 143-52,
160. Songsasen N, Tong J, Leibo SP, Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 h after death, *J Exp Zool* 1998; 280: 189-196,
161. Southard JH, Senzig KA, Belzer FO, Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria, *Cryobiology* 1980; 17:148-53,
162. Stillely K, Pope CE, Leibo SP, Denniston RS, Godke RA, Survival of canine epididymal sperm stored at 4°C in the testicles, *Theriogenology* 2000; 53: 489,
163. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL, Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C, *Revista Brasileira de Reproducción Animal* 2001; 25 (3): 468-470,
164. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL, Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen, *Theriogenology* 2002; 57: 483,
165. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone C, Arauz MS, de la Sota RL, Comparison of different concentrations of Equex STM paste on viability of frozen- thawed dog spermatozoa, *Proceedings of the Third EVVSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, 2002, Liege, Bélgica*
166. Stornelli MA, Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 2004,
167. Strom-Holst B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H, Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay, *J Reprod Fert* 2000; 119: 201-206,
168. Sullivan R, Saez F, Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology, *Reproduction* 2013; 146(1):R21-35,
169. Tebet JM, Martins MIM, Chirinéa VH, Souza FF, Campagnol D, Lopez MD, Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa, *Theriogenology* 2006; 66, 1641-1644,
170. Thomas PGA, Surman V, Myers-Wallen VN, Concannon PW, Ball BA, Addition of sodium dodecyl sulphate to the Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa, In: *Proc 12th Int Cong Anim Reprod AT, The Hague, 1992, Vol4, p, 1823-1825,*
171. Tournaye H, Merdad T, Silber S, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al, No difference in outcome alter intracytoplasmic spermatozoa injection with fresh or frozen-thawed epididymal spermatozoa, *Hum Reprod* 1999; 14: 90-95,

172. Valdez D, Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado, Tesis doctoral, Universidad De Cuenca, Cuenca, Ecuador 2013,
173. Varesi S, Vernocchi V, Faustini M; Luvoni G, Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013, 55:17,
174. Walton A, 1930, The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens, *J Exp Biol* 201-219,
175. Watson PF, The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe, *J Reprod Fert*, 1975; 42: 105-111,
176. Watson PF, The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing, *J Thermal Biol* 1976; 1:137-141,
177. Watson PF, The effects of cold shock on sperm membranes, In: *Effects of low temperature on biological membranes*, London: Academic press; 1981, pp, 189–218,
178. Watson PF. The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fert*. 1981; 62: 483-492.
179. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil* 1995; 7:781-791.
180. Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 1996; 31: 135-140.
181. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 481-92.
182. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil* 1993; 5: 639-658.
183. Wood M. Thomas K. Schanauffer K. Troup S, Kingsland Ch, Lewis Jones I. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fertility and sterility* 2002; 77:1162-1166,
184. Yonai M, Geshi M, Nagai T, The effect of storage temperature of epididymis with testes on motility of sika deer (*Cervus nippon*) and equine spermatozoa. *Tohoku J Anim Sci Technol* 1998; 47:20-23.
185. Yu I, Leibo SP. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 2002; 57:1179–1190.
186. Zambelli D, Iacono E, Raccagni B, Merlo B. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste *Theriogenology* 2010; 73: 886–89.

BIOGRAFÍA DE LA AUTORA

La Médica Veterinaria Claudia Marcela Tittarelli nació en la ciudad de La Plata el día 19 de noviembre de 1962. Realizó sus estudios primarios y secundarios en la Escuela Normal Nacional Superior N°1, “Mary O’ Graham” de la ciudad de la Plata. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata en el año 1981 y obtuvo el título de Médico Veterinario en el año 1986. Posteriormente, realizó la carrera Docente Universitaria de la UNLP donde obtuvo el título de Docente Universitario Autorizado en el año 1996. Actualmente está finalizando su Tesina Final para obtener la Especialización en Docencia Universitaria en la UNLP:

En el año 1985, ingresó como ayudante alumna a la Cátedra de Semiología y Propedéutica de la UNLP donde desempeñó su actividad docente durante 10 años llegando a ocupar el cargo de Jefe de Trabajos Prácticos. En el año 1989 comenzó a desempeñar tareas docentes en la Cátedra de Fisiología Animal como Auxiliar Diplomado hasta el año 1999 cuando concursó el cargo de Jefe de Trabajos Prácticos dedicación Exclusiva hasta el año 2007, cargo que hoy desempeña en el Laboratorio de Reproducción Animal en las asignaturas Teriogenología y Biotecnologías de la Reproducción.

Reconociendo la necesidad de especializarse, en el año 2002 comenzó a trabajar en el Laboratorio de Teriogenología en reproducción de pequeños animales, y desde entonces ha realizado allí tareas de investigación y extensión. En el año 1994, comenzó a desarrollar su actividad como Docente Investigador del Programa de Incentivos y desde entonces ha participado en numerosos proyectos de

investigación, los de los últimos 12 años están relacionados a factores que afectan la reproducción de pequeños animales, en calidad de integrante. Como resultado de esta tarea ha publicado varios trabajos científicos y dictando cursos de posgrado.

A fines del año 2006 comenzó a desarrollar su Tesis Doctoral en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Stornelli. Una vez finalizado su doctorado, continuará trabajando en el manejo reproductivo de los pequeños animales. Además proseguirá en tareas de docencia, extensión e investigación, dirigidos a propietarios de mascotas y estudiantes de grado y posgrado.