

## EFFECTO DEL MEDIO Y EL TIEMPO DE ALMACENADO SOBRE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN CÉLULAS EPIDIDIMALES CANINAS

C.M. Tittarelli<sup>a\*</sup>, S.B. Jurado<sup>b</sup>, R.L. de la Sota<sup>a,c</sup>, M.A. Stornelli<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>b</sup>Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>c</sup>CONICET, Av. Rivadavia 1917. CABA. Argentina.

\*Autor de correspondencia: Calle 60y 118, La Plata, Argentina; email: titareli@fcv.unlp.edu.ar; Tel. +54-2214236663/4, Interno 455; fax +54-2214257980.

Recibido: Noviembre 2015. Aprobado: Marzo 2016.

Publicado: Junio 2016.

### RESUMEN

Nuestro objetivo fue evaluar cambios histológicos y ultraestructurales en epidídimos de caninos ( $n = 22$ ) almacenados a 4°C en dos medios [solución fisiológica (SF) o tris yema de huevo (TYH)]. Nuestra hipótesis fue que el almacenado de los epidídimos en TYH retrasaría los fenómenos de autólisis a nivel celular. Cuatro colas epididimales fueron fijadas y procesadas inmediatamente y las restantes 18 fueron almacenadas a 4°C en SF o TYH durante 24, 48 ó 72h. En los cortes histológicos, se puntuaron las características nucleares y la morfología de las estereocilias de 0 a 3. Los mismos grados se utilizaron en los cortes ultrafinos para la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias. Además, usando la microscopía electrónica de transmisión se registró el número y área nuclear y mitocondrial. En el estudio histológico, los parámetros cambiaron significativamente con el tiempo ( $p < 0,01$ ), aumentando los cambios morfológicos al aumentar el tiempo de almacenado. En el estudio ultraestructural, la cromatina nuclear y la morfología de las estereocilias desmejoraron con el tiempo ( $p < 0,01$ ) pero no hubo diferencias significativas entre los dos medios de almacenado. Asimismo, el número de mitocondrias disminuyó con el aumento del tiempo de almacenado ( $p < 0,05$ ) sin observarse efectos del medio ni del tiempo sobre las demás variables. En conclusión, estos resultados muestran que la SF y el TYH conservan por igual las células epiteliales caninas durante el almacenado.

**Palabras claves:** histología, ultraestructura, epidídimos, caninos, almacenado.

### EFFECT OF STORAGE MEDIA AND STORAGE TIME ON HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN CANINE EPIDIDYMAL CELLS

#### ABSTRACT

Our objective was to evaluate histological and ultrastructural changes in canine epididymis ( $n = 22$ ) stored at 4°C in two media [physiological solution (PS) or egg yolk tris (TEY)]. The hypothesis was that the epididymides stored in TEY autolysis delays phenomena at the cellular level. Four epididymal tails were fixed and processed immediately and the remaining 18 were stored at 4°C in SF or TEY for 24, 48 or 72h. The same grades were used for nuclear and chromatin morphology at the ultrathin sections. In addition, nuclear number, nuclear area, mitochondrial number and mitochondrial area using transmission electron microscopy were recorded. The nuclear characteristics and morphology of the stereocilia were scored from 0 to 3 at histological sections. The histological study, parameters changed significantly over time ( $p < 0, 01$ ), increasing the morphological changes over time. At the ultrastructural study, nuclear chromatin and morphology of the stereocilia were affected negatively over time ( $p < 0, 01$ ), but there were no significant differences between the two storage media. Also, the number of mitochondria decreased with increasing storage time ( $p < 0, 05$ ) with no observed effects on the other variables. In conclusion, these results show that TEY is as good as PS to preserve canine epithelial cells during storage.

**Keywords:** histological, ultrastructural, epididymides, canine, stored.

## INTRODUCCIÓN

Los avances obtenidos en biotecnologías 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 espermatozoides epididimales (EE) obtenidos ya sea luego de la muerte de un animal (recuperación postmortem), 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 epidídimos (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 [1, 2].

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 postmortem del organismo [3]. Se han realizado estudios [4, 5] que muestran la mayor sensibilidad de 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 [5]. La utilización de un medio de almacenado podría aumentar la protección al shock térmico directo durante el refrigerado, previniendo a su vez la deshidratación del epidídimo, mejorando la conservación de este órgano y conservando las características del medio interno epididimal, lo que redundaría en una mejor conservación de los espermatozoides [6,7].

La refrigeración a 4°C para preservar los órganos frena los procesos autolíticos postmortem 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 [8]. El descenso de la actividad celular con consumos mínimos de ATP es fundamental para controlar las cascadas de la lesión isquémica [9]. La preservación celular durante el almacenado puede alargarse de forma significativa si, además, se utiliza una solución de preservación apropiada [10].

El medio en el que se almacenan los EPI tiene influencia sobre la calidad de las células espermáticas recuperadas [11]. 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 postmortem se lleva a cabo en todas las células del organismo induciendo alteraciones [12], el estudio morfológico y ultraestructural de las células epididimales haría posible evaluar el daño ocurrido en ellas durante el almacenado de los EPI postmortem y estimar su potencial para mantener viables a los espermatozoides contenidos en el medio interno epididimal.

Nuestro objetivo fue evaluar los cambios histológicos y ultraestructurales en las células principales de epidídimos caninos (n = 22) almacenados a 4 °C en dos medios [solución salina (SF) o tris yema de huevo (TYH)]. Nuestra hipótesis fue que el almacenado de los epidídimos en TYH retrasaría los fenómenos de autólisis a nivel celular.

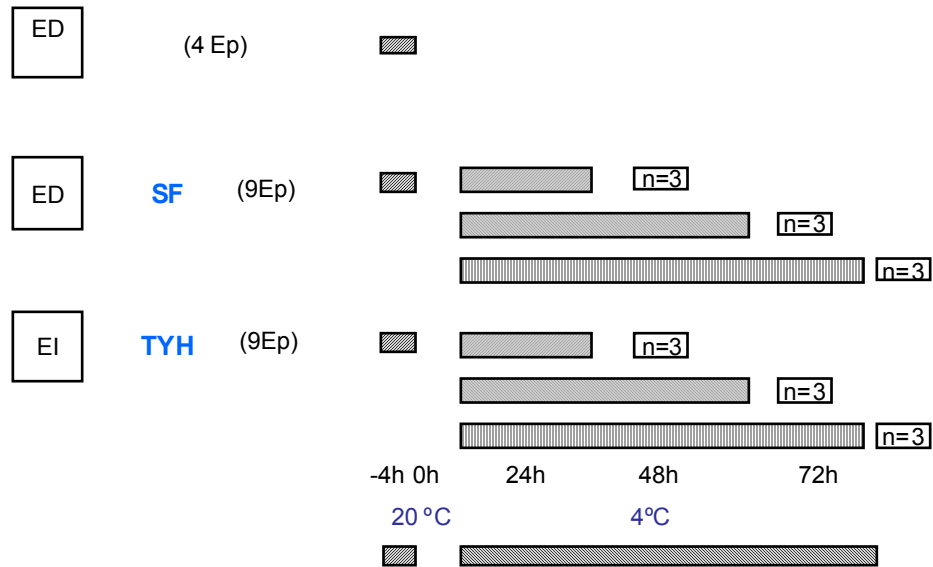
## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales experimentales y tratamientos**

Se utilizaron testículos de 13 caninos adultos, en estado de salud de entre 2 y 7 años de edad. Estos animales formaron parte de un plan de control de la reproducción. 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 (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 (n= 9) fueron rápidamente colocados en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, y en el tercer lote 9 testículos izquierdos (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/tratamiento; Fig. 1).



**Fig. 1.** Diseño experimental por especie. ED: epidídimo derecho, EI: epidídimo izquierdo, Ep: epidídimo.

Se evaluaron los cambios autolíticos ocurridos en las colas de los EPI a las 24, 48 y 72h de almacenado mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión [12]. 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<sup>3</sup>), se fijaron por inmersión con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,3) durante 2h 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 µm) 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 1; Figura 2) [13].

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). 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 2: Figura 3).

**Tabla 1:** 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 [14]; Myers y McGavin [13]

**Tabla 2.** Grados de cambios ultraestructurales de la distribución de la cromatina nuclear y morfología de las estereocilias en células principales de epidídimos 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 desaparejas
3	Fragmentada. Nucleoplasma claro	Destruídas o perdidas

Adaptado de Arrighi [14]; Myers y McGavin [13]

### Análisis morfométrico ultraestructural

El análisis morfométrico de las microfotografías electrónicas se realizó mediante un analizador de imágenes Image J 1.43e [15]. Se registraron los parámetros morfológicos en 180 microfotografías que permitieron el análisis de los cambios observados en las colas epididimales (n= 22). 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

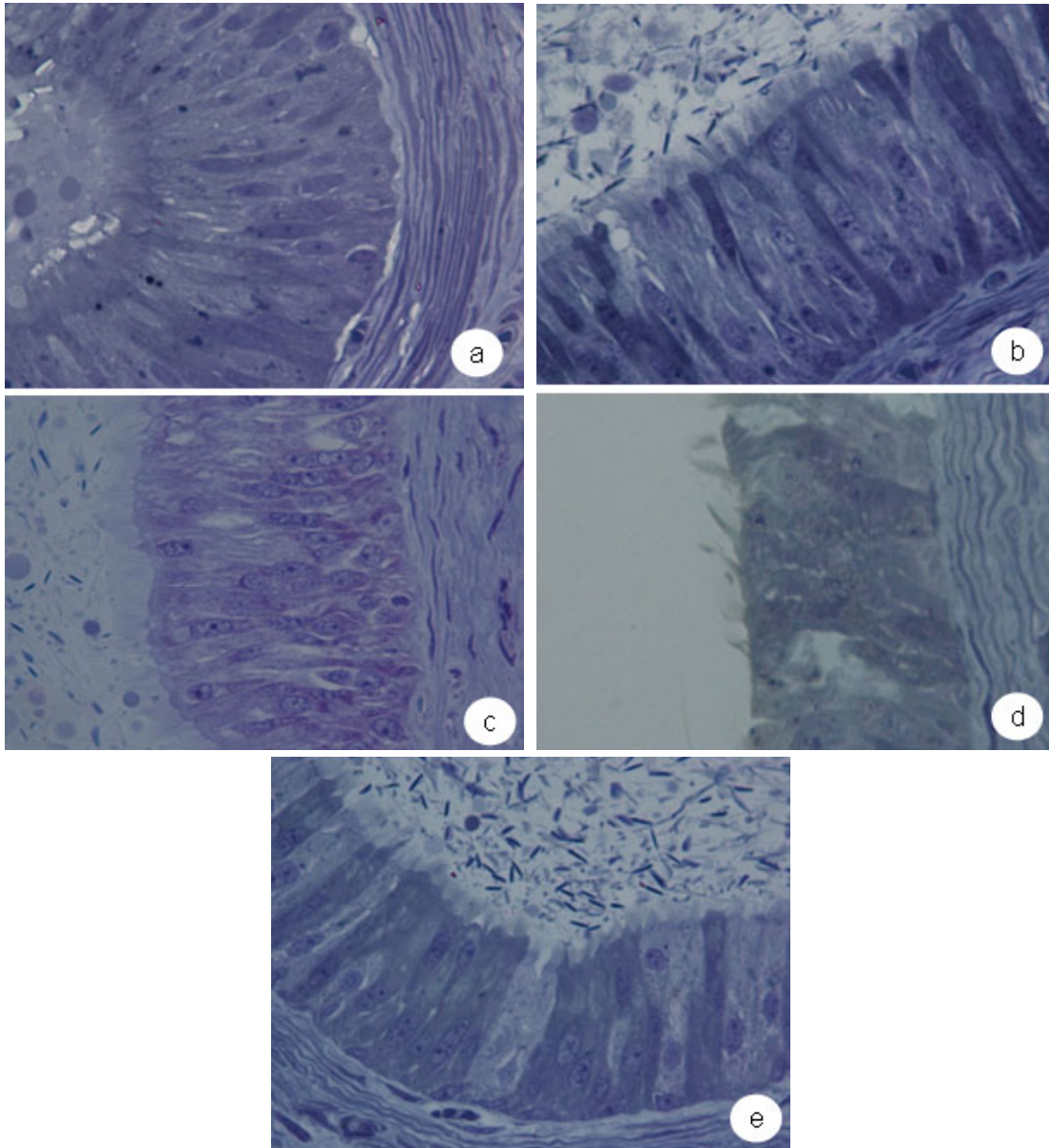
área y número de mitocondrias, y una unidad de área citoplasmática fija de 100  $\mu\text{m}^2$  para el análisis de área y número de núcleos. Por otro lado, dicha unidad de área citoplasmática fija permitió realizar la comparación mediante análisis estadístico de los distintos tratamientos. Cada uno 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 ( $\mu\text{m}$  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

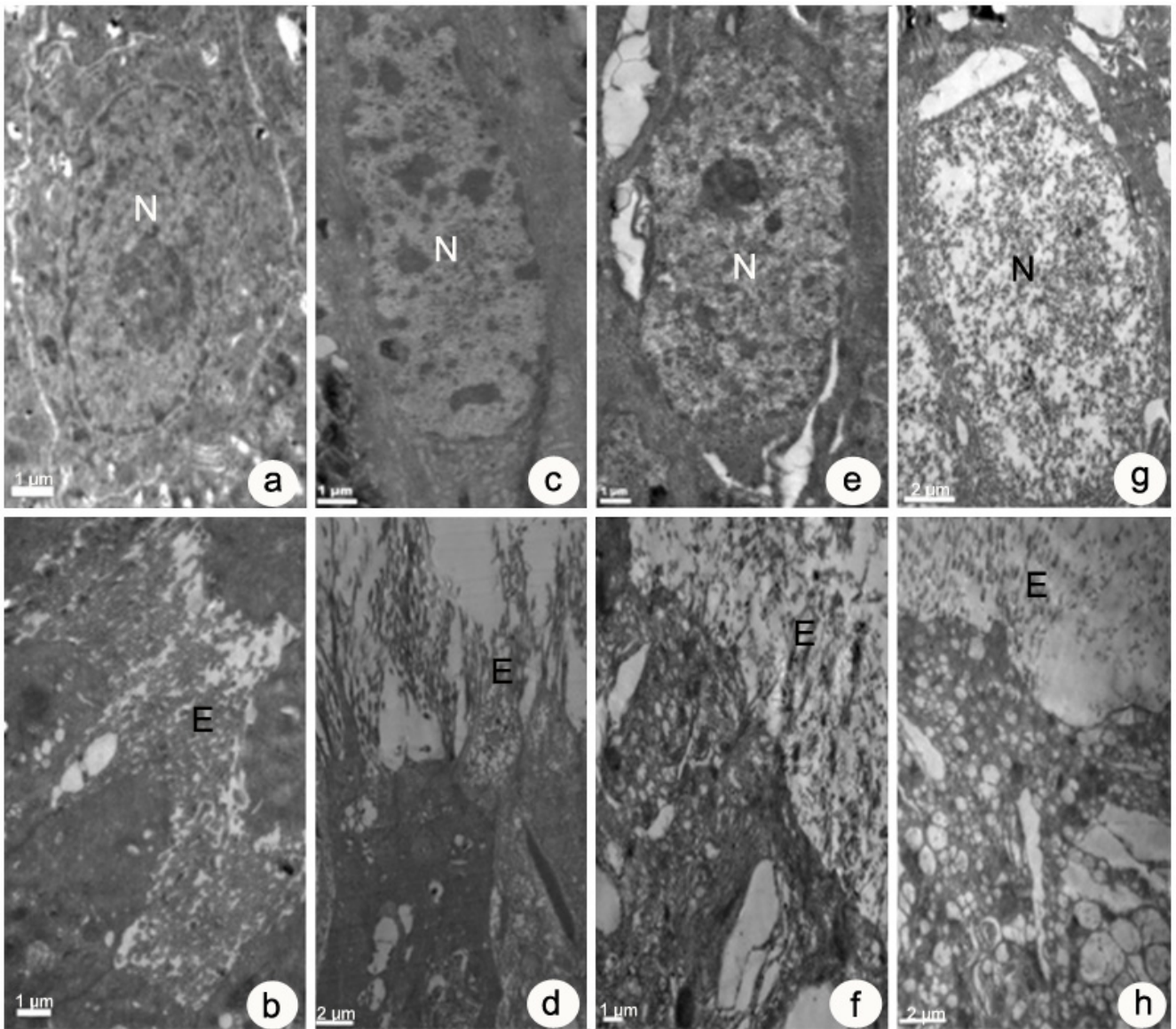
Las comparaciones estadísticas entre los diferentes tratamientos para variables cuantitativas fueron

realizadas utilizando el Análisis de Varianza con el procedimiento GLM de SAS® y para variables cualitativas fueron realizadas utilizando el procedimiento GENMOD de SAS ® [16]. Los parámetros morfológicos fueron expresados como la media  $\pm$  E.S. Las diferencias fueron consideradas significativas con un  $p < 0,05$ .



**Fig. 2.** 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.





**Fig. 3.** 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. N: Núcleo. E: estereocilias.

## RESULTADOS

El estudio histológico reveló que las características nucleares y la morfología de las estereocilias cambiaron con el tiempo (0 vs. 72h;  $0 \pm 0,23$  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. 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 estereocilias ( $p > 0,05$ ).

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. 72h,  $0 \pm 0,17$  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 ( $p > 0,05$ ). Así mismo, 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 ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

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, preservando la viabilidad de los EE almacenados en su interior.

Estudios previos [1, 2, 17] examinaron la calidad de los EE almacenados y recuperados, y 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 [2]. 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 [14, 18]. Asimismo, los cambios morfológicos y ultraestructurales observados en EPI almacenados concuerdan con cambios celulares relacionados con el proceso de muerte celular [13]. En este estudio óptico y ultraestructural observamos que los cambios morfológicos de las células incrementaron con el aumento del tiempo de almacenado. Estos resultados coinciden con los resultados observados por Tittarelli *et. al.* [1], donde los parámetros espermáticos fueron más bajos en espermatozoides recuperados a las 72h comparados con aquellos recuperados a las 24h de almacenado.

Así mismo, en los caninos, especie en la cual no se hallaron diferencias en los parámetros espermáticos al comparar el almacenado de EPI en SF y TYH [1], tampoco se evidenciaron cambios histológicos ni ultraestructurales significativos al comparar los órganos almacenados en los distintos medios de almacenado.

El espermatozoide en su recorrido hacia la maduración se torna más sensible a las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en el epidídimo que causan importantes daños sobre la bicapa lipídica [19]. Angrimani y col, [20] 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.

Tittarelli *et. al.*, [21] demostraron en un estudio similar realizado en felinos, una diferencia en los cambios morfológicos celulares entre los dos medios de almacenado. Sin embargo, en el presente trabajo sólo se encontraron diferencias en la morfología celular en relación al tiempo de almacenado transcurrido. Esta diferencia entre especies podría estar relacionada con el efecto protector de la yema de huevo (YH) contra el enfriamiento en las células caninas y felinas [22, 23]. Así como también, podría 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.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, este trabajo muestra que no hay diferencias significativas entre la SF y el TYH utilizados

como medios para almacenar epidídimos caninos hasta la recuperación de los EE.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado en parte por el subsidio de la UNLP V11 / V11 y 162 / 200. Los autores desean agradecer a la Señora Roxana Peralta por su asistencia técnica en el procesamiento de las muestras de microscopía óptica y electrónica de este estudio.

### REFERENCIAS

- [1] Tittarelli C.M., Savignone C.A., Arnaudín E., Stornelli M.C., Stornelli M.A., de la Sota R.L. (2006). "Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides" *Theriogenology* 66: 1637-1640.
- [2] Gañán N., Gomendio M., Roldan E. (2009) "Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 or 8°C on sperm quality and cryopreservation" *Theriogenology* 72: 1268–1277.
- [3] Songsasen N., Tong J., Leibo S.P. (1998) "Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 h after death" *J. Exp. Zool.* 80: 189–196.
- [4] Morton D.B., Bruce S.G. (1989) "Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs" *J.Reprod.Fertil.* 39:311-6
- [5] Yu I., Leibo S.P. (2002) "Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C" *Theriogenology* 57: 1179– 1190.
- [6] Kishikawa H., Tateno H., Yanagimachi R. (1999) "Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C" *J Reprod Fertil* 116: 217- 22.
- [7] Sankai T., Tsuchiya H., Ogonuki N. (2001) "Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa" *Theriogenology* 55: 1759- 1768.
- [8] Levy M.N. (1959) "Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic perfused Kidney" *Am. J. Physiol.* 197: 11.
- [9] Southard J.H., Senzig K.A., Belzer F.O. (1980) "Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria" *Cryobiology* 17: 148- 53.
- [10] Collins G.M., Bravo-Shugarman M., Terasaki P.I. (1969) "Kidney preservation for transportation, Initial perfusion and 30 hours' ice storage" *Lancet* 2: 1219.
- [11] Yonai M., Geshi M., Nagai T. (1998) "The effect of storage temperature of epididymis with testes on motility of sika deer (*Cervus nippon*) and equine spermatozoa" *Tohoku J. Anim. Sci. Technol.*, 47: 20-23.
- [12] Hayat MA. (1986). *Basic techniques for transmission electron microscopy*, London, Academic Press Inc; pp. 1152.
- [13] Myers R.K., McGavin M.D. Cellular and tissue responses to injury (2004), In: McGavin M.D., Zachary J.F. (eds), *Pathological Basis of Veterinary Disease*, 4th ed, Mosby Elsevier, St, Louis, MO, pp, 1– 62.
- [14] Arrighi S., Romanello M., Domeneghini C. (1986) "Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*)" *Arch. Biol.* 97: 7– 24.
- [15] Rasband W.S. (2012). ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- [16] SAS Institute Inc, SAS/C Compiler and Library User's Guide, Release 6.00, (4th edition), (1996) Cary, NC: SAS Institute Inc., pp. 433.
- [17] Armas S., Fernández V., Vásquez M., Santiani A. (2011) "Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía" *Rev. Inv. Vet. Perú.*, 22 (3): 199- 205.
- [18] Axner E., Malmqvist M., Linde-Forsberg C. and Rodriguez-Martinez H. (1999) "Regional Histology of the Ductus Epididymidis in the Domestic Cat" *J. Reprod. Dev.* 45 (2): 151– 160.



- [19] Irvine D., Twigg J., Gordon E., Fulton N., Milne P., Aitken R. (2000) "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality" *J. Androl.*, 21: 33-44.
- [20] Angrimani D.S., Lucio C.F., Veiga G.A., Silva L.C., Regazzi F.M., Nichi M., Vannucchi C.I. (2013). "Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa" *J. Androl.*, 22: 1- 1.
- [21] Tittarelli C.M., Jurado S.B., Núñez Favre R., Bonaura M.C., de la Sota R.L., Stornelli M.A. (2012) "Effect of storage media and storage time on histological and ultrastructural changes in cat epididymal cells" *Reprod. Dom. Anim.*, 47 (Suppl. 6): 281–283. doi: 10,1111/rda,12073, ISSN 0936–6768.
- [22] Quinn P., White I. (1966) "The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa" *J. Reprod. Fert.* 12: 263- 270.
- [23] De Leeuw F.E., Colenbrander B., Verkleij A.J. (1990) "The role membrane plays in cold shock and freezing injury" *Reprod. Dom. Anim., Suppl* 1: 95-104.