

## ALTERACIONES ULTRAMICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN ESPERMATOZOIDES FELINOS (*Felis catus*) CONGELADOS-DESCONGELADOS

### ULTRAMICROSCOPIC CHANGES OBSERVED IN SPERM CATS (*Felis catus*) FROZEN-THAWED

María Candela BONAURA<sup>1,2</sup>; Susana JURADO<sup>3</sup>; Romina NUÑEZ FAVRE<sup>1,4</sup>; Romina PRADERIO<sup>1</sup>; Claudia TITTARELLI<sup>1</sup>; María Alejandra STORNELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Reproducción Animal, Laboratorio de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup>Investigador Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Argentina. <sup>3</sup>Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <sup>4</sup>CONICET

#### RESUMEN

Los procesos de criopreservación seminal producen alteraciones estructurales en la célula espermática provocando disminución de la fertilidad al descongelado. El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en los espermatozoides felinos congelados-descongelados. Se utilizaron 16 gatos (n=16) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg, los cuales fueron sometidos a orquiectomía bilateral para la obtención de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo con la técnica de cutting. Los espermatozoides epididimales se congelaron con dos diluyentes diferentes: un DIL Tris Base y un DIL Tris con el agregado de 0,5% de Dimetilformamida y 4,5% de glicerol. Las muestras de espermatozoides epididimales frescos y congelados-descongelados se procesaron y observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II. Se evaluaron 100 cabezas y 100 colas por cada tratamiento. El porcentaje de espermatozoides sin daños ultramicroscópicos fue significativamente mayor en el semen fresco que en el semen descongelado (80,75±5,64 vs 10,25±1,24; 91,75±2,13 vs 59,27±3,92; p<0,05). Los procesos de congelación-descongelación producen alteraciones espermáticas ultraestructurales.

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

#### ABSTRACT

Cryopreservation procedure causes sperm structural disorders decreasing fertility. The aim was to study ultramicroscopic damage observed in frozen-thawed sperm. Mixed breed tomcats (n=16) that underwent bilateral orchietomy at a municipal public pet shelter were used in the study. Sperm samples were obtained by cutting the cauda epididymis and frozen using Tris base extender with dimetilformamide 0.5% and 4.5% of glycerol or without dimetilformamide and 5% glycerol. Sperm samples were observed in a transmission electron microscope JEM 1200 EX II. For each treatment 100 heads and 100 tails were evaluated. The percentage of intact sperm was higher in fresh spermatozoa than frozen-thawed sperm (80.75±5.64vs10.25±1.24; 91.75±2.13vs59.27±3.92; p<0.05). Frozen-thawed procedure produce ultrastructural damage.

**Keywords:** cat, sperm, cryopreservation, ultramicroscopy.

Recibido noviembre 21, 2013 - Aceptado diciembre 20, 2013

\* Correspondencia de autor: María Alejandra Stornelli. Cátedra de Reproducción Animal, Laboratorio de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. Av. 60 y 118 s/n (CP 1900). La Plata, Argentina. e-mail: [astornel@fcv.unlp.edu.ar](mailto:astornel@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides felinos pueden ser preservados, luego de su recolección, mediante la adición de un diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación). Durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, los espermatozoides están sometidos a diferentes tipos de estrés, los cuales pueden producir alteraciones celulares. Es así que la criopreservación provoca alteraciones de las membranas y del metabolismo celular causando disminución de la fertilidad al descongelado (1,2). Algunos cambios ocurridos en las membranas del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación son similares a los producidos durante los procesos de capacitación y reducen la longevidad espermática (3). Estos cambios estructurales de la célula espermática pueden ser observables mediante microscopía electrónica (ME). Es así que el estudio de la ultraestructura espermática nos brinda información detallada sobre la integridad del espermatozoide pudiendo ser una herramienta sumamente útil en la detección de alteraciones estructurales que interfieren en el proceso de fecundación (4).

Para establecer el grado de injuria asociado al proceso de congelado-descongelado de los espermatozoides es necesario realizar una serie de estudios, entre los cuales el examen morfológico estructural y ultraestructural es de vital importancia (1, 5). La ME entre otras técnicas es una herramienta sumamente útil en el análisis de los espermatozoides después del proceso de congelación-descongelación (6). Si bien el uso de la microscopía de fluorescencia es una excelente herramienta para evaluar la función biológica de los espermatozoides, el estudio ultraestructural de una delgada sección usando un microscopio electrónico

puede proveer una información más detallada de la estructura subcelular (7, 8). De esta forma, células espermáticas morfológicamente normales al microscopio óptico (MO) pueden poseer alteraciones estructurales detectables al microscopio electrónico. Es decir que el uso de la ME permite identificar alteraciones en los espermatozoides que no son visibles al MO (9).

Se han observado diferentes alteraciones mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET) y de barrido (MEB) en el semen congelado-descongelado.

Algunas de las alteraciones ultramicroscópicas descritas en el perro son alteración acrosómica, distribución irregular del contenido acrosómico e hinchamiento, vesiculación de la membrana acrosomal externa, hinchamiento y pérdida de la homogeneidad y densidad del contenido acrosómico (4, 10). Si bien se han observado daños estructurales en diversas localizaciones espermáticas, las observaciones realizadas sugieren que el proceso de criopreservación compromete especialmente la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa y las mitocondrias (6). Estudios ultramicroscópicos realizados por algunos investigadores sugieren que el acrosoma es una estructura especialmente sensible, siendo el porcentaje de acrosomas dañados, uno de los factores que compromete la fertilidad de los espermatozoides (11, 12,13).

Sa-Ardrit y col. (6), congelaron espermatozoides de elefante utilizando 2 diluyentes diferentes, uno con el agregado de glicerol y otro con el agregado Dimetil sulfóxido (DMSO). El estudio ultraestructural permitió observar un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en las muestras congeladas con el diluyente que contenía glicerol. Este resultado

podría atribuirse a la toxicidad del DMSO ya que ambos medios poseían osmolalidades similares (1480 mOsm DMSO vs 1478 mOsm glicerol) (6). Es así que el estudio ultraestructural del semen congelado-descongelado permite observar no solo la ocurrencia del daño celular sino también la estructura afectada permitiendo estimar el impacto protector del diluyente (4, 14).

Debido a que aún no se encuentran estandarizados los protocolos de congelación para la preservación de espermatozoides felinos, la utilización de la ME podría brindar datos que permitan mejorar los protocolos de congelación con el consecuente aumento de la supervivencia espermática al descongelado. Es así que el estudio ultramicroscópico resultaría de gran valor para evaluar el comportamiento de un diluyente en los diferentes compartimentos celulares.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en los espermatozoides felinos congelados-descongelados.

Nuestra hipótesis fue que los espermatozoides felinos congelados-descongelados presentan alteraciones ultraestructurales relacionadas con la formulación del DIL utilizado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Se utilizaron 16 gatos (n=16) mestizos (*Felis silvestris catus*), de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual en un diseño aleatorio (15). Los gatos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral (16), los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal se colocaron rápidamente en solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a

temperatura ambiente y se trasladaron al laboratorio. Los EPI se procesaron dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separó cada cola del epidídimo y se atemperaron en un baño termostático a 37°C durante 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los espermatozoides epididimales (EE) se realizó mediante la técnica de cutting de la cola del epidídimo (17).

Para realizar la congelación de los EE de los felinos experimentales se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Los EE obtenidos por cutting se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Se utilizó un DIL TRIS sin agregado de DMF [TRIS0] o con el agregado de 0,5% de DMF y 4,5% de glicerol [TRISDMF]. El DIL TRIS que se utilizará tendrá la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (5 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomicina (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para (csp) 100ml) (18). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (19), los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (20). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 15 segundos (21).

Se realizó el estudio ultraestructural de los EE frescos y los EE congelados-descongelados en cada uno de los DIL utilizados con el fin de estudiar los cambios que provocan los procesos de congelación-descongelación sobre la célula espermática en relación al DIL utilizado (4).

### Estudio ultraestructural

#### Microscopía electrónica de transmisión

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

Los EE criopreservados se descongelaron y procesaron de la misma forma que los EE frescos.

Se calculó el IC de la contrastación ultramicroscópica de acuerdo a la siguiente ecuación:  $IC = \text{valor de la contrastación descongelado} / \text{valor de la contrastación en fresco}$ .

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA. Las variables categóricas fueron analizadas con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS®.

#### Marco bioético del uso de animales

Los experimentos se realizaron respetando y de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los

animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA. Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras sangre y procedimientos quirúrgicos (22).

### RESULTADOS

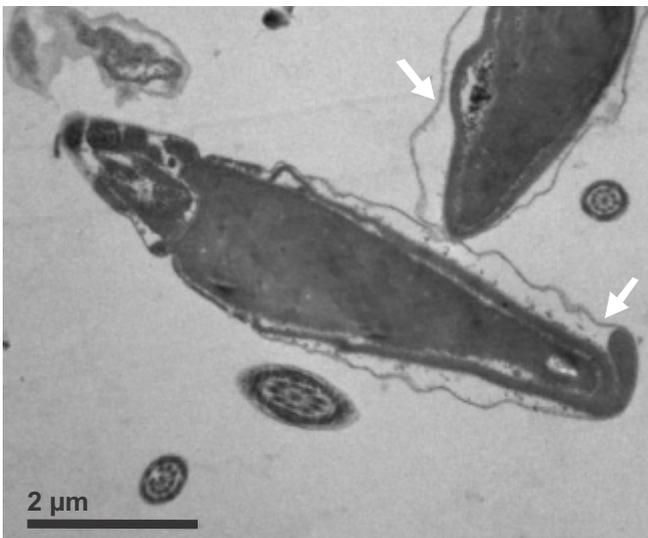
En los EE frescos el  $80,75 \pm 5,64\%$  de las cabezas y el  $91,75 \pm 2,13\%$  de las colas mostraron morfología normal. En algunas células se observó la presencia de anomalías como alteraciones acrosomales, defecto de "Dag", colas dobles, cabezas dobles, axonemas incompletos (Figs. 1 a 4).



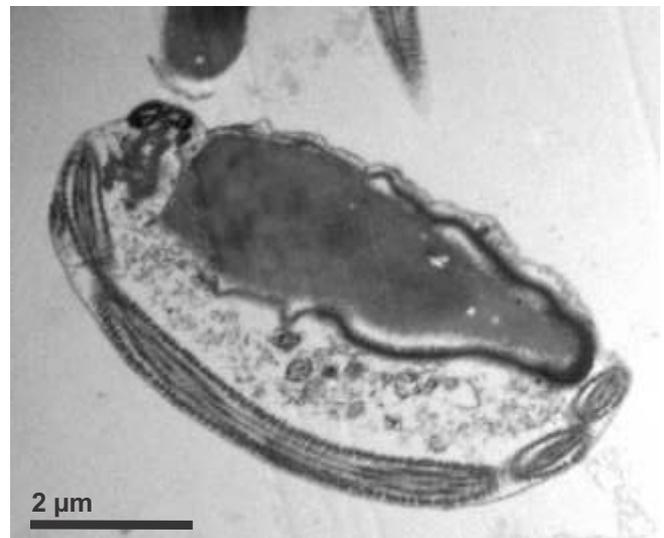
Figura 1. Espermatozoides frescos. Se observan cabezas dobles (flecha gris), gota citoplasmática (flecha blanca), colas dobladas (flechas negras).



Figura 2. Espermatozoides frescos. Se observan colas dobles.



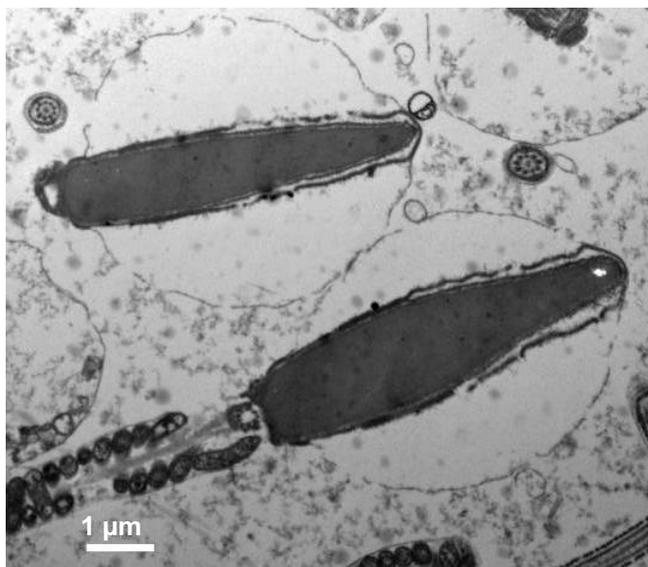
**Figura 3.** Espermatozoides frescos. Corte longitudinal a nivel de la cabeza. Se observan acrosomas defectuosos (flechas).



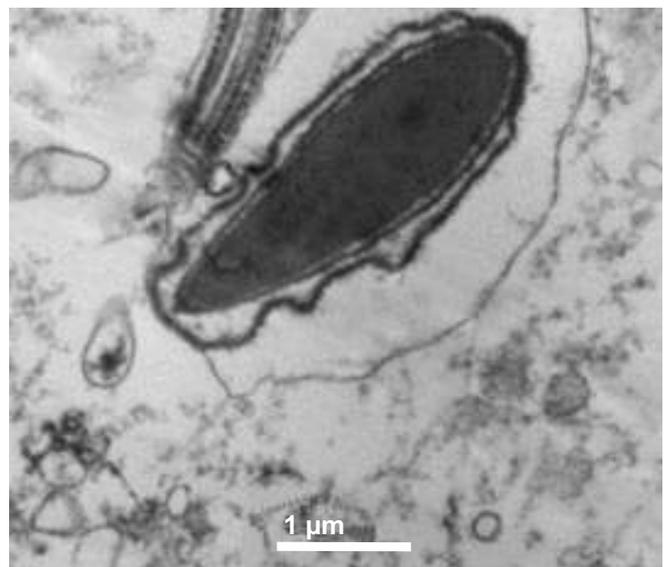
**Figura 4.** Espermatozoide fresco. Defecto de "Dag": caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta.

En las muestras de EE congelados-descongelados, las alteraciones ultraestructurales observadas fueron: hinchazón, formación de pliegues y ruptura en la

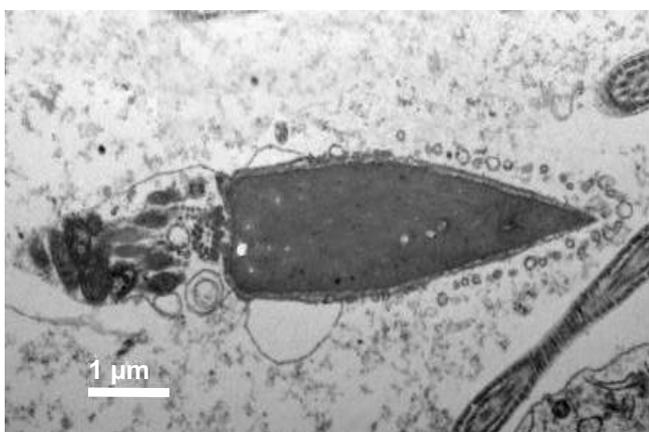
membrana plasmática y acrosomal, vesiculación en la membrana acrosomal externa y plasmática y vacuolas mitocondriales (Figs. 5 a 8)



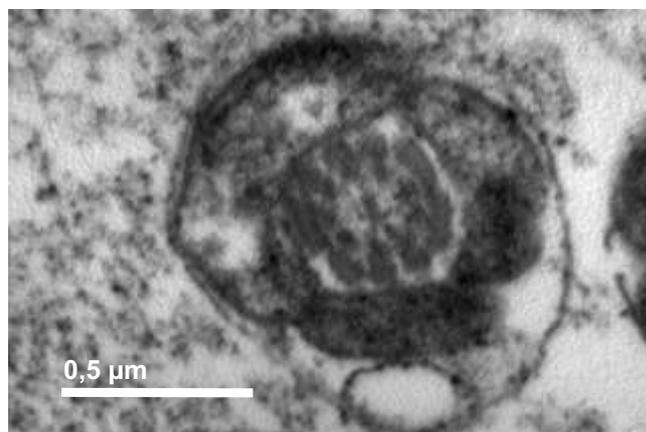
**Figura 5.** Espermatozoides congelados-descongelados. Membrana plasmática muy hinchada. Membrana acrosomal ligeramente hinchada.



**Figura 6.** Espermatozoides congelados-descongelados. Membrana plasmática y acrosomal muy hinchadas.



**Figura 7.** Espermatozoides congelados-descongelados. Fusión de las membranas acrosomales. Formación de vesículas.



**Figura 8.** Espermatozoides congelados-descongelados. Mitocondrias hinchadas.

El porcentaje de espermatozoides sin daños ultramicroscópicos fue significativamente mayor, tanto en las cabezas como en las colas, en los EE frescos en comparación con los EE congelados-descongelados (80,75±5,64 vs 10,25±1,24; 91,75±2,13 vs 59,27±3,92

respectivamente,  $p < 0,05$ ).

La localización de los daños ocurridos durante la congelación-descongelación pueden observarse en la Tabla 1.

## LOCALIZACIÓN DEL DAÑO

### Cabeza

Membrana plasmática rota y ausencia de acrosoma	17,30% ±2,30
Membrana plasmática hinchada	7,50%±0,70
Membrana plasmática hinchada y ausencia de acrosoma	4,30%±1,00
Membrana plasmática rota	4,15%±0,15

### Cola

Membrana plasmática hinchada	26,00%±4,00
Mitocondrias vacuoladas	13,60%±0,05

**Tabla 1:** Localización celular de los daños espermáticos observados en los EE congelados-descongelados expresados en porcentaje ± ES.

Cuando se compararon los daños observados al descongelado en cada uno de los DIL utilizados, no se encontraron diferencias en el porcentaje total de

espermatozoides íntegros ni en el porcentaje de membrana acrosomal y/o plasmática alterada, vacuolización mitocondrial o pérdida de microtúbulos.

## DISCUSIÓN

El estudio ultramicroscópico realizado nos permitió estimar el grado de daño producido por los procesos de congelación-descongelación sobre las células espermáticas y sus estructuras así como el efecto protector o no de los diluyentes utilizados con el fin de estimar cual sería el efecto de los mismos sobre la viabilidad espermática en felinos al descongelado.

A partir de los datos obtenidos en nuestro trabajo podemos afirmar que en los procesos de congelación-descongelación se producen alteraciones ultraestructurales en la célula espermática que pueden afectar la supervivencia y/o capacidad fecundante de los espermatozoides felinos criopreservados, como ha sido demostrado en otras especies (23, 24).

Woolley y Richardson evaluaron la ultraestructura del espermatozoide humano durante las distintas etapas del proceso de congelación-descongelación detectando, al igual que lo observado en nuestros resultados, una disminución de células íntegras luego del proceso de criopreservación (25).

La localización celular de los daños observados al descongelado en los espermatozoides felinos estudiados en nuestro trabajo concuerda con los sitios de daño descritos en otras especies, luego de que los espermatozoides fueran sometidos al proceso de enfriado, congelado y descongelado (4, 26, 27).

Woolley y Richardson en sus observaciones en espermatozoides humanos, destacaron alteraciones acrosomales como hinchazón y aumento de la heterogeneidad del contenido acrosomal, estando limitado al segmento apical, ya que el segmento ecuatorial se mantuvo inalterado (25). Nuestros resultados muestran que en el gato doméstico las alteraciones que predominan en la cabeza son la

ruptura o hinchazón, en distintos grados, de la membrana plasmática y ausencia del acrosoma.

La formación de vesículas observadas mediante ME en la membrana acrosomal de algunos espermatozoides felinos congelados-descongelados representaría cambios similares a la capacitación ocurridos durante el proceso de criopreservación tal como se ha descrito en otras especies (28, 29, 30). Las vacuolas encontradas en las mitocondrias de los espermatozoides criopreservados podrían estar relacionadas con el acumulo de agua o con un proceso degenerativo, hecho descrito por algunos autores en relación al fenómeno de apoptosis celular (24, 31). Se ha descrito que luego de la formación de cristales de hielo durante la congelación estos pueden causar daño intracelular (25, 32, 33, 34, 35, 36).

Las estructuras celulares tienen diferente susceptibilidad frente a distintas condiciones subóptimas o fisicoquímicas causantes de estrés celular hecho que varía entre las especies, y que podría determinar las diferencias en el tipo de alteración que se presenta en mayor cuantía (13). Así mismo se ha demostrado que la membrana que rodea la cabeza difiere en estructura y permeabilidad de la membrana que rodea el flagelo, factor que podría explicar la diferencia en la cuantía de daño observada en la cola y la cabeza (37).

Así mismo, si bien existen trabajos que demuestran relación entre el tipo y localización del daño y el impacto de distintos componentes incluidos en el diluyente para mejorar el efecto protector (38), en el presente estudio y bajo las condiciones experimentales realizadas el agregado de DMF no aumentó el efecto protector del DIL.

Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (39, 40, 41), es posible que los

espermatozoides felinos requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de glicerol por amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de DMF al descongelado.

Podemos concluir, que el estudio ultramicroscópico reveló un mayor porcentaje de alteraciones en los espermatozoides felinos congelados-descongelados en comparación con los espermatozoides frescos hecho que muestra que el proceso de criopreservación afecta a

la célula espermática.

### AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con la colaboración de la Técnica Biológica Roxana Peralta del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Además se contó con la cooperación del Centro de Zoonosis de la Municipalidad de La Plata.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
2. Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7: 781-791.
3. Paulens H (1993) The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock. *Norw J Vet Med* 105: 1135-1142.
4. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA (2008) La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. *Analecta Veterinaria* 28(1): 7-14.
5. Parks J, Graham J (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
6. Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, Pinyopummin A (2006) Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int J Androl* 29: 346-352.
7. Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Levos C, Thtaranne M, Lanzac J (1990) Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl* 25: 29-40.
8. Markova MD (2004) Electron microscopic observations of human sperm whole-mounts after extraction for nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF). *Int J Androl* 27: 291-295.
9. Tasseron F, Amir D, Schindler H (1977) Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reprod Fertil* 51: 461-462.
10. Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB (1982) Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. *Fertil Steril* 38 (2): 227-232
11. Christensen P, Parlevliet J, van Buiten A, Hyttel P, Colenbrander B (1992) Ultrastructure of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. En: *Proceeding of the VIth International Symposium Equine Reproduction* pp 197-198.
12. Grondahl C, Grondahl M, Hyttel P, Greve T (1994) Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. *Anat Embryol* 190: 195-200.
13. Blottner S, Warnke C, Tuschscherer A, Heinen, V, Torner H (2000) Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 25: 75-88.
14. Savignone CA, Jurado SB, Tittarelli CM, Reyna JC, Stornelli MC, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA (2008) Efecto de la trealosa en la estabilización de membranas en espermatozoides caninos criopreservados. IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. Santa Fe 6 de agosto; pp 214-215.
15. Petersen RG (1985) Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc., New York.
16. Slatter D (1993) Textbook of small animal surgery. 2nd. edition WB. Saunders, Philadelphia; pp. 1325-1335.
17. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL (2006) Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66: 1637-1640.
18. Zambelli D, Canepplre B, Castagnetti C, Belluzzi S (2002) Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim* 37 (5): 310-313.
19. Luvoni CG (2008) Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66: 101-111.
20. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, Ferreira TH, Papa FO, Tacconeli CA, Lopes MD (2009) Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Artificial insemination in domestic cats. Anim Reprod Sci* 114(4): 434-442.
21. Chatdarong Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axner E (2010) Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 45(2): 221-227.
22. CIOMS (1985) Council for International Organizations of Medical Sciences. International guiding principles for biomedical research involving animals.

23. Stornelli MA, Savignone CA, Jurado S, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL (2004) Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. IX Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, comunicación 96, pp 48.
24. Silva A, Fontelle-Neto J, Cardoso R, Silva L, Chirinea V, Lopes M (2009) Description of ultrastructural damage in frozen-thawed canine spermatozoa. *Cienc Anim* 10: 595-601.
25. Woolley DM, Richardson DW (1978) Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fert* 53: 389-394.
26. Jones RC, Stewart DL (1979) The effect of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 56: 233-238.
27. Quinn PJ, White LG, Cleland KW (1969) Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fert* 18: 209-220.
28. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C (1993) Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fert* 47: 279-285.
29. Stornelli MA (2004) Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
30. Mansilla Hermann D, Jurado S, Nuñez Favre, R, Stornelli MC, Stornelli MA (2012) Alteraciones ultramicroscópicas observadas en semen canino (*Canis lupus familiaris*) congelado descongelado. XIII Jornada de Divulgación Técnico-científica. Santa Fe, 8 de agosto, p. 191.
31. Blanc-Layrac G (2000) Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Molecular Biology* 46: 187-197.
32. Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK (1993) Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod* 49: 112-123.
33. Gao GY, Liu J, Liu C, Mcgann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK (1995) Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10: 1109-1122.
34. Watson PF (1976) 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* 1: 137-141.
35. Watson PF (1981) The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris GJ, Clarke A (eds). *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press, Orlando, USA, pp. 189-218.
36. Watson PF, Duncan G (1988) Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 25: 131-142.
37. Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Plöen L (1989) Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J Reprod Fert* 87: 613-626.
38. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone C, Jurado S, de la Sota RL (2004) Viability study ultraestructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex stm paste concentrations. *Biotechnol/Sperm* pp. 516.
39. Holt WV (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
40. Peña A, Linde-Forsberg C (2000) Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859-875.
41. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M (2006) Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1848-1858.