

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio-Perfeccionamiento

PERIODO 1/5/2010 a 31/4/2014

1. **APELLIDO:** Bonaura

NOMBRES: María Candela

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): bonaura874@hotmail.com

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN FELINOS DOMÉSTICOS

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/05/2010

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/05/2011

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/05/2012

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/05/2013

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata

Facultad: Ciencias Veterinarias

Departamento: Producción Animal

Cátedra: Reproducción Animal

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 118 **N°:** sn

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:** 4236663/4

5. **DIRECTOR DE BECA**

Apellido y Nombres: Stornelli María Alejandra

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica: astornel@fcv.unlp.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

EXPOSICIÓN DETALLADA DE BECAS DE ESTUDIO Y PERFECCIONAMIENTO REALIZADAS EN EL PERIODO 2010-2014:

BECA ESTUDIO PRIMER AÑO

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE TREALOSA A UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA AL DESCONGELADO EN FELINOS

Objetivo

Evaluar el efecto de la adición de trealosa al diluyente Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado.

Hipótesis

La incorporación al diluyente Tris Base de concentraciones de trealosa que no modifiquen la osmolaridad del TRIS producirá una mayor acción protectora sobre los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se utilizaron gatos (n=4) mestizos, 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 (1). Los animales fueron alojados en una habitación acondicionada y sometidos a un régimen de luz artificial de fotoperíodo largo (14 horas luz diarias), con lámparas incandescentes de 100 W (2), a fin de mantener estable la producción espermática (3). Luego de permanecer 45 días en este régimen de luz, los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.), xylazina (1mg/kg i.m.) y atropina [0.04 mg/kg i.m.; (4)] y sometidos a electroeyaculación para obtención de un eyaculado (5). El procedimiento se realizó 1 vez cada 20 días en cada animal.

Para realizar la congelación de semen de los felinos experimentales se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Un eyaculado de cada gato se mezcló con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizó un DIL TRIS sin agregado de trealosa [TRIS0] o con el agregado de, 0,312% (3,3 mOsm) [TRIST] de trealosa. El DIL TRIS que se utilizó tiene la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (4 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomina (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para (csp) 100ml) (6). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (7), el semen diluido se envasó en pajuelas de 0,25 ml y congeló de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (8). La descongelación del semen se realizó a 37 °C durante 15 segundos (9).

Pruebas de contrastación del material seminal in vitro

Los eyaculados obtenidos se colocaron en un baño termostático a 37°C. y fueron sometidos a las siguientes pruebas de contrastación:

Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; 106/ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (10); 2) Motilidad individual (MI), 10 de semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de

espermatozoides con motilidad progresiva (10, 11); 3) Vigor (VI, escala 1-5) 10 l de semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el tipo de movimiento individual (10, 11); 4) Porcentaje de vivos (PV), se colocó 10 l de semen puro con 10 l de semen en glicerina 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 observó por microscopía a 1000 X (10); 5) Morfología espermática (ME; % anomalías primarias y secundarias), se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur. (10); 6) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (12); 7) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas), una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP; 13). El semen congelado descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación microscópica que el semen fresco.

Análisis estadístico

Las variables categóricas fueron analizadas con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS® (14).

Resultados

Se incluyeron 4 gatos (n=4), en 3 animales pudo realizarse el estudio de 8 eyaculados, dos menos de lo establecido en el plan debido a que se demoró más de lo esperado en seleccionar y adaptar a los animales. En uno de los gatos solo pudo realizarse el estudio de 3 eyaculados ya que en el inicio del experimento el animal presentó un cuadro de insuficiencia renal y muerte. Debido a que el estudio había comenzado hacía 4 meses y a que si se ingresaba un nuevo animal debía permanecer 45 días sometido al fotoperíodo fijo antes de ser incluido en la rutina de extracción y congelación de semen no había tiempo suficiente para que el animal muerto fuera reemplazado.

Se observaron diferencias significativas cuando se compararon valores del semen fresco vs el semen descongelado en todos los parámetros seminales estudiados ($P < 0.01$). Los valores obtenidos en IM, AI (27.5 ± 1.9 ; 46.93 ± 2.0) muestran que los diluyentes actuaron eficientemente en la protección de las membranas espermáticas. Los valores obtenidos al descongelado en MI fueron bajos (11.25 ± 2.4) pero el VI fue bueno (3 ± 0.09). Cuando se comparó la acción del diluyente TRIS base vs el diluyente TRIS, en el semen congelado con trealosa se observó una tendencia a producir al descongelado mayores porcentajes en todos los parámetros estudiados, sin embargo ninguno de los parámetros seminales mostró ser significativamente diferente a los valores obtenidos con el semen congelado con TRIS base (43.16 ± 3.3 vs 47.5 ± 3.1 ; 7.95 ± 2.6 vs 9.86 ± 2.5 ; 2.08 ± 0.2 vs 3.13 ± 0.6).

Discusión

La acción protectora de disacáridos como la trealosa fue observada en especies como el canino y el ovino, sin embargo las concentraciones de este disacárido en el diluyente son diferentes según la especie estudiada. En el ovino se logran buenos resultados con el agregado de 5% de trealosa lo cual causa hipertonicidad del medio (15, 16, 17). En caninos las concentraciones utilizadas en ovinos producen daños a nivel de la cola espermática afectando la motilidad seminal (18). En esta especie, la adición de trealosa en concentraciones que no modifiquen la osmolalidad del diluyente tris base permite mejorar la calidad del semen al descongelado observándose la acción estabilizadora de la trealosa sobre la membrana plasmática. En nuestro trabajo no se observó efecto

protector de la trealosa sobre el semen felino congelado descongelado. Es posible que el semen felino necesite un diluyente con concentraciones de trealosa mayores a las utilizadas, sin llegar a concentraciones que produzcan una osmolalidad que afecte la viabilidad espermática, para que pueda observarse la acción protectora del disacárido.

Conclusión

Es posible que el semen felino necesite un diluyente con concentraciones de trealosa mayores a las utilizadas para poder ejercer un efecto protector, sin llegar a una concentración que afecte la viabilidad espermática.

Bibliografía

1. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
2. Giménez, F.; Stornelli, M.C.; Tittarelli, C.; Savignone, C.; Videla Dorna, I.; de la Sota, RL. Stornelli MA. (2006).. Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66: 681-682.
3. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. 2009. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*). *Reprod Dom Anim* 44 (2): 287-290.
4. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2° ed. Philadelphia; 1993. p. 1325-1335.
5. Stornelli MA. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. *Physiological aspects of feline reproduction. Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), Jan/Mar. 2007. p 71-76.
6. Zambelli D, Canepprle B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*. 2002, 37 (5):310-313.
7. Luvoni CG. 2008. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66:101-111.
8. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, Ferreira TH, , Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. 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*. 2008, 21.
9. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen *Theriogenology* 68 (2007) 1326–1333
10. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. 2001. Canine and feline *Theriogenology*. WB Saunders. Philadelphia pp. 287-306.
11. Axner E, Linde-Fosberg C. 1998. Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds) G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. pp. 105-111.
12. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. 1992. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil*. 95:755-763.
13. Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert*. 88:343-52.
14. SAS/STAT., S., User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989: p. 1684.
15. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53:1053-61.
16. Bakas LS, Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 1991; 28:347-53.

17. Chen T, Fowler A, Torner M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40:277-82.
18. Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Gimenez F, de la Sota RF, Stornelli MA. (2007a) Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo. *Revista Veterinaria, de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*. 2007, 42 (167):15-22.

BECA ESTUDIO SEGUNDO AÑO

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DODECIL SULFATO DE SODIO A UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA AL DESCONGELADO EN FELINOS

Objetivo

Evaluar el efecto de la adición de SDS en cantidades medias al diluyente Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado.

Hipótesis

La incorporación al diluyente Tris Base de SDS en cantidades medias producirá una mayor acción protectora sobre los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se utilizaron gatos (n=4) mestizos, 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 (1). Los animales fueron alojados en una habitación acondicionada y sometidos a un régimen de luz artificial de fotoperíodo largo (14 horas luz diarias), con lámparas incandescentes de 100 W (2), a fin de mantener estable la producción espermática (3). Luego de permanecer 45 días en este régimen de luz, los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.), xylazina (1mg/kg i.m.) y atropina [0.04 mg/kg i.m.; (4)] y sometidos a electroeyaculación para obtención de un eyaculado (5). El procedimiento se realizó 1 vez cada 20 días en cada animal.

Para realizar la congelación de semen de los felinos experimentales se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Un eyaculado de cada gato se mezcló con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizará un DIL TRIS sin agregado de SDS [TRIS0] o con el agregado de 0,25% de SDS [TRISSDS]. El DIL TRIS que se utilizó tiene la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (4 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomycin (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para (csp) 100ml) (6). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (7), el semen diluido se envasó en pajuelas de 0,25 ml y congeló de acuerdo a la técnica descripta por Andersen (8). La descongelación del semen se realizó a 37 °C durante 15 segundos (9).

Pruebas de contrastación del material seminal in vitro

Los eyaculados obtenidos ser colocaron en un baño termostatzado a 37°C. y sometidos a las siguientes pruebas de contrastación:

Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; 106/ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (10); 2) Motilidad individual (MI), 10

□1 de

semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (10, 11); 3) Vigor (VI, escala 1-5) 10 l de semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el tipo de movimiento individual (1011); 4) Porcentaje de vivos (PV), se colocó 10 l de semen puro con 10 l de semen en glicerina 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 observó por microscopía a 1000 X (10); 5) Morfología espermática (ME; % anomalías primarias y secundarias), se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur. (10); 6) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de Pisum sativum aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (12); 7) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas), una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP; 13). El semen congelado descongelado fue sometido a las mismas pruebas de contrastación microscópica que el semen fresco.

Análisis estadístico

Las variables categóricas fueron analizadas con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS® (14).

Resultados

Se observaron diferencias significativas cuando se compararon los valores del semen fresco versus el semen congelado-descongelado en todos los parámetros seminales (MI, VI, AI, IM) estudiados ([61,6±7vs15,8±1,8, 3,16±0,16vs2,9, 53,3±2vs32,6±1,1, 58,3±5,2vs20,1±2,6]; P<0.01). Los valores obtenidos en IM y AI (32,6±1,1; 20,1±2,6) muestran que los diluyentes actuaron en la protección de las membranas espermáticas. Los valores obtenidos al descongelado en MI fueron bajos (15,8±1,8) pero el VI fue bueno (2,9±0.03). Cuando se comparó la acción del diluyente TRISSDS vs el diluyente TRIS0 los parámetros seminales MI y IM mostraron ser significativamente superiores en el semen congelado con tris base con el agregado de SDS (23.21±2.12 vs 8.57±1.06; 23.5±4.23 vs16,85±3.08). El porcentaje de AI mostró una tendencia a ser superior en el TRISSDS en comparación con el TRIS0 (33,35±1.36 vs 32±1.95)

Discusión

Se ha comprobado la acción del SDS sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejorando el efecto crioprotector de los DIL de semen en algunas especies (15,16). Compuestos que contienen SDS solo o como un componente del Equex STM paste u Orvus han sido incluidos en DIL de semen usados para la congelación de semen canino y felino (16, 17). Sin embargo la adición de altos porcentajes de estas sustancias afecta la estabilidad de las membranas plasmáticas y acrosomal (18). En las muestras estudiadas hasta el momento en nuestro trabajo se observó efecto protector del SDS sobre el semen felino congelado descongelado. El estudio de la totalidad de las muestras planteadas permitirá definir mas claramente la acción protectora del SDS agregado a un diluyente Tris base sobre los espermatozoides felinos durante los procesos de congelación-descongelación.

Conclusión

Un diluyente tris base que posea en su composición el agregado de SDS ejerce un efecto protector mayor que sobre los EE congelados-descongelados que un DIL tris base sin el agregado de SDS.

Bibliografía

1. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
2. Giménez, F.; Stornelli, M.C.; Tittarelli, C.; Savignone, C.; Videla Dorna, I.; de la Sota, RL. Stornelli MA. (2006).. Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66: 681-682.
3. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. 2009. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*). *Reprod Dom Anim* 44 (2): 287-290.
4. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2º ed. Philadelphia; 1993. p. 1325-1335.
5. Stornelli MA. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. *Physiological aspects of feline reproduction*. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), Jan/Mar. 2007. p 71-76.
6. Zambelli D, Canepplre B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*. 2002, 37 (5):310-313.
7. Luvoni CG. 2008. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66:101-111.
8. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, Ferreira TH, , Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. 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*. 2008, 21.
9. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen *Theriogenology* 68 (2007) 1326–1333
10. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. 2001. Canine and feline *Theriogenology*. WB Saunders. Philadelphia pp. 287-306.
11. Axner E, Linde-Fosberg C. 1998. Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds) G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. pp. 105-111.
12. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. 1992. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. *J. Reprod. Fertil*. 95:755-763.
13. Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert*. 88:343-52.
14. SAS/STAT., S., User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989: p. 1684.
15. Arriola, J.; Foote, R.H. (1987). Glycerolation, and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci*. 70: 1664-1670.
16. Pursel VG, Shulman LL, Jonshon LA. Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. *J. Anim. Sci*. 1978; 47:198-202.
17. Axner F, Hermansson U, Linde Fosberg 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

18. Stornelli MA. Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2004.

BECA PERFECCIONAMIENTO PRIMER AÑO

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA EN REEMPLAZO DE PARTE DEL GLICEROL A UN DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA AL DESCONGELADO EN FELINOS

Objetivo

Evaluar el efecto de la adición de DMF a un Diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos al descongelado.

Hipótesis

La incorporación al Diluyente Tris base de DMF permitirá reducir la cantidad de glicerol adicionada al DIL y obtener un DIL en el cual se minimicen los efectos tóxicos del glicerol sobre los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se utilizaron gatos (n=16) mestizos, 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 (13). Los gatos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral (15), los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal se colocaron en SF con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y se enviaron rápidamente al laboratorio. Los EPI fueron procesados 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 la cola del epidídimo y se atemperó en un baño termostático a 37°C por 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los espermatozoides epididimales (EE) se realizó por cutting de la cola del epidídimo (16). Luego de la recuperación espermática, se realizaron pruebas de contrastación microscópicas in vitro.

Para realizar la congelación de los EE de los felinos experimentales se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Los EE obtenidos por cutting fueron mezclados con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50 x10⁶ espermatozoides/ml. Se utilizó un DIL TRIS sin agregado de DMF [TRIS0] o con el agregado de 0.5% de DMF y 3,5% de glicerol [TRISDMF]. El DIL TRIS que se utilizó tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (4 g), yema de huevo (20% v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomina (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para (csp) 100ml) (18). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (5), los EE diluidos se envasaron en pajuelas de 0,25 ml y congelaron de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (17). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 15 segundos (2).

Pruebas de contrastación del recuperado epididimal in vitro

Los EE obtenidos en Tris base se colocaron en un baño termostático a 37°C y se sometieron a las siguientes pruebas de contrastación:

Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; 106/ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (10); 2) Motilidad individual (MI), 10 l de

EE frescos se colocaron en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observaron por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (10, 1); 3) Vigor (VI, escala 1-5) 10 l de EE

frescos se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el tipo de movimiento individual (10, 1); 4) Morfología espermática (ME; % anomalías primarias y secundarias), se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur. (10); 5) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (12); 6) Integridad de membrana (IM, % membranas intactas), una muestra de EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP) (7).

Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación microscópica que los EE frescos.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas fueron analizadas con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS® (14).

Resultados

Se observaron diferencias significativas en MI, VI, IM entre los EE pos obtención y los EE congelados-descongelados ($57,5 \pm 3,08$ vs $7,5 \pm 1,88$; $4,75 \pm 0,15$ vs $4 \pm 0,2$; $66,5 \pm 2,77$ vs $8,5 \pm 1,82$; $p < 0,001$). Los EE congelados con TRIS-DMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los EE congelados descongelados con TRIS.

Discusión

Nuestros hallazgos concuerdan con lo observado en caninos (5, 8). En contraposición con lo observado en nuestro trabajo en equinos y en aves (9, 6, 15, 12) se observó un efecto benéfico de la DMF sobre la supervivencia espermática al descongelado. Lo expuesto podría deberse a las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana espermática en las diferentes especies (16).

Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (3, 4) 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. Sin embargo la concentración de glicerol óptima para la supervivencia de los espermatozoides descongelados depende de varios factores, y puede ser influenciada por otros componentes del diluyente, por las tasas de enfriado y método de congelación-descongelación. Es así que estos factores también podrían influir en nuestros resultados y deben ser considerados en futuros experimentos. Estudios donde se varíe la concentración y/o tipo de amida, son necesarios para determinar si las amidas mejoran la supervivencia espermática al descongelado en los felinos.

Conclusión

El agregado de 0,5% de DMF no ejerció efectos protectores sobre los EE cuando se lo comparó con TRIS. El agregado de un mayor porcentaje de DMF al DIL podría mostrar efectos benéficos sobre la protección de los EE al descongelado.

Bibliografía

1. Axner E, Linde-Fosberg C. 1998. Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds) G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. pp. 105-111.
2. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen *Theriogenology* 68 (2007) 1326–1333
3. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 1997; 49:831-41.
4. Giménez, F.; Stornelli, M.C.; Tittarelli, C.; et al. Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006; 66: 681-682.
5. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
6. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26–38.
7. Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88:343-52.
8. Hermansson U, Axner 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.
9. Howard JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and wild animal medicine IV*. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 1999; p 449–57.
10. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. 2001. *Canine and feline Theriogenology*. WB Saunders. Philadelphia pp. 287-306.
11. Luvoni CG. 2008. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66:101-111.
12. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. 1992. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 95:755-763.
13. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
14. SAS/STAT., S., User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989: p. 1684.
15. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2° ed. Philadelphia; 1993. p. 1325-1335.
16. 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 (2006) 1637-1640.
17. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, Ferreira TH, , Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. 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.* 2008, 21.
18. Zambelli D, Canepprle B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim.* 2002, 37 (5):310-313.

BECA PERFECCIONAMIENTO SEGUNDO AÑO

ESTUDIO ULTRAMICROSCÓPICO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES CONGELADOS-DESCONGELADOS EN FELINOS

Objetivo

Estudiar las alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides epididimales felinos congelados-descongelados.

Hipótesis

Los espermatozoides epididimales congelados-descongelados presentan alteraciones ultraestructurales relacionadas con la formulación del diluyente utilizado.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

Se utilizaron gatos (n=31) mestizos, 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 (1). Los gatos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral (2), 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 enviados rápidamente 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 la cola del epidídimo y se atemperó en un baño termostatzado 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 por la técnica de cutting de la cola del epidídimo (3).

Se utilizó un diluyente (DIL) Tris Base (Tris [2,4 g], ácido cítrico [1,4 g], fructosa [0,6 g], glicerol [4 g], yema de huevo [20% v/v], penicilina sódica [0,06 g], sulfato de estreptomycin [0,1 g], y agua destilada (csp) 100ml; 4), un DIL Tris con el agregado de 0,5% de Dimetilformamida (DMF) y 4,5% de glicerol, un DIL Tris base con el agregado de 0,312% (3,3 mOsm) de trealosa (TREA) y un DIL Tris con el agregado de 0,25% Dodecilsulfato de sodio (SDS). Los EE obtenidos por cutting fueron mezclados con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50 x10⁶ espermatozoides/ml. Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (5), los EE diluidos se envasaron en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (6). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 15 segundos (7).

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 (8).

Los EE frescos se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 horas a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora a 4 °C y posteriormente, los EE se deshidrataron en una serie creciente

de alcoholes y se incluyeron en resina Epoxi (8). Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron 100 cortes de cola y 100 cortes de cabeza al microscopio electrónico de transmisión (MET).

Las pajuelas de EE criopreservados fueron descongeladas y posteriormente procesadas de la misma forma que EE frescos.

Se calculó el IC de contrastación ultramicroscópicas de acuerdo a la siguiente ecuación: (IC=valor de la contrastación descongelado/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® (9).

Resultados

En los EE frescos el 80,75±5,64% de las cabezas y el 91,75±2,13% de las colas mostraron una morfología normal. Se observó la presencia de las siguientes anomalías: alteraciones acrosomales, quistes acrosomales, defecto de "Dag", colas dobles, cabezas dobles, axonemas incompletos.

En las muestras congeladas con TRIS, SDS y DMF porcentaje de espermatozoides sin daños ultramicroscópicos en cabeza y cola fue significativamente mayor en los EE frescos en comparación con los EE congelados-descongelados (80,75±5,64vs21±5,7; 80,75±5,64vs25,71±6,95; 80,75±5,64vs10±2,69; 80,75±5,64vs10,5±1,11; 91,75±2,13vs51,80±6,78; 91,75±2,13vs53,53±6,23; 91,75±2,13vs64,66±4,41, 91,75±2,13vs52,8±6,02, p <0.05).

En las muestras de EE congelados-descongelados con TRIS, DMF y con SDS las alteraciones ultraestructurales observadas fueron: hinchazón, y formación de pliegues y ruptura en la membrana plasmática y acrosomal, vesiculación en la membrana acrosomal externa y plasmática y vacuolas mitocondriales.

No se observó un efecto protector de la DMF sobre la morfología espermática la descongelado. Sin embargo, el estudio ultramicroscópico reveló una tendencia a ser inferior la ocurrencia de membranas hinchadas en la cola espermática en las muestras congeladas-descongeladas con el agregado de SDS en comparación con aquellas congeladas con Tris (35,8 ±9,86 vs 29,5 ±8,26).

Discusión

Nuestros resultados describen algunas anomalías espermáticas observadas al MET en el gato doméstico. Algunas de esas anomalías fueron previamente descritas por Long (10).

Long, sugiere que al aumentar la incidencia de teratospermia en el gato doméstico, la eficiencia reproductiva decrece; agregando que la disfunción acrosomal y el compromiso de la capacitación podrían ser responsables del bajo éxito en la fertilización en gatos domésticos teratospérmicos (10). Axner y col. han indicado que gatos con bajos porcentajes de espermatozoides normales son capaces de producir crías (11). Si bien los resultados obtenidos durante mis experimentos muestran altos porcentajes de espermatozoides normales solo una prueba de campo permitiría confirmar el potencial fértil de los animales que fueron utilizados en esta investigación.

La membrana plasmática es considerada el sitio inicial de injuria inducida por los procesos de criopreservación (12). Se ha descrito que los componentes estructurales de la membrana plasmática durante el proceso de congelación se comportan en forma diferente frente a los distintos factores de estrés como por ejemplo el shock térmico o estrés osmótico (13). La localización celular de los daños observados al descongelado en los espermatozoides felinos estudiados en mi beca concuerda con los sitios de daño

descriptos en otras especies, luego que los espermatozoides fueran sometidos a procesos de enfriado, congelado y descongelado (14, 15, 16). Pudo observarse que en el gato doméstico los daños más frecuentemente observados fueron ruptura o hinchazón de la membrana plasmática (MP) y acrosomal en distintos grados. La formación de vesículas observadas entre la membrana acrosomal y plasmática de algunos espermatozoides felinos congelados-descongelados representarían cambios similares a la capacitación ocurridos durante el proceso de criopreservación tal como se ha descrito en otras especies. (17, 18, 19). Estos daños fueron descriptos en carneros (20) y en perros en los cuales se utilizaron diluyentes conteniendo trealosa y SDS (19, 21, 22). Silva detalló alteraciones similares a las encontradas en este trabajo en semen canino fresco y criopreservado con un diluyente Tris-yema de huevo (23). Al igual que lo observado en mis resultados, en el semen fresco los espermatozoides presentaron pequeñas ondulaciones en la membrana acrosomal externa (MAE) pero conservaron la estructura y el contenido acrosomal. El semen criopreservado mostró hinchazón de la MP. En contraposición a lo observado en mi trabajo Silva observó pérdida del contenido acrosomal y en las mitocondrias se observaron cristales inmersos en la matriz ocupando su lugar (23).

Algunos autores sugieren que la acumulación de agua intramitocondrial podría indicar que el espermatozoide sufre un proceso degenerativo en relación al fenómeno de apoptosis celular (23, 24). Es así que las vacuolas encontradas en este trabajo en las mitocondrias de los espermatozoides pos-descongelación podrían estar relacionadas con el acumulo de agua dentro del organoide en relación al estrés celular sufrido durante la congelación-descongelación.

En humanos las anomalías mitocondriales afectan directamente la motilidad (25). Pudiendo el funcionamiento mitocondrial ser un importante factor para la supervivencia del espermatozoide en el tracto genital femenino. Wolley (26) comunicó cambios en el acrosoma de espermatozoides humanos congelados con un DIL con Tris-yema de huevo-citrato hipotetizando que esos cambios ocurren durante o después del descongelado. Se observaron alteraciones semejantes en semen congelado de elefante utilizando diluyentes con diferentes crioprotectores (Dimetil sulfóxido (DMSO) vs glicerol). Si bien se observaron cambios durante todo el proceso de criopreservación, los cambios más marcados ocurrieron luego de la descongelación. Los espermatozoides criopreservados con el DIL que contenía DMSO presentaron más daños ultraestructurales que aquellos criopreservados con glicerol. (27).

Si bien existen trabajos que demuestran la relación entre el tipo y localización del daño y el impacto de distintos componentes incluidos en el diluyente para mejorar el efecto protector (28), en el presente estudio 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 (29, 30, 31), 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. Por otro lado, si bien no pudo observarse un efecto benéfico sobre la ultraestructura del espermatozoide con la incorporación de SDS al diluyente de congelación en felinos se detectó una tendencia a disminuir el porcentaje de membranas hinchadas en las colas.

Conclusión

El estudio ultramicroscópico nos permitió describir algunas anomalías presentes en los espermatozoides felinos. Asimismo reveló un mayor porcentaje de daños en los espermatozoides felinos congelados-descongelados en comparación con los espermatozoides frescos, hecho que demuestra que el proceso de criopreservación afecta a la célula espermática. El agregado de 0,5% de DMF a un DIL Tris para congelar EE en el gato doméstico no ejerció efectos protectores sobre los EE cuando

se lo comparó con TRIS. En mi beca de estudio de segundo año pudo observarse, al microscopio óptico, un efecto benéfico sobre la motilidad al incorporar de SDS al diluyente de congelación Sin embargo al microscopio electrónico se observó sólo una tendencia a disminuir el porcentaje de membranas plasmáticas hinchadas en las colas espermáticas.

Podemos concluir que la microscopía electrónica nos brinda una herramienta útil para evaluar la morfología celular. El estudio 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.

Inconvenientes:

Al finalizar la beca he procesado y analizado el 75% de las muestras. El 25% restante corresponden al DIL que contiene TREA en su composición, dichas muestras fueron fijadas, procesadas y cortadas para ser evaluadas al MET no pudiendo esto ser posible a causa de un desperfecto en el MET que no permitió observar las muestras en el tiempo propuesto.

Bibliografía

1. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
2. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2º ed. Philadelphia; 1993. p. 1325-1335.
3. 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 (2006) 1637-1640.
4. Zambelli D, Canepprle B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in s traws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*. 2002, 37 (5):310-313.
5. Luvoni CG. 2008. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66:101-111
6. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, Ferreira TH, , Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. 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*. 2008, 21.
7. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen *Theriogenology* 68 (2007) 1326–1333.
8. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. (2008). “La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino”. *Analecta Veterinaria* 28(1): 7-14.
9. SAS/STAT., S., User’s Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989: p. 1684.
10. Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard J. (1996). “Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats”. *Biology of reproduction*. 54: 638-646

11. Axner E and Linde Forsberg C. (2007). "Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study". *Reprod Dom Anim.* 42: 282–291
12. Morris. Effect of low temperatura on biological membranes. (1981) 241-262
13. Nagy, s.; Házás, g.; Bali-Papp, a.; Ivancsics, j.; Sas, j.r.f.; Kovács, a.; Foote, r.h. Evaluation of sperm tail membrane by light microscopy. *Theriogenology*, v. 52, p. 1153-1159, 1999.
14. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. (2008). "La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino". *Analecta Veterinaria* 28(1): 7-14.
15. Jones RC; Stewart DL. (1979). The effect of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultraestructure of bull spermatozoa. *J Reprod. Fert.* 56:233-238.
16. Quinn PJ; White LG; Cleland KW. (1969). Chemical and ultraestructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod. Fert.* 18: 209-220.
17. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. (1993). "Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa". *J. Reprod Fertil.* 47: 279-285.
18. Stornelli MA. (2004). Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
19. 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; pp191.
20. Aisen, E.; Quintana, M.; medina, V.; Morello, H.; Venturino, A. Ultramicroscopy and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v. 50, p. 239-249, 2005.
21. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli C, de la Sota RL. Ultraestructural analysis of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa. 8th Inter American Congress of Electron Microscopy. La Habana- Cuba. 25-30 de septiembre de 2005.
22. Stornelli MA. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. Physiological aspects of feline reproduction. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), Jan/Mar. 2007. p 71-76.
23. Silva A; Fontelle-Neto J; Cardoso R; Silva L; Chirinea V; Lopes M. (2009). Description of ultraestructural damage in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciancia Animal Brasileira*. 10: 595-601 (2).
24. Blanc-Layrac. (2000). Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Molecular Biology*. 46:187-197.
25. RAO, B.; SOUFIR, J.C.; MARTIN, M.; DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, v. 24, p.127-134, 1989.
26. Woolley DM; Richardson DW. (1978). Ultraestructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod. Fert.* 53: 389-394.
27. Ardrit M. (2006). Ultraestructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *International journal andrology* 29: 346-352.
28. 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.
29. Hermansson U, Axner 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.
30. Tebet JM, Martins M.I.M, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66:1629–1632

31. Filho AC, Teles CHA, Jucá RP, et al. Dymethylformamide as cryoprotectant of canine semen diluted and frozen in ACP-106C. Theriogenology 2011; 76:1367-1372.

Otros inconvenientes:

El numero de muestras indicado en cada experimento es menor al numero total de muestras procesadas en cada año, sin embargo las mismas no juntaron los requisitos necesarios para continuar con las diferentes etapas planteadas para cada muestras.

A partir de los datos obtenidos se puede afirmar que en los procesos de congelación-descongelación se producen alteraciones estructurales y metabólicas en la célula espermática que pueden afectar la supervivencia y/o capacidad fecundante de los espermatozoides felinos criopreservados. Nuestro trabajo se focalizó en el desarrollo de un diluyente que permita mejorar la supervivencia espermática al descongelado. Si bien el agregado al diluyente Tris base de detergentes mostró un efecto benéfico sobre los espermatozoides al descongelado nuestros resultados revelan la necesidad de más estudios a fin de lograr un diluyente óptimo. En las condiciones experimentales empleadas y con las concentraciones utilizadas el agregado de TREA o DMF al diluyente tris base no produjo una mejora significativa en los parámetros seminales evaluados.

El estudio ultramicroscópico nos permitió describir las anormalidades que presentan los espermatozoides felinos, también se pudo observar los daños que se generan en los mismos durante el proceso de criopreservación. Aún queda un intenso trabajo por mejorar los protocolos de congelación en el gato doméstico para obtener los resultados deseados.

Otras tareas desarrolladas:

- Durante el período informado realicé dos (3) presentaciones a congreso a nivel nacional como primera autora (XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV – UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL, XV Congreso y 12avas Jornadas de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas La Plata) ; dos (2) presentaciones a congreso a nivel internacional como primera autora [Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico (CIC provincia de Buenos Aires); 12th Inter-American Microscopy Congress CIASEM (CIASEM)].

- Colaboré con los trabajos desarrollados en el grupo de trabajo participando en 2 presentaciones a congreso a nivel nacional (XV Congreso y 12avas Jornadas de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas La Plata, XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV – UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL).

- Realice 5 cursos de perfeccionamiento y asistí a 2 reuniones científicas. Envié un trabajo y fue aceptado para la presentación a congreso (Casilda 2014). Obtuve la aceptación de 3 trabajos para su publicación en revistas científicas como autora, 2 nacionales y 1 internacional (ANALECTA y Sociedad de Ciencias Morfológicas; Revista CIASEM) y 2 nacionales como colaboradora (ANALECTA).

- Durante este período también colaboré en tareas de docencia de grado en dos cursos de grado de la carrera de Médico Veterinario (Teriogenología, Biotecnologías de la reproducción) y en 3 cursos de posgrado (Octavo y noveno Taller de actualización en clínica reproductiva de caninos y felinos. Aplicación de biotecnologías en la práctica diaria. Módulo I: Hembra y Octavo Taller de actualización en clínica reproductiva de caninos y felinos. Aplicación de biotecnologías en la práctica diaria Módulo II: Macho), en pasantías realizadas por 4 alumnos de posgrado en la Cátedra en la que desempeño mi trabajo de docencia e investigación.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

1- García Mitacek MC, Stornelli MC, Praderio RG, Bonaura MC, Núñez Favre R. Evaluación del perfil biofísico fetal como indicador de la interrupción de la gestación media en gatas. XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV – UNR. Agosto de 2013

2 - Tittarelli, CM; Jurado, SB, García Mitacek, MC; Bonaura MC; de la Sota, RL; Stornelli, MA. Morfometría y ultraestructura de epidídimos caninos almacenados a 4°C en dos medios diferentes. XV Congreso de Ciencias Morfológicas y 12° Jornada de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. Agosto de 2013. Facultad de Ciencias Médicas.

3 - Bonaura, M.C.; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales al descongelado en el Gato doméstico (*Felis catus*). XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2013. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana.

4 - Bonaura MC; Jurado S; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli C; Stornelli MC; Stornelli MA Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos (*Felis catus*) congelados-descongelados. XV Congreso de Ciencias Morfológicas y 12° Jornada de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. 29 y 30 de agosto de 2013. Facultad de Ciencias Médicas.

5 - Bonaura MC, Stornelli MA. Ultramicroscopía de Espermatozoides Felinos Criopreservados. "1° Congreso Internacional Científico/Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. 19 y 20 de Septiembre de 2013. Ciudad de La Plata, Buenos Aires.

6 - Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA. Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*). XII Congreso Interamericano de Microscopía (CIASEM). Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía (ASOCM) Colombia, Cartagena. 28 y 29 de Septiembre de 2013.

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS

1. R Nuñez Favre, MC Bonaura, MC García Mitacek, MC Stornelli¹, MA Stornelli, RL de la Sota. Estacionalidad reproductiva en animales doméstico. Nuevas perspectivas en el gato (*Felis silvestris catus*). ANALECTA VET. 2013; 33 (1): 42-49

2. García Mitacek MC, Praderio RG, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Relación entre los parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata doméstica. ANALECTA VET. 2013.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

1. Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA. Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía (ASOCM) Colombia, Cartagena. 2013. Aceptado para su publicación.

2. Bonaura MC; Jurado S; Praderio R; Nuñez Favre R; Tittarelli C; Stornelli MC; Stornelli MA Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos (*Felis catus*) congelados-descongelados. Sociedad de Ciencias Morfológicas 2013. Aceptado para su publicación.

3. Bonaura, MC; Nuñez Favre, R; Praderio, RG; Tittarelli CM; García Mitacek MC; Stornelli, MA. Efecto de la adición de dimetilformamida al diluyente tris base sobre la supervivencia del semen felino congelado-descongelado. ANALECTA VET. 2014. Aceptado para su publicación.

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Bonaura, M.C.; Jurado, S.; Peralta, R.; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Stornelli, M.A. Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides epididimales felinos (*Felis silvestris catus*) congelados-descongelados en un diluyente tris base con el agregado de dodecil sulfato de sodio. Sociedad de Ciencias morfológicas 2014

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

Trabajo enviado y aceptado para su publicación a congreso:

Bonaura, María Candela; Camargo Laiza Sartori de; Nuñez Favre Romina; Souza, Fabiana Ferreira de; García María Florencia; Stornelli, María Cecilia; Stornelli, María Alejandra. Efecto de la adición de trealosa, dodecilsulfato de sodio a un diluyente tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales de gato doméstico (*Felis catus*) al descongelado. XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2014. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana.

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

1. "1° Congreso Internacional Científico/Tecnológico de la provincia de Buenos Aires". 19 y 20 de septiembre. Ciudad de La Plata, Buenos aires. Carga: 20 horas.

2. XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2013. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR Jornada latinoamericana y 1° congreso de Desarrollo Ganadero sustentable. Agosto de 2013.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

1- Módulo II: Animales de Laboratorio en Investigaciones Científicas: Requerimientos Internacionales para su uso y cuidado. Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. 23 y 24 de abril de 2013. Aprobado. Carga horaria: 11,5 horas.

2- Curso de Bioestadística Bayesiana. Departamento de epizootiología Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. La Plata. Anual. Aprobado.

3- Taller de Metodología de Investigación y Elaboración de Tesis. area ciencias de la Salud. prosecretaría de Posgrado de la UNLP. Carga horaria: 45 horas. con evaluación final aprobada. 2013

4- Criopreservación de gametas. 2 al 6 de septiembre de 2013. Aprobado Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Subsecretaría de Ciencia y Técnica. Buenos Aires. Carga horaria: 24 horas.

5- Curso de citología aplicada a la clinica y disgnostico. FCV. UNLP. La Plata, octubre 20133. Carga horaria: 20 horas.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

Mención especial al trabajo titulado: “Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos (Felis catus) congelados-descongelados”. Presentado en: XV Congreso de Ciencias Morfológicas y 12º Jornada de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. 29 y 30 de agosto de 2013. Facultad de Ciencias Médicas

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Docencia de grado:

Ayudante ad-honorem en la Cátedra de Reproducción Animal Área Pequeños Animales.Exp:4541/10

Colaboradora en Biotecnologías de La Reproducción Área Pequeños Animales.

Colaboradora en Teriogenologías Animales. 2013-...

Colaboración en la Cátedra de Microscopía electrónica. 2014

Docencia de posgrado:

1. Octavo Taller de actualización en clínica reproductiva de caninos y felinos. Aplicación de biotecnologías en la práctica diaria. Módulo I: hembra. Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, 2 y 3 de mayo de 2013.

2. Octavo Taller de actualización en clínica reproductiva de caninos y felinos. Aplicación de biotecnologías en la práctica diaria. Módulo II: macho. Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, 24 y 25 de octubre de 2013.

3. Noveno Taller de Actualización en clínica reproductiva de caninos y felinos. Aplicación de biotecnologías en la práctica diaria. Módulo I: Hembra. Calidad de Secretaria y Docente. Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. 8 y 9 de Mayo de 2014. Carga horaria 19 horas.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

Docencia de Pasantías de Posgrado:

FISIOPATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN CANINOS Y FELINOS DOMÉSTICOS:

1. Pasante: Med. Vet. Laura Gomez.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Argentina.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014320.
2. Pasante: Med. Vet. Ruben Somoza.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014296.
3. Pasante: Med. Vet. Ernesto Olaya.
Facultad: Universidad de Guayaquil, Ecuador.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014309.
5. Pasante: Med. Vet. Ana Cusati.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014280

Examen andrológico, extracción, evaluación y criopreservación de semen en caninos y felinos

1. Pasante: Med. Vet. Laura Gomez.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Argentina.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014315.
2. Pasante: Med. Vet. Ruben Somoza.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014289.
3. Pasante: Med. Vet. Ernesto Olaya.
Facultad: Universidad de Guayaquil, Ecuador.
Cargo: docente.
Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014304.
4. Pasante: Med. Vet. Ana Cusati.
Cargo: docente.

Lugar: Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la
Universidad de La Plata. Año 2013.
Certificado: 014284

**14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O
DE CAMBIO DE CATEGORÍA** (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación
abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben
agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre
cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá
solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los
cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario