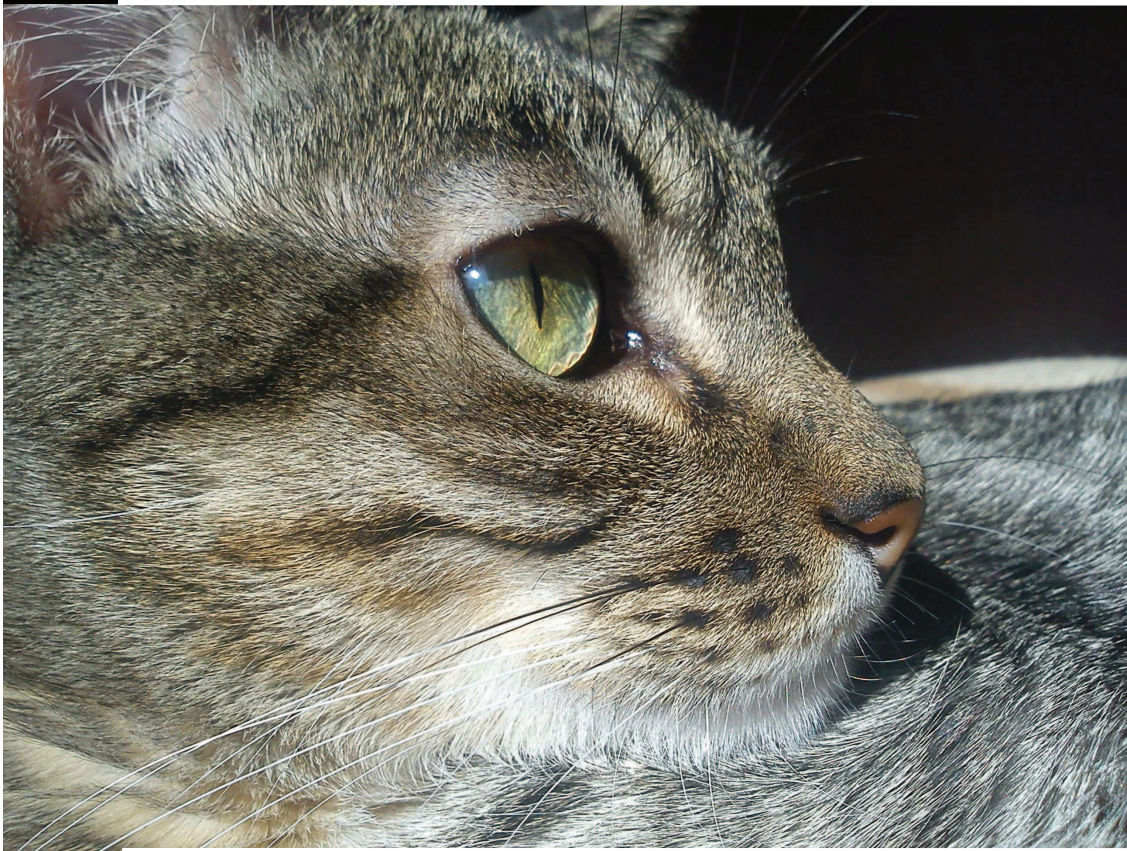


**APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMA
DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES
DILUYOCONSERVADORAS**

EMILIA M. JIMÉNEZ VAQUERO



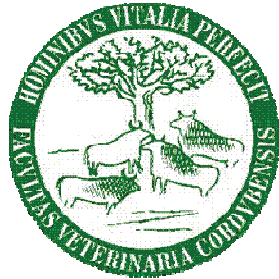
**TESIS DOCTORAL, MARZO 2013
FACULTAD DE VETERINARIA, UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, ESPAÑA**

TITULO: *APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMA DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES DILUYOCONSERVADORAS.*

AUTOR: *EMILIA MARIA JIMÉNEZ VAQUERO*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (ESPAÑA)

**APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL
ESPERMA DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE
LAS SOLUCIONES DILUYOCONSERVADORAS**

EMILIA M. JIMÉNEZ VAQUERO

Marzo 2013

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL
ESPERMA DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE
LAS SOLUCIONES DILUYOCONSERVADORAS**

**Memoria de Tesis presentada por Emilia M. Jiménez Vaquero,
Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de DOCTORA**

Los directores:

Dr. Carlos C. Pérez Marín

Dra. Estrella I. Agüera Buendía

Dra. Yolanda Millán Ruiz

CARLOS C. PÉREZ MARÍN, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA:

Que Dña. Emilia M. Jiménez Vaquero ha realizado bajo mi co-dirección, de forma conjunta entre los Departamentos de Medicina y Cirugía Animal, de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, y Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, el trabajo titulado "Aportaciones a la criopreservación de esperma de gato doméstico: influencia de las soluciones diluyoconservadoras", y que requiere los méritos científicos necesarios para optar al grado de Doctora en Veterinaria.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Córdoba a 19 de febrero de 2013.

**ESTRELLA I. AGÜERA BUENDÍA, DOCTORA EN VETERINARIA POR
LA UNIVERSIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

INFORMA:

Que Dña. Emilia M. Jiménez Vaquero ha realizado bajo mi co-dirección, de forma conjunta entre los Departamentos de Medicina y Cirugía Animal, de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, y Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, el trabajo titulado "Aportaciones a la criopreservación de esperma de gato doméstico: influencia de las soluciones diluyoconservadoras", y que requiere los méritos científicos necesarios para optar al grado de Doctora en Veterinaria.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Córdoba a 19 de febrero de 2013.

**YOLANDA MILLÁN RUIZ, DOCTORA EN VETERINARIA POR LA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, PROFESORA AYUDANTE DOCTORA
DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

INFORMA:

Que Dña. Emilia M. Jiménez Vaquero ha realizado bajo mi co-dirección, de forma conjunta entre los Departamentos de Medicina y Cirugía Animal, de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, y anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, el trabajo titulado "Aportaciones a la criopreservación de esperma de gato doméstico: influencia de las soluciones diluyoconservadoras", y que requiere los méritos científicos necesarios para optar al grado de Doctora en Veterinaria.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Córdoba a 19 de febrero de 2013.

APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMA DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES DILUYOCONSERVADORAS

Memoria de Tesis presentada por Emilia M. Jiménez Vaquero, Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de DOCTORA

Aportaciones científicas derivadas del presente trabajo de Tesis Doctoral:

Jiménez-Vaquero E, Millán Y, Agüera EI, Vizúete G, Pérez-Marin CC. Testicular histology and epididymal sperm quality in domestic cats castrated throughout the year.

Vizúete G, Jiménez-Vaquero E, Agüera EI, Pérez-Marin CC. Effect of vitrification on epididymal sperm motility, morphology and acrosome integrity in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, EN REVISIÓN.

Jiménez-Vaquero E, Pérez-Marín CC, Vizúete G, Millán Y, Agüera EI. Effect of different extenders on *in vitro* characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. Article first published online: 16 JAN 2013 | DOI: 10.1111/rda.12142

Jiménez-Vaquero E, Pérez-Marín CC, Millán Y, Agüera EI. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, 2011;123(3-4):265-269.

Jiménez E, EI Agüera, Y Millán, CC Pérez-Marín. Epididymides cool-storage for 12h does not impact on the cat sperm freezeability. XI International Congress for Animal Reproduction (AERA). *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47 Suppl.3: 117.

Vizuete G, E. Jiménez, L. Molina, E.I. Agüera, C.C. Pérez-Marín. Effect of vitrification on the motility of feline epididymal sperm diluted in sucrose. XI International Congress for Animal Reproduction (AERA). *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47 Suppl.3: 95.

Jiménez E., CC Pérez-Marín, E Agüera, J Martín de las Mulas, A Blanco, Y Millán. Comparative Study between Sperm and Morphological Features in Feline Testes. 13th Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction (Ghent, Bélgica), *Reproduction in Domestic Animals* 2009;44-3:109.

Jiménez-Vaquero E, Pérez C.C., Arrebola F, Agüera E. Sperm pre-frozen assesment can be useful to estimate the impact of cooling and extenders on the epididymal semen quality in cats. European Society for Domestic Animals Reproduction, 11th Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction (Celle, Alemania), *Reproduction in Domestic Animals* 2007; 42(2):84

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar esta tesis a mi madre y a mi hermano que me han apoyado en todo momento.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi tutor Carlos C. Pérez Marín, porque sin su ayuda no hubiera sido posible realizar esta tesis.

A mi tutora Estrella I. Agüera Buendía, por su ayuda y porque me apoyó desde el principio para realizar la tesis sobre este tema.

Y a mi tutora Yolanda Millán Ruiz por su aportación a mi tesis y por sus enseñanzas sobre histología.

A mis compañeros de departamento Guillermo Vizúete y Beatriz Pardo por su ayuda y por su apoyo moral durante todos estos años.

Y por supuesto, a todos los gatos que tan generosamente han donado las muestras necesarias para elaborar esta tesis.

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. OBJETIVOS	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
4.1. <u>Aspectos reproductivos generales del gato</u>	10
4.1.1. Aspectos anatómicos	
4.1.2. Aspectos endocrinos	
4.1.3. Espermatogénesis y maduración del espermatozoide	
4.1.4. El espermatozoide	
4.2. <u>Obtención de espermatozoides</u>	22
4.2.1. Vagina artificial	
4.2.2. Electroeyaculación	
4.2.3. Recogida epididimaria	
4.2.4. Otros métodos de recogida	
4.3. <u>Evaluación espermática</u>	28
4.3.1. Características macroscópicas	
4.3.2. Concentración	
4.3.3. Motilidad	
4.3.4. Morfología	
4.3.5. Integridad del acrosoma	
4.3.6. Funcionalidad de la membrana	
4.3.7. Viabilidad o integridad de la membrana	
4.3.8. Integridad del ADN	
4.4. <u>Preservación del semen felino</u>	41
4.4.1. Refrigeración	
4.4.2. Congelación	
4.4.3. Vitricación	
4.5. <u>Bibliografía</u>	53
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
5.1. Animales	
5.2. Obtención de especímenes reproductivos de gatos	

5.3. Medios de dilución para criopreservación espermática (congelación y vitrificación)	
5.4. Evaluación espermática	
5.5. Congelación y vitrificación	
5.6. Descongelación y calentamiento	
5.7. Evaluación de la histología testicular	
5.8. Análisis estadísticos	
6. RESULTADOS	75
Artículo 1. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats.....	77
Artículo 2. Epididymides cool-storage for 12h does not impact on the cat sperm freezeability	85
Artículo 3. Effect of different extenders on <i>in vitro</i> characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation	95
Artículo 4. Subjective assessment to valuate feline sperm morphology using different staining techniques	105
Artículo 5. Testicular histology and epididymal sperm quality in domestic cats castrated throughout the year	119
Artículo 6. Effect of vitrification on epididymal sperm motility, morphology and acrosome integrity in domestic cats.....	135
7. DISCUSIÓN GENERAL	149
8. CONCLUSIONES	163

1. RESUMEN

Los estudios que se abordan en esta tesis van encaminados a aportar mejoras en el ámbito de la criopreservación del esperma de epidídimo de gato doméstico. Se estudió la influencia del anestésico empleado durante la orquiectomía. Para ello, diversas agentes o sustancias anestésicas como pentobarbital, ketamina e isoflurano fueron comparadas. Los resultados demostraron que el isoflurano es el anestésico de elección ya que mostró los mejores resultados de motilidad a la descongelación ($p < 0.05$), mientras que tras el uso de pentobarbital se apreciaba un gran detrimento en la integridad del acrosoma ($p < 0.05$), así como en la viabilidad celular y funcionalidad de membrana ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente). En otro experimento se comparó la calidad espermática de muestras de epidídimo procesadas inmediatamente tras la orquiectomía frente a muestras procesadas tras 12 horas de conservación bajo refrigeración. Aunque los valores fueron menores en el grupo de muestras refrigeradas, tanto en la evaluación inicial como a la descongelación, no hubo diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, tras 6 horas post-descongelación, se observaron diferencias en cuanto a la motilidad ($p < 0.05$) y en la morfología ($p < 0.05$), siendo menores en el grupo de muestras refrigeradas. Por tanto, se puede concluir que la congelabilidad de esperma felino mantenido 12h bajo condiciones de refrigeración se ve ligeramente afectado, reduciendo su longevidad de movimiento. Se hipotetizó con la posibilidad de que diluyentes comerciales destinados a bovino y equino pudieran ser de utilidad en la congelación de esperma epididimario felino y, de esta forma, se comparan Triladyl®, Gent® y Andromed®. Triladyl® mostró una mejor eficacia, ya que mantuvo una mayor calidad del esperma tras la descongelación, dando mejores resultados en motilidad e integridad de membrana ($p < 0.001$). Tras esto, se comparó el diluyente comercial que mejores resultados había mostrado en gato, Triladyl®, con un diluyente preparado en nuestro laboratorio, a base de Tris-yema de huevo, taurina, glicerol y pasta Equex. De este diluyente se elaboraron dos versiones: una con fructosa y otra con fructosa. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los diluyentes, aunque el preparado en el laboratorio conteniendo fructosa mostró mejores resultados tras 6 horas de incubación post-descongelación. De este trabajo se dedujo que el diluyente comercial Triladyl® es un buena opción para congelar esperma de epidídimo de gato. A la hora de evaluar la morfología espermática, comparamos dos tinciones: Diff-Quick® y Eosina-nigrosina, esta última usada también para evaluar la integridad de la membrana espermática. Los resultados fueron que con eosina-nigrosina se podían detectar un mayor porcentaje de defectos morfológicos en la pieza media y la cola que con Diff-Quick® ($p < 0.05$), mientras que Diff-Quick® reveló un mayor porcentaje de defectos en la cabeza espermática ($p < 0.05$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con morfología normal, Diff-Quick® arrojó un mayor porcentaje (53.4 ± 1.4) que eosina-nigrosina (46.4 ± 1.7) ($p = 0.002$). Otra de nuestras investigaciones se centró en el estudio de la variación de la calidad espermática del gato a lo largo del año. De esta forma, agrupamos a los animales que se orquiectomizaron durante los meses de fotoperíodo ascendente (21 de Diciembre-20 de junio) y durante el fotoperíodo descendente (21 de junio-20 de diciembre).

Estudiamos la calidad espermática, el nivel de testosterona sanguínea y los cambios histológicos testiculares. La motilidad progresiva fue significativamente superior ($p < 0.001$) durante el fotoperíodo ascendente. Esto demuestra que no existe una estacionalidad aparente en el macho del gato doméstico. Tal vez, la mejora en la motilidad se corresponda con una sincronización con el período de celo de la gata. Por último, se testó una nueva técnica de conservación de espermatozoides felinos: la vitrificación. Para ello, usamos distintas concentraciones de sacarosa como diluyente. El número de espermatozoides con motilidad progresiva fue significativamente mayor cuando se usó sacarosa 0.4M comparado con el grupo control ($12.9 \pm 3.9\%$ vs $0.3 \pm 0.3\%$, $P \leq 0.05$). Aunque los resultados son modestos, resulta ser el primer intento de vitrificación de espermatozoides de gato, y deben plantearse nuevas experiencias que permitan adquirir mayor conocimiento sobre esta técnica.

ABSTRACT

The studies included in the present Doctoral Thesis are focused to increase the knowledge about epididymal sperm cryopreservation in domestic cat. The effect of different anaesthetic agents commonly used in cats (pentobarbital, ketamine HCl or isoflurane) on the fresh and frozen-thawed epididymal sperm were investigated. Fresh epididymal sperm was influenced by the drugs used, noting that motility features, i.e. vigor ($p \leq 0.05$) and progressive motility ($p \leq 0.05$), were higher for the inhalation anaesthetic while the others did not showed statistical differences. In frozen-thawed sperm samples, cats treated with barbiturics showed lower values for acrosome status ($p \leq 0.05$) and integrity and functionality of membrane ($p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively) than in the others groups. Results suggested that drugs used for castration in cats could affect the sperm quality and this should be considered when implementing sperm cryopreservation in feline.

Other study was conducted to evaluate the effect of testes and epididymides cool storage at 4°C during 12 h on cat spermatozoa cryopreservation capacity. Two groups were established: group A, immediately processed and frozen in 0.25-ml straws; group B, testes and epididymides were conserved for 12 h before freezing. Motility (subjective), morphology (Diff-Quick), acrosome status (PSA-FITC), sperm viability (SYBR-14) and DNA integrity (acridine orange) were assessed at the 3 times. Although values were lower in group B, initial and h0 values did not showed significant differences between groups in all parameters evaluated. However, significant differences ($p < 0.05$) were observed at h6 post-thawing values between groups for total sperm motility ($29.0 \pm 2.4\%$ vs $13.0 \pm 4.6\%$, A vs B, respectively) and normal morphology ($47.6 \pm 0.8\%$ vs $40.0 \pm 2.1\%$, A vs B, respectively). In conclusion, these results support that tom genital storage during 12 h at 4°C prior cryopreservation did not affected the immediately post thawing sperm quality.

The efficacy of various commercial and non-commercial freezing extenders for the cryopreservation of epididymal cat spermatozoa was evaluated thorough two experiments. Experiment 1 compared the effect of three commercial extenders –

based on TRIS-egg yolk (Triladyl), egg-yolk-free medium (AndroMed), and skimmed milk-egg yolk (Gent) – on the quality of frozen-thawed epididymal cat sperm. Values for sperm motility and functional membrane integrity in cooled sperm diluted in Triladyl were higher ($P<0.001$) than those recorded for AndroMed and Gent. Except sperm motility, the other assessed characteristics showed significant higher values in frozen-thawed sperm diluted in Triladyl than in AndroMed and Gent extenders. Experiment 2 analyzed the effects of three TRIS-based freezing extenders, one commercial (Triladyl) and the other two prepared using different monosaccharides (glucose and fructose). Results showed that specifically-prepared extenders for cryopreservation of feline spermatozoa performed better than the commercial extender. Cooling values were similar, but Triladyl displayed lower values after thawing ($P<0.001$) than the other extenders. The type of monosaccharide (glucose vs fructose) added to non-commercial extenders did not significantly affect sperm quality during the freezing-thawing process. Although specially-prepared extenders provided improved sperm cryoprotection, Triladyl remains a good option for practitioners who, for ease of use, prefer to work with commercial extenders.

Morphological semen examination remains an important tool for the diagnosis of feline fertility. Two staining methods were compared: an air dried stain (Diff-Quick) and a wet stain (eosin-nigrosin). Mean percentages of morphologically normal spermatozoa were significantly lower in eosin-nigrosin slides than in Diff-Quick preparations (46.5% vs 53.4%; $p<0.01$) both examined by bright field microscopy. Differentiated analysis of head, midpiece and tail sperm abnormalities showed that both methods may differ in their capacity to identify the various anomalies. Although no significant differences were observed for secondary abnormalities, when cytoplasmic droplets were studied, differences were detected (1.6% vs 8.2%; $p<0.001$). Results suggest that staining techniques may alter the morphology of feline spermatozoa artifactually, moreover in epididymal sperm that present more cytoplasmic droplets than ejaculated sperm. In this sense, a wet stain method may be better than an air-dried stain method for monitoring changes in abnormal spermograms. Neither centrifugation nor refrigeration affects the sperm morphology in the epididymal samples evaluated.

The influence of seasonality on the testicular histological features and epididymal sperm quality in cats, and how the reproductive season could affect the sperm freezeability were studied. Samples were grouped according with the photoperiod: long days (LD) and short days (SD). Sperm quality characteristics improved during the LD, although no significant differences ($P>0.05$) were observed in acrosomal status, sperm morphology and total of recovery spermatozoa in samples collected in LD and SD period. Only progressive motility showed significant higher percentages during the LD ($59.4 \pm 5.2\%$ vs $32.5 \pm 4.8\%$; $P<0.001$). Testis volume ($P<0.01$) was also significantly influenced by season, and highest values were observed during LD (2.63 ± 0.14 vs 1.98 ± 0.18 cm³). The evaluation of testicular histology did not revealed significant variations in cat castrated at different seasons, and no significant differences were observed in freezeability of epididymal sperm collected during LD or SD period. Spermatogenesis grade

positively correlated with the presence of sperm into the seminiferous tubules ($r=0.51$, $p<0.05$), Leydig cells ($r=0.34$; $p<0.05$) and sperm motility ($r=0.52$, $p<0.01$). Results indicate that male cat has acceptable spermatogenesis and sperm quality during the year and then, seasonality exert a slight influence on them. Sperm freezeability were not affected by the time of castration, but better values were observed during the period with long days, coincident with the reproductive breeding season in female cat.

Finally, the influence of sucrose concentration to motility, morphology and acrosomal integrity of vitrified-warmed epididymal cat spermatozoa was evaluated. Before vitrification, sperm samples were divided into four aliquots and diluted 1:1 with DPBS-BSA 1% (control) or the same extender supplemented with different sucrose concentrations (0.25, 0.4 and 0.6 M). From each group, 10 μ l of sperm were loaded into 0.25ml-straw and directly immersed into liquid nitrogen. For warming, the top of straws containing the sperm sample were dipped into 0.5 ml of DPBS-BSA 1% at 65°C, centrifuged and the final pellet was resuspended in DPBS-BSA 1%. Afterwards, sperm motility, morphology and acrosome status were assessed in fresh samples and after vitrification-warming procedure. The number of progressive motile spermatozoa was significantly higher when sperm were vitrified in medium containing 0.4 M sucrose than in the control group ($12.9 \pm 3.9\%$ vs $0.3 \pm 0.3\%$, $P \leq 0.05$). No significant differences were detected among groups for sperm morphology and acrosome integrity. Results support that cat sperm survives after vitrification using sucrose as a cryoprotectant, and the best results were achieved when 0.4M of sucrose was used. This is the first report on sperm vitrification in cat and further studies on extenders, management or carriers should be carried out in order to improve sperm cryosurvival.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente todas las especies de felinos salvajes se encuentran en mayor o menor grado amenazadas de extinción, ya sea por su caza o bien por la pérdida de hábitat. Para asegurar su conservación se pueden poner en práctica dos estrategias: conservación *in situ*, es decir, llevando a cabo medidas en el propio entorno natural (medidas contra caza ilegal, restauración de hábitat, etc.) o bien conservación *ex-situ*, extrayendo a individuos de la naturaleza y llevando a cabo su reproducción controlada en cautividad, con vistas a una futura reintroducción de sus descendientes en la naturaleza cuando la situación sea favorable.

La reproducción en cautividad puede llevarse a cabo de dos formas. La primera e ideal es mantener parejas que críen de forma natural, pero esto, la mayoría de las veces no es posible debido a una serie de factores:

- Incompatibilidad de los dos individuos (comportamiento, ej. en el caso de la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), el macho puede llegar a matar a la hembra).
- Problemas de adaptación a la cautividad.
- Patología que impide la reproducción (ya sea de tipo reproductivo como cualquier tipo de infertilidad o bien de otro origen, ej. artrosis en macho que impida la monta natural).
- Imposibilidad de conseguir individuos, como es el caso de felinos raros donde el zoológico o centro de recuperación sólo mantiene un ejemplar.
- Consanguinidad, que suele ser un problema frecuente.

Y en segundo lugar, en muchas ocasiones se hace necesario recurrir a la Reproducción Asistida, consistente en extraer y conservar el material reproductivo de los progenitores y usarlo posteriormente en técnicas de inseminación artificial o fecundación *in vitro*. En este punto, el gato doméstico sirve como modelo animal para desarrollar las diferentes técnicas reproductivas que permitan alcanzar esa meta.

En lo que respecta a recogida de esperma en gato, se ha utilizado la vagina artificial, electroeyaculación y la recogida epididimaria después de la castración o post portem, describiéndose recientemente la obtención de espermatozoides desde uretra tras la administración de α -2-agonistas. Pero, por el momento, solo la electroeyaculación y la recogida epididimaria han demostrado ser efectivos en felinos salvajes, lo que requiere un estudio en profundidad del efecto de las sustancias anestésicas sobre la calidad espermática y su congelabilidad. La anestesia es necesaria para llevar a cabo intervenciones quirúrgicas en animales, y como se ha indicado antes, para la recogida de esperma en felinos. Pero su uso puede inducir cambios en la calidad espermática. Se ha descrito que protocolos anestésicos con acepromazina-tiletamina-zolazepam ó con propofol ejercen variaciones en la motilidad progresiva, así como en la integridad de membrana del espermatozoides en pecaríes sometidos a electroeyaculación (Souza et al, 2009). Sin embargo, la evaluación de diferentes protocolos utilizados para eutanasiar ratas

demonstraron que no afectaban a la motilidad espermática (Slott et al, 1994). Sin duda, existe controversia en los pocos trabajos científicos publicados a este respecto; y más recientemente destaca un trabajo realizado en ponies, en el que se concluye que la motilidad post-descongelación no se ve afectada por el protocolo anestésico basado en halotano (Schulman et al., 2003).

La congelación espermática es una herramienta interesante para conservar material genético en felinos. Sin embargo, a menudo nos encontraremos con individuos de alto valor que sufren muertes repentinas. En esos casos, la refrigeración de las muestras, el transporte hasta laboratorios especializados y su congelación suponen la única opción de conservar sus genes. Estudios previos demuestran que el esperma de gato es bastante resistente a la refrigeración, pudiendo resistir varios días manteniendo una aceptable calidad (Harris et al, 2001). Ante este escenario, resulta interesante conocer la respuesta del esperma a esa refrigeración, pero sobre todo cómo responderá a la congelación, ya que las muestras obtenidas en animales muertos acabarán siempre siendo congeladas.

Una vez realizada la obtención de semen o esperma, hay que facilitar un medio óptimo para que los gametos no se alteren. Y en felinos, existe gran interés en desarrollar las técnicas de criopreservación espermática para almacenar el esperma obtenido. El esperma felino ha sido congelado con éxito (Tsutsui et al. 2003; Tebet et al. 2006; Cocchia et al. 2010), pero durante ese proceso se produce una reducción en su viabilidad celular y capacidad fecundante (Pukazhenthil et al. 2000). Diluyentes a base de TRIS son los más utilizados en congelación de esperma felino, aunque no existen diluyentes comerciales específicos para esta especie, lo que a veces se convierte en una limitante para la difusión de la técnica. La calidad espermática puede verse afectada por la composición del medio. En este sentido diferentes autores describen variaciones en la calidad seminal asociadas a la proporción de glicerol (Baran et al. 2004), dodecil sulfato sódico (SDS) (Axner et al. 2004; Zambelli et al. 2010), yema de huevo (Glover and Watson 1987; Hermansson and Axner 2007), y a los diferentes tipos de azúcares añadidos al medio (Glover and Watson 1987). Esto demuestra que es necesario conocer en profundidad cómo los constituyentes de los diluyentes afectan al esperma felino. El diseño de diluyentes comerciales específicos para esta especie podría ayudar a mejorar los resultados y a difundir el empleo de la técnica.

Tras la recogida de esperma, su evaluación laboratorial nos indicará la calidad y potencial de éxito cuando sea utilizado en inseminación o fecundación in vitro. El esperma epididimario de gato, a diferencia de otras especies, presenta un elevado número de anomalías morfológicas, que van desde un 36 a un 54% según la bibliografía (Goodrowe and Hay, 1993, Hay and Goodrowe, 1993; Lengwinat and Blottner, 1994), apareciendo numerosas formas inmaduras. En muchas ocasiones, los eyaculados se clasifican como teratospérmicos al presentar más de un 60% de anomalías, lo que afecta negativamente la interacción entre gametos (Wildt 1994; Pukazhenti et al. 2001). La morfología espermática refleja el estado del epitelio seminífero y del epidídimo, y por tanto, constituye un resultado anticipado de la tasa de éxito que tendrá en programas de IA ó fertilización in vitro. Con frecuencia, los estudios se centran en las variaciones que se producen en la motilidad o

funcionalidad espermática, dando menor importancia a la morfología. Trabajos realizados en otras especies demuestran que las técnicas de tinción pueden modificar la morfología espermática, variando así los porcentajes de espermatozoides morfológicamente normales. Esto remarca la necesidad de establecer pautas más o menos comunes para todos los laboratorios, con el objetivo de evitar resultados confusos dependientes de las técnicas empleadas para su estudio.

Se describen resultados muy heterogéneos durante la preservación de esperma felino, pero se desconoce a qué es debido. Estudios que se realizan en gatos, al extrapolarlos a felinos salvajes suelen ser peores, lo que ha sido asociado a deficiencias nutricionales o estrés (Howard and Allen, 2008). Aunque algunos autores afirman que en gato se mantiene la producción espermática a lo largo de todo el año (Spindler and Wildt 1999; Blottner and Jewgenow 2007), debe tenerse en cuenta su posible efecto. Estudios controvertidos aparecen en la bibliografía acerca de la influencia de la estacionalidad en la calidad espermática y arquitectura histológica en gatos. Axner y Forsberg (2007) estudiando la morfología espermática, sugieren que los efectos de la raza y la estación deben tenerse en cuenta, aunque otros efectos como el alojamiento de los animales pueden dificultar la evaluación de los datos. Blottner y Jewgenow (2007) analizaron las características espermáticas y los hallazgos testiculares a lo largo del año para evaluar el efecto de la estacionalidad, concluyendo que la cantidad de esperma se ve afectada de forma moderada por la estación, mientras que las variaciones fueron más pronunciadas en cuanto a producción hormonal y claramente evidentes en cuanto a la funcionalidad espermática. Cuando se evaluó el efecto de la estación sobre la morfología celular testicular, se observó que existen variaciones a lo largo del año (Stornelli et al, 2009), lo que sugiere que podría estar relacionado con la producción espermática, aunque los autores no lo estudiaron.

El actual conocimiento sobre criobiología y sobre fisiología reproductiva en felinos puede abrir la puerta a nuevas estrategias de conservación de esperma. Aunque la congelación convencional ofrece resultados aceptables en esperma felino, con relativa frecuencia las muestras obtenidas no presentan buena calidad quizás motivado por las sustancias anestésicas empleadas (Jimenez et al, 2011; Zambelli et al., 2007), técnicas de recogida de esperma y manejo de las muestras (Chatdarong et al., 2010; Filliers et al., 2010; Toyonaga et al., 2010), condiciones pre-congelación (Villaverde et al., 2006), procedimiento de congelación (Zambelli et al., 2002), composición de los diluyentes (Zambelli et al., 2010; Thuwanut et al., 2008; Axner et al., 2004; Comizzoli et al., 2012), o técnicas analíticas utilizadas para su evaluación (Siemieniuch and Dubiel, 2007). Desde hace más de 70 años, la técnica más utilizada para criopreservar esperma felino es la congelación lenta, pero la vitrificación puede abrir un nuevo panorama en crio-espermatología, al reducir los tiempos y también los gastos asociados a la congelación. Estudios recientes han demostrado su potencial en humano (Isachenko et al., 2004, 2004b, 2008) y perro (Sánchez et al. 2011). Esta técnica reduce la formación de cristales de hielo mediante la combinación de una velocidad ultrarrápida de congelación, alta viscosidad del medio y el pequeño volumen de la muestra.

3. OBJETIVOS

El propósito fundamental de esta Tesis Doctoral fue explorar el efecto de diferentes diluyentes sobre la calidad del espermatozoide epididimario de gato, así como las variaciones que pueden aparecer asociadas a la manipulación de las muestras o a la estacionalidad, entre otras. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos, a lo que se dará respuesta a través de los trabajos de investigación realizados:

- Revisar las publicaciones científicas recientes acerca de la criopreservación de esperma felino.
- Analizar la viabilidad espermática de muestras refrigeradas a 4°C durante 12h, así como la capacidad de congelación-descongelación de dichas muestras.
- Evaluar el efecto de las sustancias anestésicas empleadas durante el protocolo de orquidectomía en gatos sobre la calidad del esperma y su congelabilidad.
- Analizar el efecto de diferentes tinciones sobre la morfología espermática.
- Evaluar la calidad espermática de esperma epididimario felino diluido en medios comerciales (AndroMed®, Gent® y Triladyl®) y diseñar diluyentes específicos para comparar el efecto de la glucosa y fructosa.
- Relacionar la calidad de la histología testicular con la calidad del esperma obtenido y su aptitud para la criopreservación.
- Incluir el procedimiento de vitrificación como una técnica alternativa a los métodos convencionales de criopreservación de espermatozoides felinos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ASPECTOS REPRODUCTIVOS GENERALES DEL GATO.

Debido al mantenimiento de similitudes con sus ancestros salvajes, el gato es la especie modelo ideal para llevar a cabo estudios cuyos resultados posteriormente pueden ser aplicados con ligeras variaciones a las demás especies felinas, sobre todo en un aspecto muy ligado a la conservación, como es la reproducción. Las hembras son poliéstricas estacionales, mientras que los machos mantienen una libido continua a lo largo de todo el año. Las hembras entran en celo en nuestra latitud aproximadamente en diciembre ó enero, manteniendo esa conducta hasta aproximadamente el mes de abril. Durante este periodo de receptividad la hembra puede aparearse con varios machos, obteniéndose así camadas de varios progenitores.

La conducta copulatoria normal en el macho es el resultado de la recepción sensitiva y del procesamiento cortical de estímulos visuales, auditivos y olfatorios provocados por una hembra en celo y de la presencia de testículos funcionales, así como también de un eje hipotalámico-pituitario-gonadal intacto (Johnston et al. 2001). El macho demarcará su territorio con orina, restregándose contra las áreas no marcadas. Ante una gata en celo, la conducta del macho consiste en acercarse a ella por delante, movilizándose hacia sus cuartos posteriores, olfateando, y cuando encuentra su receptividad sexual gritará y hará un intento de monta (Schmidt 1986). Previamente, puede exhibir una reacción de “flehmen”, abriendo ligeramente su boca y cerrando sus ojos mientras olfatea, una acción asociada con la recepción de feromonas de la hembra por medio del órgano vomeronasal. La reacción de “flehmen” en el gato está influida por la presencia de testosterona, así como también por estímulos químicos originados en la orina y las secreciones vaginales de la hembra (Johnston et al. 2001). La introducción del pene es seguida de varios movimientos copulatorios y la eyaculación ocurre poco después, depositándose el semen en la parte posterior de la vagina. El tiempo que va desde el reflejo de agarre hasta la penetración varía desde 30 segundos hasta 5 minutos, mientras esta última sólo dura 1-4 segundos, prolongándose raramente hasta los 20 segundos (Feldman and Nelson 1996). La hembra emite un aullido característico, cuya magnitud aumenta hasta un grito agudo cuando el macho se retira. Esto es debido al dolor que le produce la distensión de la vagina y, posiblemente en menor medida, las espículas del pene, siendo éste el estímulo necesario para inducir la ovulación (Hewit 2001). Un macho experimentado se retirará con rapidez, manteniéndose a una distancia segura de la gata, ya que ésta se lanzará contra él si se mantiene demasiado cerca (Axnér 1998). El gato puede quedarse de pie o sentado, lamiendo en ocasiones su pene. Sin embargo, tras algunos minutos puede acercarse con cuidado a la gata y, si es rechazado, se volverá a sentar y esperará. Esta conducta se repite hasta poder acercarse a la gata y repetir la monta (Feldman and Nelson 1996). El apareamiento suele repetirse de 6 a 7 veces en un intervalo variable pero bastante frecuente, hasta que la gata no permita la monta. Los apareamientos repetidos son comunes, mejorando la posibilidad de inducción a la ovulación (Neils 1995). Un macho con salud normal puede aparearse hasta 3 veces

por semana o diariamente durante 3 días sin provocar un deterioro importante de su concentración de espermatozoides (Herron 1986; Sojka et al. 1986).

La vida media reproductiva en el gato es muy prolongada, llegando hasta los 14 años de edad. Sin embargo, el lapso de máxima fertilidad está entre los 2 y 10 años, disminuyendo la calidad del semen en edades avanzadas (Herron 1986).

4.1.1. ASPECTOS ANATÓMICOS

El aparato reproductor del gato está formado por un par de gónadas, los **testículos**, que producen gametos masculinos (espermatozoides) y hormonas; un par de sistemas de conductos genitales, constituido cada uno por un **epidídimo** y un **conducto deferente** que conduce a la uretra los productos exocrinos de los testículos; un conjunto de **glándulas genitales accesorias (próstata y glándulas bulbouretrales)**, que contribuyen a aumentar el volumen de semen; la **uretra**, que va desde la vejiga hasta el extremo del pene y sirve para pasaje de la orina y el semen; el **pene**, órgano copulatorio masculino que deposita el semen en el tracto reproductor de la hembra, además del **escroto** y el **prepucio**.

Los **testículos** son órganos con actividad endocrina y exocrina (Hewitt 2001). Para desarrollar esta última función se requiere una temperatura adecuada, cifrada en unos pocos grados menos que la temperatura intraabdominal. Tras el nacimiento, los testículos se sitúan dentro del escroto, entre la ingle y el periné, inmediatamente ventral al ano (Christiansen 1986), disponiéndose en una clara inclinación caudodorsal. Su forma es ovalada (Getti 1981) y en gato adulto mide aprox. 15x10x10 mm cada uno (Johnston et al 2001). Con relación al peso, cada uno varía entre 1 y 3 g (Mialot 1988), con una media de 1.2 g (França et Godinho 2003), lo que supone un 0.08% del peso corporal (índice gonadosomático), valor considerado muy bajo comparado con otras especies. Dada su morfología, se distinguen dos polos: una extremidad cefálica, que se relaciona con la cabeza del epidídimo, y una extremidad caudal relacionada con la cola. El borde epididimario es el que sujeta el epidídimo, mientras el opuesto se denomina borde libre.

En cuanto a su estructura, el parénquima del testículo se configura en los denominados lobulillos del testículo, integrados por cordones celulares. Dichos cordones son sinuosos y se ahuecan en túbulos seminíferos contorneados. La mayoría del parénquima testicular está formado por los **túbulos seminíferos**, que en el gato tienen una longitud de 23 m con un diámetro medio de 220 μm (França et Godinho 2003). Estos túbulos no están en contacto con la sangre, linfa, ni nervios; son básicamente convolutos, de forma cilíndrica y están llenos de líquido, vertiendo sus dos extremos a la *rete testis* y estando rodeados de un tejido peritubular especializado (varias capas de material no celular y células mieloides con capacidad contráctil, posiblemente responsables de las contracciones peristálticas necesarias para el transporte de los espermatozoides). En el interior de los túbulos se pueden encontrar varias células germinales: espermatogonias diploides, espermátocitos primarios tetraploides, espermátocitos secundarios y espermátidas haploides, así como espermatozoides desarrollados, esperando su

liberación al lumen del túbulo. También en el interior de los túbulos se encuentran las **células de Sertoli**, que envuelven a las células germinales y forman el principal componente de la barrera hemato-testicular. Esta barrera no es impermeable sino selectiva y parece tener un papel de barrera inmunológica. Se cree que en su formación interviene la hormona folículo estimulante (FSH). Por otra parte, las células de Sertoli, componente somático del epitelio seminífero, son las responsables del desarrollo de las células germinales durante la espermatogénesis y, por tanto, su número está relacionado con el número de espermatogonias, espermatidas o índices de producción de espermatozoides. De hecho, parece que existe una correlación entre el número de células de Sertoli y la estación reproductora, de tal forma que, según los datos de algunos autores (Johnson y Thompson 1983; Johnson y Nguyen 1986) el número de células de Sertoli fue mayor en la estación reproductora que en el invierno. Sin embargo, en un estudio específico sobre histología testicular de gato, Stornelli et al. (2009) observaron un mayor número de células de Sertoli durante el invierno, pero la actividad espermatogénica aumentaba a la vez que lo hacía el fotoperíodo.

Volviendo a la descripción histológica del testículo, las complejas uniones entre las células de Sertoli y las células adyacentes, dividen al túbulo seminífero en un compartimento basal y un compartimento adluminal. La espermatogénesis comienza en el primero de estos dos compartimentos, donde se forman los espermatoцитos primarios, que posteriormente migran a través de la barrera hematotesticular hacia el compartimento adluminal, donde tendrá lugar la meiosis y la formación de espermatozoides. El espacio que queda entre los túbulos seminíferos lo ocupa un tejido conectivo muy laxo, el islote intersticial, provisto de **células intersticiales o de Leydig** que elaboran la testosterona en un patrón pulsátil, regulando las características sexuales secundarias, tales como el desarrollo de la cabeza y de la conducta sexual masculina, como el apareamiento y la micción en “spray” (marcado del territorio). Las células de Leydig -que constituyen alrededor del 6% de la masa testicular según França y Godinho (2003)- son, por lo general, largas, poliédricas y epitelioides, rodeadas por una típica membrana plasmática, cubierta por microvellosidades. Cada célula tiene un núcleo simple, de forma esférica u ovoide, localizado excéntricamente y provisto de 1 a 3 nucleolos. El citoplasma de estas células es muy abundante y contiene mucho retículo endoplásmico liso, un aparato de Golgi bien desarrollado y varias mitocondrias. Estas estructuras permiten la síntesis de esteroides (testosterona) a partir del colesterol. Las células de Leydig son funcionales, secretando testosterona desde los primeros estadios del embrión para establecer los conductos sexuales del macho, pero regresan al final de la gestación y principio del periodo neonatal, para hacerse nuevamente activas en la pubertad.

El parénquima o tejido noble del órgano se diferencia del estroma o tejido fibroso, en el cual destaca la túnica albugínea, cápsula envolvente de fibras colágenas y escasas fibras elásticas. Dentro de la cápsula caminan las ramas de la arteria y vena testiculares, las cuáles son visibles en su curso subcapsular como un entramado. Desde la túnica albugínea se proyectan los séptos del testículo que separan los lobulillos. Dichos séptos tienden a converger hacia el mediastino del testículo,

cordón de tejido conectivo laxo adyacente a la red testicular, y a la que envuelve con fibras elásticas.

El examen histológico de los testículos del gato a diferentes edades permite su clasificación en distintos periodos de desarrollo (neonatal, infantil, púber y adulto). Las principales características distintivas consisten en el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos, la variación del número de células de Sertoli por corte tubular, la presencia de luz dentro de los túbulos y la estratificación de las células germinales (Sánchez et al., 1993a). En los gatitos, los testículos migran por completo hacia el saco escrotal en el momento del nacimiento. Sin embargo, pueden movilizarse hacia arriba y abajo a través del anillo inguinal a edades tempranas y se ubican definitivamente dentro del saco escrotal cuando el gato alcanza las 10-14 semanas de edad (Peter 1997). La barrera hematotesticular se establece durante el período de la pubertad, que se inicia alrededor de los 5 meses (Sánchez et al., 1993a). La maduración de las células de Leydig ocurre cerca de los 8 meses, momento en el que se vuelven positivas a la testosterona y muestran la morfología típica de células productoras de esteroides (Sánchez et al. 1993b). El testículo de un macho de 5 meses de edad puede tener figuras mitóticas en las espermatogonias, pero los espermatozoides aún no estarán presentes (Herron 1986). Los espermatozoides se presentarán en los túbulos seminíferos alrededor de los 6 a 7 meses (Hewitt 1991), pero la espermatogénesis sólo se establecerá cerca de los 8 meses (Sánchez et al., 1993a). Una vez presentes los espermatozoides en los testículos, la edad real a la cual comienza el apareamiento variará con el estado, el peso corporal y la estación del año. En promedio, el inicio de la pubertad es a los 8-10 meses de edad y a un peso corporal de 2.5 kg; sin embargo, se ha observado una importante variación entre razas (Long et al., 1986).

El **epidídimo** es el órgano encargado de transportar los espermatozoides desde los testículos hacia el conducto deferente y, al mismo tiempo, es responsable de la maduración de éstos mediante los mecanismos de absorción y dilución en los diferentes segmentos en el ducto epididimario. La capacidad de fertilización de los espermatozoides aumenta a medida que son transportados en sentido distal a través del conducto. El epitelio, muy especializado, secreta proteínas que son incorporadas a la membrana plasmática de los espermatozoides (Axnér 2000). En el gato, los epidídimos son muy largos, entre 1.5 y 3.0 m (Mialot 1988), y tortuosos, encontrándose profundamente insertos alrededor de la superficie lateral de los testículos (Getti 1981). Macroscópicamente, el epidídimo se suele dividir en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. En el gato, el cuerpo constituye la principal parte del órgano. La superficie del órgano es más lisa en la cabeza y cuerpo comparado con la cola, que es más rugosa. Anatómicamente, la **cabeza del epidídimo** se adapta firmemente a la extremidad cefálica del testículo y se configura en una docena de lobulillos del epidídimo, que son unas masas cónicas de tejido conectivo-muscular. Entre estos lobulillos caminan los conductillos eferentes del testículo que, desde la red testicular transportan los gametos hasta el conducto del epidídimo. La cabeza se prolonga en sentido caudal con el **cuerpo del epidídimo** hasta la **cola del epidídimo**. Ésta se ensancha de nuevo sobre la extremidad caudal del testículo. Desde aquí se incurva bruscamente para continuarse ya con el

conducto deferente. El **conducto del epidídimo** es tortuoso y se dirige desde la cabeza a la cola, aumentando progresivamente de calibre. Sus paredes presentan fibras musculares, que son responsables de los movimientos peristálticos que permiten el avance de los gametos hacia el conducto deferente. La cola del epidídimo se fija a la túnica albugínea por el ligamento propio del testículo y a la lámina parietal de la túnica vaginal por el ligamento de la cola del epidídimo. Algunos autores (Glover y Nicander 1971) sugirieron una subdivisión del epidídimo de los mamíferos basado principalmente en su estructura y función, introduciendo los términos de segmento inicial, antes usado por Benoit (1976), segmento medio y segmento terminal. Los dos primeros segmentos fueron considerados como áreas de maduración espermática, mientras que el último representaba una región de almacenamiento. Estas tres regiones se diferencian también a nivel ultraestructural (Malmqvist 1978). Arrighi et al (1986) realizaron observaciones ultraestructurales del epitelio epididimario del gato doméstico pero sin intentar regionalizar el ducto. Por el contrario, Prem (1992) y Sánchez et al. (1998) regionalizaron el ducto de acuerdo con características histológicas. Axnér (1999) describe que el epidídimo felino puede ser subdividido en seis regiones con características histológicas diferentes, sin mostrar variaciones en base a la edad. La regionalización basada en las diferencias histológicas encontradas en este estudio se centra en diferencias significativas en el grosor del epitelio, el diámetro luminal y el diámetro tubular entre las distintas regiones.

Tras pasar por el epidídimo, los espermatozoides son llevados a través de los **conductos deferentes** hacia la uretra. Éstos se inician como continuación de la cola del epidídimo en sentido ascendente en el interior de las envolturas testiculares, penetran por el canal inguinal a la cavidad abdominal, a la que surca formando un arco, y se continúan caudalmente por el interior de la cavidad pelviana hasta su desembocadura en la porción pelviana de la uretra.

La **uretra** es la vía de excreción de la orina contenida en la vejiga urinaria, así como del esperma procedente de los conductos deferentes, en los consiguientes actos de micción y eyaculación, y se describe una porción pelviana y otra peneana.

La **próstata** es relativamente grande, de color amarillento y estructura densa. Se localiza sobre la superficie craneal del pubis o próxima a éste. Es una glándula globular que rodea al cuello de la vejiga urinaria en su unión con la uretra. El diámetro prostático varía entre 0.5 y 0.6 cm, pero puede aumentar en los animales de edad avanzada (Mialot 1988). A diferencia de lo que ocurre en el perro, la próstata del gato no cubre la cara ventral de la uretra (Hewitt 2001). Se trata de un órgano dependiente de los andrógenos, que se atrofia después de la orquiectomía. La evaluación histoquímica sugiere que la próstata felina secreta un líquido que contiene un complejo proteína-lípidos, zinc y fosfatasa ácida (Johnston et al. 2001).

Las **glándulas bulbouretrales** son dos glándulas con forma de lenteja, de 5mm de diámetro, localizadas dorsolateralmente al bulbo del pene, a nivel de la sínfisis isquiática, que drenan por conductos simples hacia la uretra, a nivel de la raíz del pene (Johnston et al. 2001), y que secretan mucopolisacáridos sulfatados (Herron 1986).

El **escroto** del gato es una evaginación de la pared ventral del abdomen que recubre a los testículos, epidídimos y porción inicial de los conductos deferentes formando el saco escrotal. La piel delgada que cubre el escroto está pigmentada, se encuentra cubierta parcialmente por pelos gruesos y presenta un tabique mediano que divide al saco en dos mitades (Getti 1981; Johnston et al. 2001).

El **prepucio** forma una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene, el cual se divide en raíz, cuerpo y glande (Getti 1981). El **pene** del gato tiene características inusuales, como por ejemplo, que está dirigido caudalmente y termina de desarrollarse al llegar la pubertad (Hewitt 2001). Está compuesto por dos cuerpos cavernosos, uno a cada lado, y un cuerpo esponjoso que se encuentra en el medio (Johnston et al. 2001). En los machos adultos enteros, puede encontrarse un hueso peneano de 3-5 mm de longitud localizado en el interior de la punta del glande (Johnston et al. 2001). A diferencia del hueso peneano del perro, en el gato este hueso no rodea a la uretra (Herron 1986). El pene erecto presenta un cuerpo peneano libre de una longitud de 21.2 ± 2.2 mm y un diámetro promedio de 5.1 ± 0.5 mm (Watson and Glover 1993). El glande del pene tiene aprox. 5 mm de largo, se afina hacia el extremo distal desde un diámetro de 3 a 1 mm y en sus dos tercios craneales se encuentra cubierto por 100-200 espinas cornificadas curvas que se dirigen hacia la base del pene y tienen una longitud de 0.75-1.0 mm (Cooper 1944). Estas espinas presentan un desarrollo completo en el momento de la pubertad y se piensa que estimulan la liberación de hormona luteinizante (LH) mediada por la pituitaria, en la hembra (Hewitt 2001).

4.1.2. ASPECTOS ENDOCRINOS

La función testicular se controla mediante complejas interacciones neuroendocrinas entre el eje hipotalámico-pituitario-testicular. El primer componente de este circuito es capaz de responder a estímulos psíquicos y sensoriales del medio ambiente, condicionados muchas veces por la experiencia adquirida dentro del grupo social. En ciertas áreas hipotalámicas, las neuronas son capaces de secretar hormonas, la mayoría son pequeños péptidos, factores liberadores o inhibidores de la secreción de hormonas por parte de la hipófisis anterior. El principal péptido secretado por el hipotálamo es un decapeptido, la **GnRH** o factor liberador de gonadotropinas. El control hipotalámico de la adenohipófisis se realiza a través de un complejo sistema venoso portal. La sangre alcanza el hipotálamo por arteriolas que forman una red de capilares y venas que se unen en vasos mayores para transportar sangre y secreciones neurohormonales a la adenohipófisis. La GnRH controla la liberación de **FSH** y de **LH**. Estas hormonas hipofisarias determinan la espermatogénesis a través de su actuación sobre las células de Leydig y de Sertoli del testículo, mediante un complejo sistema de retroalimentación hormonal. De manera que, si los niveles de testosterona en sangre periférica (producidos por las células de Leydig) aumentan, se ejerce una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis, suprimiendo la liberación de GnRH y LH. Como consecuencia, las propias células de Leydig producirán menos testosterona haciendo caer su concentración en los túbulos seminíferos. Por otra parte, la FSH

actúa directamente sobre las células productoras de espermatozoides o de Sertoli del testículo, que secretan a su vez dos hormonas: inhibina que actúa sobre la adenohipófisis suprimiendo selectivamente la liberación de FSH en respuesta a la GnRH, y activina que ejerce el efecto contrario. Además, las células de Sertoli secretan una proteína transportadora de andrógenos (o androge-binding protein, ABP).

La actividad androgénica es casi nula durante el período prepuberal del gato (Sánchez et al. 1993b). Sin embargo, no hay información sobre las variaciones de concentraciones de gonadotropinas, GnRH o esteroides reproductivos en el gato (Hewitt 2001). Tampoco se dispone de datos acerca de la secreción de FSH. Sí se sabe que los niveles basales de LH en los machos felinos adultos son similares a los de la hembra en anestro (entre 3 y 29 ng/ml)(Hewitt 2001). Por otra parte, se han observado pulsos de LH en algunas especies de felinos silvestres, por lo que se piensa que también pueden producirse en gatos domésticos (Wildt et al. 1983). La secreción de testosterona en los felinos es pulsátil, sin ritmo diurno, variando su concentración plasmática en machos enteros en reposo sexual desde niveles no detectables (<0.05 ng/ml) hasta más de 20 ng/ml (Johnston et al. 2001). Johnston et al. (2001) sugirieron que las concentraciones plasmáticas promedio de androstenodiona en los gatos enteros varían entre 0.03 y 0.7 ng/ml en sangre periférica y entre 6.4 y 25.7 ng/ml en la sangre de las venas testiculares. En relación con el estradiol, las concentraciones plasmáticas varían entre 12.1 y 16.1 pg/ml en el gato doméstico se ha demostrado la importancia de la relación estradiol/testosterona. En este sentido, se describe que una alta concentración de estradiol testicular junto a una proporción de testosterona:estradiol reducida está asociada a la aparición de espermatozoides anormales (Müller et al., 2012).

Parece ser que el incremento de la función adrenal relacionada con el estrés puede afectar adversamente a la capacidad reproductiva del macho a nivel gonadal, hipotalámico e hipofisario (Collu et al. 1984; Moberg 1984). En el caso de felinos salvajes, Wildt (1988) observó que una mayor concentración de cortisol en sangre se correlaciona con mayor porcentaje de defectos morfológicos en el semen de leopardo y puma (probablemente por el estrés causado en la administración de la anestesia con dardos). A partir de esto, se postuló la posibilidad de que el estrés crónico asociado a la cautividad pudiera ejercer efectos adversos sobre la función testicular (Wildt et al. 1983). Esto es aplicable también al gato doméstico, pues se trata de una especie poco manejable a la hora de la extracción de semen.

4.1.3. ESPERMATOGÉNESIS Y MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La espermatogénesis es un proceso largo y cronológico, mediante el cual unas cuantas espermatogonias troncales, que se asientan en la base de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis para mantener su propio número de células troncales y para producir cíclicamente espermatoцитos. Por meiosis se producirán espermátidas haploides que se diferenciarán en espermatozoides y serán liberados en el lumen tubular. En definitiva, la espermatogénesis es el proceso de división y diferenciación mediante el cual se producen espermatozoides en los túbulos

seminíferos de los testículos. Comienza antes del nacimiento, cuando las células germinales primordiales del embrión, en sus primeros estadios de desarrollo, se convierten en gónadas fetales indiferenciadas, a partir del saco vitelino. Las células germinales se convierten en gonocitos dentro de los cordones sexuales masculinos, que persisten hasta poco antes de la pubertad, cuando se dividen y diferencian para producir espermatogonias. Una vez completada la espermatogénesis inicial se incrementa la eficacia de la producción, estabilizándose a nivel de adulto. Este proceso se divide en tres fases: espermatocitogénesis (mitosis), meiosis y espermiogénesis.

La **espermatocitogénesis** involucra a las espermatogonias, que surgen postnatalmente a partir de los gonocitos y están localizadas en la base de los túbulos seminíferos en el macho adulto. Las espermatogonias troncales se dividen por mitosis para producir otras células troncales con el fin de que no se carezca de ellas a lo largo de toda la vida sexual activa del macho o también para que, en caso de lesión o de regresión estacional, se pueda recuperar fácilmente la capacidad procreadora. La actividad mitótica cíclica de las espermatogonias produce espermatogonias de forma continuada, que inmediatamente proliferan y/o se diferencian produciendo espermatoцитos primarios.

Los tres tipos de espermatogonias, originalmente descritos, incluyen las **espermatogonias A**, **espermatogonias intermedias** y **espermatogonias B**. Las primeras poseen núcleos relativamente grandes y ovales o esféricos. Las diferencias en apariencia de los diferentes tipos de espermatogonias se deben a cambios en los cromosomas, que son más largos en la del tipo A y más cortos en las espermatogonias B.

La **meiosis** es el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos de los espermatoцитos primarios, seguido de una división reductora produciéndose espermátidas haploides.

La **espermatogénesis** es el proceso por el que se produce la diferenciación morfológica de las espermátidas esféricas en espermátidas maduras, y que se liberan a la superficie del lumen como espermatozoides. Las espermátidas producidas en la segunda división meiótica se diferencian de las células esféricas por su alto contenido enzimático y núcleos condensados que portan el genoma masculino y por la presencia de la cola, necesaria para la motilidad celular. El desarrollo de las espermátidas se divide en cuatro fases: Golgi, caperuza, acrosomal y maduración, basadas en el desarrollo del acrosoma en los diferentes tipos. El **acrosoma**, es una vesícula situada sobre el núcleo y provista de enzimas. El aparato de Golgi de una espermátida recién formada es el que origina el acrosoma, de igual forma que sucede para otros orgánulos que contienen enzimas, como es el caso de los lisosomas. La fase Golgi de la espermátida posee un aparato de Golgi muy prominente productor de enzimas rodeadas de membrana, formándose así vesículas que se funden para formar la vesícula acrosómica, adyacente al núcleo. Cuando la vesícula acrosómica se aplanan y comienza a extenderse, forma una especie de caperuza sobre el núcleo. El aparato de Golgi se hace menos notorio y se mueve hacia el extremo caudal lejos del núcleo de la

célula. El núcleo aún es esférico y el movimiento flagelar se hace presente. Cuando la caperuza se extiende sobre el núcleo y comienza la elongación de éste, la espermatida se encuentra en la fase acrosomal. Las espermatidas, en esta fase, están como embutidas en profundos salientes dentro de los extremos de las células de Sertoli. También aparece una nueva estructura, sobre el núcleo, que recibe el nombre de **membrana nuclear** y cuando ésta se encuentra en la región caudal, donde se une el flagelo, es cuando comienza la elongación nuclear. En la fase final, o de maduración, del desarrollo de las espermatidas, la membrana migra caudalmente donde parece formar un eje que soporta el canal flagelar y la libertad de movimientos durante el desarrollo del flagelo. Durante esta fase también se observan migraciones mitocondriales. Los espermatozoides así formados caen a la luz de los túbulos seminíferos de los testículos y, mediante movimientos contráctiles de éstos, van recorriendo la rete testis hasta los conductos eferentes (Cooper 1998) que desembocan en un único conducto largo y altamente convolucionado, el epidídimo, donde tendrá lugar el proceso madurativo mediante una serie de cambios morfológicos y funcionales.

En el gato, la producción diaria de espermatozoides ha sido estimada en 16 millones (França and Godinho, 2003) y se ha demostrado que, después de un intervalo de 47 días, todos los espermatozoides de la misma generación son liberados al epidídimo (Johnston et al. 2001). Aunque la longitud del conducto epididimario varía entre especies (Hewitt 2001), la duración media del tránsito del espermatozoide por este órgano es similar en la mayoría de ellas, de unos 10-12 días (Courot 1981), siendo más rápido en la periferia del conducto, pudiéndose encontrar espermatozoides de diferentes edades en la región caudal (Orgebin-Crist 1965). Cabe decir que las eyaculaciones frecuentes no provocan la liberación de espermatozoides inmaduros ya que el grado de paso se incrementa sólo en la porción caudal, nunca en las partes proximales del conducto (Holtz and Hassan 1980; Courot 1981). Los espermatozoides son transportados desde la cabeza hacia la cola del epidídimo mediante la actividad peristáltica de las células musculares lisas que rodean el conducto (Courot 1981).

Axnér (1999) dividió el epidídimo felino en seis partes; la primera región del epidídimo se corresponde con el segmento inicial, la segunda, tercera y cuarta son el segmento medio, y la quinta y sexta con el segmento terminal. Dentro de los cambios morfológicos que sufre el espermatozoide durante este tránsito epididimario cabe destacar el desplazamiento de la gota citoplasmática de una posición proximal a distal (Arrighi et al 1986). Esto ocurre cuando el espermatozoide alcanza la última región del segmento medio (Región 4). A diferencia de otras especies como el morueco y el cerdo, donde el movimiento de la gota citoplasmática precede al estado móvil del espermatozoide (Sánchez et al 1998; Axnér et al 1999), en el gato doméstico, se produce simultáneamente la aparición de la motilidad progresiva con el movimiento de la gota citoplasmática. En el caso de las anomalías de la cola, se puede observar un pequeño pero significativo incremento durante el tránsito epididimario, sugiriendo que éstas pueden originarse en el epidídimo (Axnér 2006; Hewitt 2001).

La espermiófagia por parte de las células epiteliales en los conductos eferentes ha sido demostrada en el toro y se sugiere que es de importancia para eliminar los espermatozoides anormales (Nicander and Malmqvist 1977), así como en el gato (Viotto et al 1979). También se describe la fagocitosis espermática por células epiteliales y por macrófagos en la región terminal de los vasos deferentes del gato. A pesar de esto, en algunos gatos domésticos y en muchas de las especies de felinos salvajes se observa una alta proporción de espermatozoides anormales en sus eyaculados (Scott 1960; Courot 1981; Elcock et Schoning 1984;).

4.1.4. EL ESPERMATOZOIDE

















El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para llevar a cabo la única función de fecundar el oocito. En líneas generales, el espermatozoide está compuesto de cabeza y cola. La cabeza contiene el núcleo, con un número haploide de cromosomas, cuyo ADN representa el material genético del macho (genoma masculino) que será depositado en el oocito y un acrosoma provisto de las enzimas hidrolíticas necesarias para poder penetrar por las envolturas que rodean al oocito, durante la fecundación. La cola incluye: región del cuello que está unida a la cabeza en la llamada fosa de implantación, la pieza intermedia provista de una maquinaria metabólica capaz de producir la energía necesaria y proporcionar los mecanismos de propulsión que posibilitan la motilidad espermática mitocondrias, y la pieza principal que contiene la vaina fibrosa y la pieza terminal.

El acrosoma (situado en la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide) contiene complejas lipoproteínas específicas, incluyendo un importante número de enzimas entre las que se encuentran la hialuronidasa y la acrosina. La primera es capaz de escindir los mucopolisacáridos, por lo que parece estar relacionada con la dispersión de los oóforos del oocito. La acrosina es una proteasa capaz de disolver la zona pelúcida del óvulo. La región postacrosomal de la superficie del núcleo tiene su importancia dado que es el área que se une y funde con el oocito. La cara caudal de la cabeza del espermatozoide está indentada para permitir la unión con la pieza intermedia y la cola, que tiene un núcleo central formado por nueve más dos microtúbulos. Rodeando a los nueve microtúbulos aparece una capa fibrosa con propiedades contráctiles. En realidad, cada uno de los nueve microtúbulos es doble, al estar formado por dos subunidades, una de ellas (A) es un cilindro completo, la otra (B) es un cilindro incompleto, unido estrechamente a un lado de la subunidad A. En el otro lado, las subunidades poseen ramas de dineína, con actividad ATPasa. La interacción de la dineína y los microtúbulos vecinos es la base del movimiento de la cola.

Tanto la cabeza como la cola se encuentran envueltas por una membrana plasmática que, desde la región apical de la cabeza, cubre el subyacente acrosoma, cuya propia membrana tiene varios segmentos: apical, principal y ecuatorial

La forma y tamaño de los espermatozoides varía según la especie. La cabeza del espermatozoide de gato tiene una longitud de 7.7 μm y una anchura de 3.2 μm , y

junto a la cola mide de 55-65 μm (Christiansen et al. 1984; Garner 2006) (Figura 1).

Dimension	Bull	Boar	Ram	Rabbit	Cat	Dog	Horse	Man
Length (μm)	9.1	9.0	8.1	7.7	7.7	7.0	6.5	4.6
Head sagittal section								
Width (μm)	4.7	5.0	4.0	4.5	3.2	3.5	3.4	3.2
Head profile								
Area (μm^2)	34.5	37.5	26.6	28.0	19.0	20.9	15.2	10.8
X-Y difference (%)	3.8	3.6	4.2	3.0	4.2	3.9	3.9	2.8
Sorting index ^b	131	115	112	84	80	82	59	31

^a Compiled from Mann [67] Mann and Lutwak-Mann [68], Johnson [7], Welch and Johnson [6], Garner [11], Garner and Seidel [13] and Seidel and Garner [14].
^b An approximation of the ability to flow cytometric sort sperm consisting of the head profile area (μm^2) \times X-Y Sperm DNA difference (%).

Figura 1. Dimensiones y perfiles de las cabezas de los espermatozoides e índices de separación por citometría de flujo para algunos mamíferos domésticos y para humano (publicado por Garner 2006).

En los mamíferos, los espermatozoides no se encuentran maduros cuando se liberan de los túbulos seminíferos. Cada uno de ellos contiene una gota citoplasmática en la pieza media, con lo que debe madurar en su recorrido por el epidídimo para alcanzar su máximo grado de motilidad, estabilidad estructural y capacidad fecundante, necesarios para completar su recorrido por el tracto genital femenino hasta el oocito. Pero en el oviducto, el espermatozoide debe sufrir una serie de transformaciones conocidas como capacitación. Desgraciadamente, casi todos los estudios sobre el metabolismo de los espermatozoides testiculares se han realizado en medios sintéticos, cuya composición es más próxima a la del plasma sanguíneo que a la del líquido de la *rete testis*, con lo que es bastante difícil extrapolar esos resultados a la situación planteada *in vivo*. En cualquier caso, lo que sí es cierto es que en todas las situaciones en que se han realizado estudios de este tipo se ha encontrado una diferencia notable entre los espermatozoides testiculares y los de epidídimo o los del eyaculado. Estos últimos, por ejemplo, convierten una alta proporción de glucosa en lactato, incluso en condiciones aeróbicas, mientras que en los espermatozoides testiculares, la glucosa se transforma en dióxido de carbono, aminoácidos y otros compuestos, algunos aún no identificados. Actualmente, se sabe que el propio movimiento del espermatozoide sólo tiene importancia en ciertas regiones del tracto genital de la hembra, como el cérvix y la unión útero-oviductal, así como durante la aproximación y penetración por las membranas del oocito. Numerosos factores fisiológicos influyen en el transporte de espermatozoides, como el volumen de eyaculado, el lugar de inseminación o la anatomía del tracto femenino.

Se ha demostrado en otras especies que la composición del fluido epididimario cambia a lo largo de su trayecto. La mayoría del fluido procedente del testículo es reabsorbido en los conductos eferentes (Crabo 1965; Levine et Marsh 1971; Hansen et al 1997) y la mayor parte del fluido restante lo hace en la cola del epidídimo. La eliminación de este fluido se asocia con la resorción de iones Na^+ (Turner 1984). Como resultado del transporte activo de iones, las concentraciones de Na^+ y Cl^- disminuyen durante el tránsito epididimario hasta llegar a ser muy bajas en la cola del epidídimo, mientras que la concentración de K^+ se incrementa (Crabo 1965; Clulow et al 1994). La baja concentración de Na^+ , parece mantener al espermatozoide en un estado estable, ya que a altas concentraciones de este ión se produciría la reacción acrosómica (Fraser et al 1993). En el gato, la absorción de fluido da como resultado una mayor concentración de espermatozoides en el lumen, efecto observable sobre todo en la cola del epidídimo (Axnér et al 1999). Las concentraciones de electrolitos en el fluido epididimario todavía no se han descrito completamente en el gato. Sin embargo, la presión osmótica del fluido luminal en otras especies se incrementa desde la red testicular hacia la cola del epidídimo, induciendo una deshidratación del espermatozoide y aumentando los niveles de espermatozoide (Crabo and Hunter 1975). La deshidratación de las células espermáticas contribuye a su mantenimiento en un estatus estable. Pequeñas moléculas orgánicas como el inositol, la carnitina y la glicerofosfolina contribuyen a mantener la presión osmótica al descender el nivel de electrolitos, encontrándose así altas concentraciones de aminoácidos libres en el fluido epididimario de diferentes especies (Setchell et al 1993). En algunos estudios sobre la composición del fluido epididimario del gato se ha descubierto la presencia de taurina e hipotaurina, así como en los espermatozoides eyaculados y epididimarios (Buff et al 2001). La hipotaurina no está presente en el suero sanguíneo felino, por lo que parece ser producida únicamente en los órganos reproductores (Buff et al 2001), hecho corroborado por la posibilidad del cultivo de células epididimarias felinas en medios con taurina e hipotaurina (Buff et al 2005). La taurina y la hipotaurina protegen al espermatozoide del conejo de la pérdida de motilidad, disminuyendo la peroxidación lipídica, especialmente en medios con una alta concentración de K^+ (Álvarez and Storey 1983). La taurina ha demostrado tener un efecto positivo sobre la motilidad de los espermatozoides epididimarios felinos descongelados, así como en los espermatozoides de carnero (Luvoni et al 2002; Sánchez-Partida et al 1997).

El plasma seminal es la fracción líquida del semen después de haber separado los espermatozoides por centrifugación o filtración. Se caracteriza por contener una serie de sustancias que no se encuentran en ningún otro territorio orgánico e incluso otras están en concentración mucho más alta que en cualquier otro tejido. Los valores de estos componentes dependen de la cantidad de testosterona presente y también puede variar entre las distintas fracciones espermáticas. El peso específico, osmolalidad y carga aniónica en el plasma seminal felino tienen valores similares a los encontrados en sangre, conteniendo unos valores significativamente mayores de fosfatasa alcalina, originada en los testículos y/o epidídimo, por lo que esta enzima se puede utilizar como marcador epididimario en el gato y perro (Frenette et al 1986). Por otra parte, la secreción de las glándulas bulbouretrales

comprende la mayor porción del plasma seminal al que se une una pequeña porción de fluido prostático alcalino (Johnston y al 1988).

Sin embargo, la presencia de plasma seminal afecta negativamente a la capacidad fertilizante en el gato (McLaughling y Hamner 1974), aunque algunos autores (Harris et al 2001) no observaron ninguna diferencia en la calidad de los espermatozoides en presencia o ausencia del plasma seminal. De todas formas, este plasma seminal se puede eliminar mediante un proceso de centrifugación a baja velocidad (300g durante 8 minutos) y posterior aspiración del sobrenadante. Sin embargo, los mejores resultados se pueden conseguir aplicando el proceso de swim-up, mediante el cual se seleccionan los espermatozoides en base a la motilidad y a la integridad estructural, desechando el plasma seminal (Howard et al. 1990). Nuevos protocolos basados en gradientes de densidad conseguidos con diversos coloides están siendo propuestos como nuevas alternativas para seleccionar espermatozoides, aunque los resultados no son homogéneos (Chatdarong et al, 2010). La disminución de las gotas citoplasmáticas distales en los espermatozoides eyaculados (Glover 1961; Axner et al 1998, 1999) con respecto a los presentes en la cola del epidídimo del gato (Axner et al. 1998) ha sido asociada a la presencia de plasma seminal.

Un efecto similar ocurre con algunos medios empleados en la extracción de espermatozoides del epidídimo, como la solución PBS (solución fosfato buferada). En un estudio llevado a cabo con espermatozoides de gato procedentes de la cola del epidídimo, tras diez minutos en una solución PBS antes de la fijación, sólo el 26% de los espermatozoides mostraron gotas distales, en comparación con el 68-77% de los espermatozoides fijados en formol-salino (Axner et al. 1998, 1999, 2004). Una posible explicación sería que la inducción de la motilidad, la dilución en un medio hipoosmótico (PBS) o la combinación de ambos, provocaría la pérdida de la gota distal (Souza et al. 2004). Sin embargo, una consecuencia negativa de un medio hipoosmótico como el PBS (288 mOsm) es una mayor proporción de colas dobladas, comparado con el esperma obtenido en el epidídimo fijado en formol-salino (Axner et al. 1998, 2004; Cooper and Yeung 2003).

Hasta ahora, la osmolaridad del fluido epididimario del gato no ha sido determinada, al contrario que en el plasma seminal, que se sitúa en 325 mOsm (Johnston et al 1988). En resumen, el mayor porcentaje de defectos de la cola en espermatozoides felinos eyaculados frente a los presentes en la cola del epidídimo, pueden estar causados tanto por cambios osmóticos durante la eyaculación como por un excesivo tiempo de almacenamiento en los conductos deferentes (Souza et al. 2004).

4.2. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS

A diferencia de otros animales domésticos en los que por motivos económicos se han optimizado y hecho rutinarios diversos métodos para la recogida de semen, en el gato doméstico esto supone un reto. En un felino, el semen puede ser recogido con vagina artificial (Sojka et al. 1970; Zambelli and Belluzi 1998),

electroeyaculación (Seager 1976; Platz and Seager 1978; Pineda et al. 1983; Johnstone 1984; Howard and Wildt 1990), desde epidídimo (en este caso, espermatozoides) y vasos deferentes de testículos aislados (Bowen 1970; Howard et al 1986; Hay and Goodrowe 1993; Yu et al 2002) y a partir de sondaje uretral tras previa sedación del animal con medetomidina (Zambelli et al 2008; Filliers et al 2010). Los protocolos de conservación pueden ser aplicados tanto en eyaculados como en espermatozoides epididimarios. Esto último viene a significar un valioso recurso en caso de orquiectomía o de muerte del animal.

4.2.1. VAGINA ARTIFICIAL

La obtención de semen en el gato mediante vagina artificial fue conseguido por primera vez por Sojka et al (1970), pero posteriormente este procedimiento ha sido usado por otros investigadores (Platz et al 1970; Dooley and Pineda 1986; Dooley et al. 1991). Aunque, debido al difícil manejo de este animal, esta técnica pueda resultar impensable, lo cierto es que, con una adecuada selección de los animales (buen carácter y libido y buen estado de salud) se pueden obtener muy buenos resultados (si no se realiza selección de estos caracteres, sólo un 30% de los animales accederán a eyacular en la vagina artificial) (Pineda and Dooley 1991). Se considera que es necesario un período de entrenamiento que se puede extender desde un par de semanas hasta incluso meses de manejo y exposición diaria del gato a una hembra en celo, hasta que el macho acceda a eyacular en la vagina artificial. Sin embargo, en un estudio se consiguió que 3 de 5 machos elegidos al azar eyacularan en vagina artificial tras dos semanas de entrenamiento (Sojka et al. 1970). Y aunque parezca increíble, también se ha conseguido desarrollar esta técnica en felinos salvajes amaestrados, como el guepardo (Durrant et al. 1985).

Otro de los inconvenientes de este método es la necesidad de disponer de gatas en celo en cada ocasión en la que se necesite recolectar semen de un macho, aunque cuando no se tengan hembras en celo natural es posible usar gatas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (Sojka et al. 1970), las cuales muestran una buena respuesta de comportamiento sexual, incluyendo la aceptación de la monta del macho. En algunos casos se ha conseguido entrenar machos mediante manipulación para que eyaculen en vagina artificial sin la presencia de una gata en celo (Stornelli 2007), socializándolos desde cachorros y entrenándolos hasta la pubertad, hasta que logran eyacular manualmente (Stornelli y Stornelli 2002a).

Como se comentaba anteriormente, lo más difícil es conseguir un macho entrenado para este efecto. El entrenamiento consiste en controlar al animal mediante un arnés en el momento de su acercamiento y monta de la hembra, para evitar cualquier tipo de agresión entre los dos animales y para seguridad del operador. Una vez que el macho muerda a la hembra en el cuello y se sitúe encima de ella, se colocará la vagina artificial para que el animal eyacule dentro. La vagina artificial es muy simple; sólo son necesarios un frasco de plástico o vidrio de unos 100 ml de capacidad, que se llena con agua a 39°C con el fin de evitar el shock térmico en el eyaculado durante la recolección. Dentro de este frasco se introducirá un tubo de vidrio o plástico inerte de aproximadamente 0.5 ml (p.e. un tubo Eppendorf) y en la

abertura de este tubo se acoplará un bulbo de látex de 2 ml, similar al que se usa con las pipetas Pasteur, lubricado con un poco de gelatina inerte, no espermicida, para facilitar la entrada del pene (Sojka et al. 1970).

A pesar de que este método no es aplicable en la práctica clínica debido a todos los inconvenientes antes enumerados, podría resultar útil en criaderos de gatos y en centros de experimentación animal, pues una vez que se consigue entrenar al macho, los costes son mínimos. En cuanto a investigación, se considera que estos eyaculados poseen unas características de calidad superiores y más representativas del potencial de fertilidad del gato. Se ha observado no obstante, que la recogida diaria causa una disminución en el volumen y en el número de espermatozoides (a partir del cuarto día) de al menos la mitad en comparación con el recogido el primer día, pero estos parámetros luego se nivelan y permanecen constantes (14-45 millones de spz por eyaculado). La motilidad y viabilidad, formas anormales y libido sexual no cambian en relación a la frecuencia de recogida (Sojka et al. 1970; Tanaka et al. 2000). Según un estudio, se pueden recoger hasta 3 eyaculados por semana sin afectar al potencial reproductor del gato, siendo la calidad de la muestra similar a las recogidas una vez por semana (Sojka et al. 1970). Tampoco se observó ninguna incidencia en la morfología recogiendo semen diariamente durante 11 días, al contrario que Tanaka et al. (2000) que apreció un aumento de formas inmaduras. Es importante tener en cuenta el hecho de la presencia de flujo retrógrado de espermatozoides hacia la vejiga urinaria durante el proceso eyaculatorio a la hora de evaluar el potencial reproductor de un gato, ya que estas pérdidas de espermatozoides disminuyen dramáticamente el número total en el eyaculado obtenido (Dooley and Pineda 1986).

4.2.2. ELECTROEYACULACIÓN

La electroeyaculación fue descrita en gato por primera vez por Platz en 1976, siendo aplicada posteriormente en numerosos estudios (Platz et al. 1976, 1978; Johnstone et al. 1984; Pineda and Dooley, 1991; Howard and Wildt 1990, Axner et al. 2003; Zambelli et al., 2002 and 2010; Chatdarong et al, 2006). Actualmente, muchos investigadores consideran este método como el de elección para recolectar semen en el gato ya que, por razones físicas y psicológicas, algunos machos no pueden usarse para la monta natural o para recogida de semen mediante vagina artificial. Adicionalmente, la electroeyaculación es preferible porque no es necesario usar una hembra ni tampoco entrenar al macho, pudiéndose aplicar en cualquier animal que posea la vía neurológica implicada intacta y esté suficientemente anestesiado (Sojka 1986).

El método de electroeyaculación en el gato sería impensable sin llevar a cabo la anestesia del animal, para evitar sufrimiento a éste e injurias al operador. Se han probado diferentes protocolos anestésicos, pero el más utilizado es la ketamina HCl, sola o combinada con medetomidina (Platz and Seager 1978; Cline et al. 1980; Johnstone 1984; Howard et al 1990; Axner and Linde-Forsberg 2002). Igualmente, se ha utilizado medetomidina (100-150 µg/kg SC) obteniéndose un mayor número de espermatozoides por eyaculado (Zambelli et al. 2004), mientras

otros describen el uso de una combinación de tiletamina hidrócloride-zolazepam (Telazol® o Zoletil®; 4.5 mg/kg) (Pukazhenthí et al. 2000).

Existen descritos varios protocolos de estimulación (Platz and Seager 1978; Johnstone 1984; Pineda et al. 1984; Howard et al. 1990), pero se usa fundamentalmente el propuesto por Howard et al. (1990). Consiste en que una vez que el gato ha alcanzado el plano quirúrgico de anestesia, se introduce la sonda con los electrodos, previamente lubricada, en el recto (es recomendable eliminar manualmente las heces) a una profundidad de unos 6 a 9 cm en el caso del gato doméstico (Axné y Linde-Forsberg 1998), cuidando de que los electrodos queden situados en una posición ventral. A continuación se inician los estímulos eléctricos del protocolo elegido. Para facilitar todo este proceso, el gato anestesiado puede ser colocado en un soporte de madera fabricado al efecto, con una inclinación tal que permita que la cabeza quede más baja que el resto del cuerpo para evitar posibles aspiraciones de saliva en el caso de usar ketamina o de vómito en el caso de usar medetomidina (Dooley and Pineda, 1991). El pene se exterioriza y se coloca dentro del tubo colector previamente temperado. Según Axné y Linde-Forsberg (1998), son necesarios aproximadamente 80 estímulos de entre 2 y 7 voltios para lograr un eyaculado, dividiéndolos en tres series con un descanso de 2 a 3 minutos entre serie. Con cada estímulo se produce una extensión rígida de los miembros posteriores, la cual indica que el estímulo ha sido adecuado (Howard et al. 1984; Axné y Linde-Forsberg 1998).

Algunos estudios inciden en los efectos del voltaje, la secuencia de recogida, la duración y el flujo retrógrado a vejiga de la orina sobre las características del semen (Pineda et al. 1984; Pineda and Dooley 1984; Dooley et al. 1991). De hecho, se observó una variación considerable intra- e inter-individuos en cuanto al volumen y número de espermatozoides eyaculados en función de la estimulación eléctrica. Sin embargo, la frecuencia de anestesia y la estimulación eléctrica no parecen alterar la capacidad eyaculatoria, ni ser perjudicial para los gatos (Pineda et al. 1984). El número de espermatozoides electroeyaculados depende del voltaje usado y del número de estímulos, pero el volumen no se afecta por el voltaje (Pineda et al. 1984 a y b).

4.2.3. RECOGIDA DE ESPERMA DE EPIDÍDIMO

Este método consiste en extraer los espermatozoides directamente de los epidídimos y conductos deferentes, que junto a los testículos correspondientes han sido retirados del animal durante la orquiectomía o bien tras la muerte de éste (Bowen 1977; Hay and Goodrowe 1993). La recogida de esperma debe ser llevada a cabo tan pronto como sea posible, ya que la calidad del esperma se deteriora con el tiempo. Se obtienen por tanto muestras muy valiosas, pues se trata de los últimos espermatozoides que se pueden conseguir de un individuo, pudiendo poseer un valor genético incalculable, como es el caso de importantes reproductores o de felinos en peligro de extinción (Axné et al. 1998, 1999; Tittarelli et al. 2006).

Tras la orquiectomía no hay que olvidarse de ligar el conducto deferente para evitar pérdidas de espermatozoides. Lo ideal es procesar las muestras inmediatamente, pero en los casos en que la distancia no lo hace posible, se pueden transportar en un recipiente, sumergidos en suero salino al 0.9% (Schäfer and Holzmann 2000; Tebet et al. 2006; Siemieniuch et Dubiel 2006), en solución Ringer sin lactato (Silva et al. 2006), en solución isotónica estéril e incluso en solución Tris-yema de huevo (Tittarelli et al. 2006). En este último caso, se observó un efecto protector de todos los parámetros espermáticos cuando se usó Tris-yema de huevo en comparación con la solución isotónica estéril (Tittarelli et al. 2006). Es aconsejable mantener la muestra a una temperatura de 38°C para evitar el shock frío en las células espermáticas (Siemieniuch et Dubiel 2006), pero en el caso de que el procesado de las muestras se pueda ver retrasado más de 1 h, se recomienda conservarlas en refrigeración entre 4° y 8°C (Goodrowe and Hay 1993). Los espermatozoides contenidos en el interior del epidídimo pueden sobrevivir durante una noche en refrigeración con sólo un 14% de descenso de motilidad (Luvoni 2006), demostrándose que pueden mantener una buena viabilidad durante 72 h (Tittarelli et al. 2006), 8 d (Yu and Leibo 2002) e incluso durante 3 semanas (Harris et al. 2001) tras la orquiectomía.

Una vez en el laboratorio, si la muestra ha sido refrigerada se debe mantener a temperatura ambiente (20°C) durante unos 30 min (Tittarelli et al. 2006). A continuación, se procede a separar cuidadosamente el epidídimo del resto del testículo y a disecar con mucha delicadeza los finos vasos sanguíneos que lo rodean, o comprimirlos para vaciar su contenido con el fin de evitar en la medida de lo posible la contaminación de la muestra con sangre. A continuación, se escoge la zona de cuerpo, cola del epidídimo y vasos deferentes y se les realiza varios cortes -5 ó 6 cortes según Schäfer and Holzmann (2000)- o se trituran (Bowen 1977; Hay and Groove 1993; Yu and Leibo 2002), sumergiéndolos a continuación en un medio a 37.8-38.0°C (Schäfer and Holzman 2000) durante unos 10 a 30 minutos para permitir la salida de los espermatozoides (Siemieniuch et Dubiel 2006). Los medios utilizados suelen ser Ringer sin lactato (Silva et al 2006), PBS (buffer fosfato salino) (Lengwinat and Blotner 1994; Schäffer and Holzman 2000; Axné et al. 2004), suero NaCl 0,9% (Tebet et al. 2006), buffer Tris (Thuwanut et al. 2008) o incluso directamente en una solución Tris-yema de huevo (Tittarelli et al. 2006). También es posible extraer los espermatozoides mediante compresión de la cola del epidídimo y los vasos deferentes (Tebet et al. 2006).

Según los estudios realizados, no existen prácticamente diferencias en la calidad de los espermatozoides procedentes de epidídimo en comparación con los obtenidos de eyaculados (Tebet et al. 2006; Luvoni 2006), (tanto en fresco como a la descongelación) siempre que se obtengan de la cola del epidídimo y vasos deferentes, pues de lo contrario, aparecerán células inmaduras con diversos defectos morfológicos. Sólo se ha observado un menor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en esperma de epidídimo, comparado con el eyaculado, posiblemente debido a la ausencia de interacción con factores estabilizantes de membrana, potencialmente presentes en el plasma seminal (Luvoni 2006). Este porcentaje de células que presentan anomalías debido a su

inmadurez suele ser de un 50.6% (Axnér et al. 2004), 51.0% (Goodrowe and Hay 1993), 52.7% (Villaverde et al 2006), 57.2% (Lengwinat and Blottner 1994) o incluso del 72.7% (Siemieniuch et Dubiel 2006).

Como es de esperar, los espermatozoides epididimarios presentan un alto porcentaje de gotas citoplasmáticas proximales, como describen Axnér et al. (1999) y Villaverde et al. (2006), (34.5% y 20.9%, respectivamente), al igual que ocurre con las distales, según indican según Villaverde et al. (2006), Pukazenthi et al. (2002) y Axnér et al. (1999) (9.8%, 12.1% o 44.5% respectivamente).

La cabeza también se puede ver afectada, describiéndose desde un 2.7% (Siemieniuch and Dubiel 2006) a un 16.6% (Axnér et al. 2004) de defectos. También son comunes los defectos en la cola: cola doblada (19.8%), enrollada (9.9%) y colas dobladas con gota citoplasmática (6.2%) (Villaverde et al. 2006). Pero estos resultados están afectados por la presencia o no del diluyente, es decir, si la fijación de la muestra se realiza antes de añadir el diluyente, se observa un menor porcentaje de anomalías en la cola (Stachecki et al. 1993; Lengwinat and Blottner 1994) debido supuestamente a una menor tasa de cambios osmóticos en el medio. Otros defectos observados se encuentran en la pieza media, con una frecuencia de entre 4.2% (Axnér et al. 1999) y 10.3% (Villaverde et al. 2006). Es interesante destacar que los espermatozoides epididimarios diluidos en PBS presentan cambios morfológicos similares a los producidos en la interacción con los fluidos seminales en la eyaculación, por lo que los valores pueden variar en el caso de evaluarse la muestra directamente fijada sin previa dilución (Axnér et al. 1998).

En cuanto a la viabilidad de la muestra, los resultados suelen ser de hasta un 83% (Siemieniuch and Dubiel 2006) y valores de 4 a 5 para motilidad total (escala de 0 a 5) (Thuwanut et al. 2008). En cuanto al porcentaje de motilidad, se ha descrito del 71 al 79% (Goodrowe and Hay 1993; Hay and Goodrowe 1993; Stachecki et al. 1993; Lengwinat and Blottner 1994; Stachecki et al. 1994) o del 57% (Stachecki et al. 1993; Siemieniuch and Dubiel 2006) en gatos normospermicos y teratospermicos respectivamente.

En cuanto al número de espermatozoides, con este método de recogida se suele conseguir una media de 7.7×10^6 spz de cada gato (Axnér et al. 2004) o incluso 13.2×10^6 (Tebet et al. 2006).

4.2.4. OTROS MÉTODOS DE RECOGIDA DE ESPERMATOZOIDEOS

Otros métodos como la **canulación quirúrgica de los vaso deferentes** (Way et al. 2000) y la **aspiración percutánea del líquido epididimario (PESA)** (Blash et al. 2000) se han aplicado para recoger espermatozoides viables, pero no son efectivos en pequeños animales debido al pequeño tamaño del epidídimo, aunque existe algún estudio en que se consigue aspirar espermatozoides del epidídimo del gato (Niwa et al. 1985). Por el contrario, el método PESA sí puede ser útil en grandes

felinos como el león (*Panthera leo*) (Damiani et al. 2004). Este método se utiliza como última alternativa en el caso de machos vasectomizados.

El **lavado vaginal** en la gata, la **citología vaginal tras la monta** o la **recogida en la vejiga urinaria** por cistocentesis, se pueden usar también tras la monta o eyaculación sólo como prueba diagnóstica para comprobar la fertilidad de un macho (Sojka 1986). Para realizar el **lavado vaginal**, la hembra debe ser sedada para introducir 1 ml de solución salina a 37°C en la vagina, inmediatamente tras la monta (Colby 1980; Howard et al. 1990), pudiéndose recoger de 40.000 a 10.240.000 espermatozoides (Howard et al. 1984; Dooley et al. 1991). Aunque los espermatozoides recolectados por este método pueden sufrir alteraciones relacionadas con la técnica de toma de muestra utilizada (Axné and Linde-Forsberg 1998).

En el caso de la **recogida en la vejiga de la orina**, se sabe que normalmente en el gato se produce una eyaculación retrógrada hacia vejiga del 15 al 90% del eyaculado (Dooley and Pineda 1986). Pero la recogida de orina mediante cistocentesis y el examen del sedimento urinario para encontrar espermatozoides sólo es útil para determinar si un gato produce espermatozoides (Howard et al. 1984).

Actualmente, existe otro método alternativo que consiste en el **sondaje uretral** del animal sedado con medetomidina. Este agonista α -2 adrenérgicos estimula la contracción de los conductos deferentes y la erección del pene. Con una sonda urinaria introducida 9 cm en la uretra se puede obtener una pequeña muestra de semen de buena calidad (Zambelli et al. 2008; Filliers et al. 2010). Con este método, aunque se obtiene un menor volumen que en la electroeyaculación, la muestra posee una concentración de espermatozoides mayor, ostentando unos parámetros de motilidad similares (Zambelli et al. 2010).

4.3. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

La evaluación del semen de un gato puede tener diferentes objetivos, desde el diagnóstico de infertilidad (Davidson 2000) hasta la evaluación de la calidad del esperma para decidir si debe ser procesado hasta la congelación o simplemente para la inseminación artificial (Platz et al. 1978; Schwartz et al. 1981; Reyna et al. 2006 a, b). En este examen es necesario valorar tanto parámetros morfológicos (defectos morfológicos generales, defectos acrosomales, etc.) como fisiológicos (motilidad, test de endósmosis, vivos-muertos, etc.).

Según Parks y Graham (1992), las características seminales que poseen mayor correlación con la fertilidad son:

- Número total de espermatozoides en el eyaculado (calculado a partir de la concentración y volumen de la muestra).
- Porcentaje de motilidad progresiva.
- Porcentaje de alteraciones morfológicas.

4.3.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

La evaluación del semen de gato suele ser dificultosa entre otros motivos debido al pequeño volumen recogido. El volumen que puede obtenerse con una vagina artificial suele ser de 0.01 a 0.12 ml (hasta 0.25 ml) (Tanaka et al. 2000), mientras que por electroeyaculación la cantidad aumenta desde 0.01 a 0.74 ml. (Dooley et al. 1991). El volumen suele determinarse usando una pipeta calibrada de 100 μ l (Platz and Seager 1978; Dooley and Pineda 1986). Obviamente, la evaluación de este parámetro no se aplica en el caso de la extracción de esperma de epidídimo, puesto que el volumen viene determinado por la cantidad de diluyente que se añade para llevar a cabo el proceso. El color suele ser blanquecino, aunque puede verse con tonalidad amarillenta si se contamina con orina y rosado o rojizo cuando hay presencia de sangre (Feldman and Nelson 1996).

4.3.2. CONCENTRACIÓN

La concentración de espermatozoides en una muestra se expresa como millones de spz/ml o millones de spz/pajuela o dosis. En el caso de las muestras obtenidas por eyaculación usando vagina artificial, se suele obtener una media de 1730 $\times 10^6$ spz/ml. Si usamos la electroeyaculación aumenta el volumen de la muestra pero, debido al efecto dilución, aparece menos concentrada (Dooley and Pineda 1986), unos 168 a 360 millones de spz/ml (13×10^6 a 153×10^6 spz totales) (Schwartz et al. 1981; Axner 2000).

En el caso de la extracción de espermatozoides de epidídimo, la concentración dependerá del volumen de diluyente añadido. De esta forma, Siemieniuch and Dubiel (2006) consiguieron muestras de 32.5×10^6 spz/ml, pero afirman que, debido a esta baja concentración se hace necesario usar una muestra obtenida mediante la mezcla de esperma de epidídimo de varios ejemplares para conseguir resultados en la inseminación artificial. Schäfer and Holzmann (2000) usaron 500 μ l de PBS para extraer los espermatozoides de epidídimo y le añadieron diluyente en proporción 1:3, consiguiendo concentraciones de 30×10^6 spz/ml antes de congelar y 20×10^6 spz/ml a la descongelación. Thuwanut et al. (2008) sumergiendo el epidídimo en 700 μ l de diluyente obtuvieron una concentración 37.8×10^6 spz/ml (rango de 5.5 - 72.0×10^6). Resulta más adecuado hacer referencia al número total de espermatozoides obtenidos, ya que la concentración, en este caso viene dada por el volumen de diluyente empleado para extraer los espermatozoides. De este modo, se pueden obtener desde 3.1×10^6 (Splinder et Wildt, 1999) hasta 1614×10^6 spz totales (Jiménez et al., 2012) de ambos epidídimos. Esta gran variación se debe al procesamiento de la muestra, obteniéndose un mayor número de espermatozoides si se procede al lavado del epidídimo.

Si se compara el número total de espermatozoides en eyaculados obtenidos con vagina artificial en carneros, perro, toros, caballos y verracos, con los eyaculados obtenidos también con una vagina artificial en gatos de fertilidad probada, habría que considerar al gato como un animal que produce eyaculados oligospermicos.

Sin embargo, si se recuerda la fisiología reproductiva del gato, que en condiciones de monta natural copula frecuentemente con la hembra en estro (Concannon et al. 1980; Johnson and Gay 1981), es posible aventurar la hipótesis de que estas copulaciones frecuentes del gato tengan el propósito biológico de establecer una población numérica adecuada de espermatozoides en el tracto reproductor femenino, al mismo tiempo que estimular la ovulación, pues recordemos que en esta especie existe ovulación inducida mediante la estimulación vaginal, lo que produce en la hembra una descarga ovulatoria de LH. De hecho, los niveles sanguíneos de LH se correlacionan positivamente con el número de cópulas (Concannon et al. 1980). Además, las cópulas repetidas garantizan al mismo tiempo, una sincronización eficiente entre la deposición de espermatozoides en los genitales femeninos con la ovulación y fertilización de los oocitos.

En el caso de felinos salvajes parece ser que tiene más importancia la calidad de la motilidad que la concentración en el eyaculado. Así, en el caso del leopardo, se producen eyaculados con una concentración más alta que en tigres, pumas y guepardos, pero al poseer un porcentaje de motilidad muy bajo, la cantidad de espermatozoides viables se equiparan entre especies (Wildt et al. 1988).

4.3.3. MOTILIDAD

Se define como motilidad de un espermatozoide a la capacidad de éste de desplazarse en el medio donde se encuentra. Este desplazamiento puede ser en línea recta (movimiento lineal progresivo) o describiendo un movimiento circular. Este parámetro puede ser evaluado en gato de una forma objetiva mediante técnicas que se sirven de equipos especializados como el sistema computerizado de análisis de esperma (Computer Assisted Semen Analysis ó CASA) o la técnica de transmigración. El CASA permite obtener el porcentaje de motilidad de la muestra, además de otros parámetros cinéticos más específicos como la velocidad curvilínea, linealidad, velocidad en línea recta y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. Además, al evaluar conjuntamente varios parámetros de motilidad, puede detectar el estado de hiperactivación en espermatozoides probablemente capacitados (Stachecki et al. 1993). Filliers et al. (2008) describieron el uso del CASA para determinar la motilidad espermática en muestras frescas y refrigeradas en gatos, indicando que permite discriminar diferencias en el movimiento espermático. Estos autores establecieron valores de referencia para espermatozoides de gato, aunque afirmaron que esta técnica no se usa de forma tan amplia como en otras especies. En este sentido, Siemeieniuch y Woclawek-Potocka (2008) afirmaron que el pequeño número de espermatozoides móviles observado al utilizar el sistema CASA frente al examen con microscopio óptico sugiere que el manejo de las muestras o la evaluación CASA no son satisfactorias, por lo que recomiendan nuevos protocolos de trabajo y mejoras en el CASA en gatos.

Otra técnica objetiva es la **transmigración (TMR)**, descrita por Holzmann en 1987, que da valores del porcentaje de espermatozoides que se mueven atravesando los poros de 8 μm de diámetro de una membrana por unidad de tiempo, con una

velocidad de contracorriente de 5 ml/h. Se puede usar como medio el PBS o una solución salina, sin mostrar apenas diferencias (7% más de espermatozoides móviles en PBS, pero una menor velocidad de paso por la membrana comparado con la solución salina). La TMR se ha utilizado en espermatozoides de diferentes especies, demostrándose una correlación positiva y significativa de los parámetros de motilidad medidos con este método y con otras técnicas convencionales en el toro (Holzmann 1987), en el carnero (Pilz 1992), el caballo (Renner et al. 1992), en el perro (Schäfer et al. 1996) y en el gato (Schäfer and Holzmann 2000).

Entre las técnicas de valoración subjetiva se encuentra la más accesible en el laboratorio que es la **valoración al microscopio óptico**. Para ello, se colocan unos 10-25 µl de la muestra (Axnér et al. 1997; Siemieniuch and Dubiel 2006) sobre un portaobjetos con un cubre templados a 38°C y se observa a 200-400 aumentos al menos 4 ó 5 campos para determinar:

- Porcentaje de motilidad total: es el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento.
- Porcentaje de motilidad progresiva: Porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento progresivo en línea recta cruzando el campo.
- Índice de motilidad espermática (SMI)= $0.5 \times [(motilidad\ progresiva \times 20) + (\% \text{ de motilidad})]$ (Howard, 1993).
- Motilidad total, velocidad de motilidad, calidad de la motilidad o vigor: se clasifica de acuerdo a una escala que va desde el 0 (sin movimiento) al 5 (progresión a través del campo, rápida y progresiva) (Platz and Seager 1978).

El parámetro de motilidad que más se relaciona con la calidad de la muestra es tal vez la velocidad de movimiento o motilidad total (en una escala del 0 al 5), siendo los valores en semen fresco de 4 a 5 (Stornelli 2007). Para el porcentaje de motilidad, Pukazhenthii et al. (2002) obtuvieron valores iniciales del 70-85% en eyaculados de gato doméstico, serval y pantera nebulosa. El porcentaje de motilidad de los espermatozoides epididimarios ronda entre el 71-79% (Goodrowe and Hay 1993; Hay and Goodrowe 1993; Stachecki et al. 1993; Lengwinat and Blottner 1994) y un 57% (Stachecki et al. 1993) en gatos normospermicos y teratospermicos, respectivamente. En eyaculados se considera normal una motilidad progresiva del 60 al 90% (Axnér et al. 1997 y 1998; Johnston et al. 2001). Thuwanut et al. (2008) obtuvieron valores de 75 al 90% en esperma de epidídimo. Los valores de SMI para semen fresco ronda el 74.5% en normospermicos frente al 62.0% en teratospermicos (Howard 1993).

La motilidad también se ve afectada por el diluyente utilizado. De esta forma, se han descrito valores del 60% en solución salina (Axnér et al. 1999), 65% en PBS (Schäfer and Holzman 2000), 66.8% en Tris-fructosa con yema de huevo (Tsutsui et al. 2003), 79.3% en diluyente Tes-yema de huevo (Mies Filho 1987) y hasta un 83.7% usando diluyente de Tris-fructosa (Villaverde et al. 2006). Se postula que la presencia de sangre procedente de los finos vasos que acompañan al epidídimo puede ser la causante de un menor valor de motilidad usando el mismo diluyente (Villaverde et al. 2006).

Hay que señalar que en el caso de someter a los espermatozoides a soluciones hipertónicas y seguidamente isotónicas, se observa una gran disminución en la motilidad en los espermatozoides procedentes de gatos teratospérmicos (Pukazhenthí et al 2000, 2002). Este fenómeno también se ha observado en espermatozoides de morueco (Curry et al. 1994), cerdo (Gilmore et al. 1998), toro (Liu et al. 1998) y humanos (Gao et al., 1995). El mecanismo por el cual la hipertonicidad influye en la motilidad espermática es todavía desconocido. Sin embargo, Gao et al. (1997) propuso que los cambios en el volumen osmótico podrían influir en el funcionamiento de la mitocondria, que es la fuente energética del espermatozoide.

Aunque los valores de motilidad no se suelen ver afectados por la refrigeración (Thuwanut et al. 2008), sí que ven disminuidos en las muestras descongeladas en un 22-24% (Hay and Groove 1993; Lengwinat and Blottner 1994), aunque estos valores se pueden mejorar si se seleccionan los espermatozoides con mejor motilidad de la muestra mediante el proceso de swim-up, o mejor aún mediante una centrifugación con un medio coloidal, consiguiéndose así hasta unos valores de motilidad del 74% (Lengwinat and Blottner 1994; Chatdarong et al. 2009). La capacidad de movimiento es uno de los indicadores más directos de la calidad del semen e incluso de su viabilidad para soportar el proceso de congelación (Jiménez y col. 2007) y su posterior uso en reproducción asistida. Por tanto, sólo merecería la pena congelar muestras que posean una motilidad total a partir de 4. De acuerdo con algunos estudios, el semen fresco con al menos un 30% de motilidad progresiva puede ser usado con resultados positivos en inseminación intravaginal o intrauterina en un 78 a 80% de las hembras (Axnér 1998; Tsutsui et al. 2000, 2001; Luvoni et al. 2003a,b). En esperma epididimario refrigerado durante 3 días, este porcentaje de motilidad puede mantenerse (Siemieniuch and Dubiel 2006).

4.3.4. MORFOLOGÍA

La evaluación de la morfología de los espermatozoides es indispensable para determinar la calidad de la muestra obtenida, pues muchos de los defectos que pueden presentar inciden negativamente en la motilidad y, por tanto, en la capacidad fecundante. Con esta evaluación se pretende determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan defectos morfológicos en una determinada muestra. Si este porcentaje excede del 60% se considerará que la muestra es teratospérmica (Pukazhenthí et al. 2001) y, en este caso, se considerará que no posee calidad suficiente para su uso en técnicas de reproducción asistida, no sólo porque las alteraciones morfológicas que afectan a la cola y pieza intermedia dificulten la motilidad, sino porque parece ser que estos espermatozoides teratospérmicos no serán capaces de resistir el proceso de crioconservación, pues son más sensibles al shock frío (Pukazhenthí et al. 1999, 2000).

Según Platz and Seager (1978), las anormalidades morfológicas se pueden clasificar según su origen en: **primarias**, cuando ocurren durante la espermatogénesis en los testículos, como son la forma y tamaño anormal de la cabeza (microcefalia y macrocefalia, cabezas piriformes, presencia de espermátidas

o espermatozoides inmaduros), presencia de doble pieza intermedia y cabeza estrecha, alteraciones en el acrosoma, bicefalia y adhesión de dos colas en posición abaxial (Axner et al. 1999; Pukazhenthil et al. 2002); **secundarias**, debido a daños durante su maduración y transporte a lo largo del epidídimo, como son la pieza intermedia doblada, cola y cuello doblados, gota citoplasmática (proximal o distal), cabezas desprendidas y determinadas anomalías acrosomales; y **terciarias**, provocadas por un mal manejo de la muestra, por ejemplo por un cambio brusco de temperatura, lo que provoca un aumento de los espermatozoides con la cola enrollada, entre otras. Actualmente esta clasificación se ha resumido en **anomalías primarias y secundarias**, englobando éstas últimas a las anteriores anomalías terciarias descritas. Los defectos primarios se consideran generalmente más perjudiciales para la fertilidad que las anomalías secundarias (Wildt et al. 1987a; Howard et al. 1990) como la presencia de gota distal, considerada normal en los espermatozoides epididimarios felinos (Axner et al. 1998; Axner et al. 1999; Axner et al. Linde-Forsberg. 2007). Y los defectos morfológicos también se pueden clasificar atendiendo a la zona del espermatozoide afectada: acrosoma, cabeza, pieza intermedia y cola.

Para evaluar la morfología de los espermatozoides se hace imprescindible preparar la muestra fijándola en glutaraldehído al 0.3% (Howard 1990, 1993; Long et al. 1996; Pukazhenthil et al. 1996, 2002), al 1% (Pursel and Johnson, 1974), con formol 10% (Axner et al. 1997, 2004) o con cualquiera de las tinciones usadas para el análisis de semen, como eosina-nigrosina (que además da información sobre el porcentaje de células vivas y muertas), eosina-verde rápido FCF (Byers et al. 1989; Hay and Groowe 1993), método de Giemsa de Watson (1975), Tinción de Papanicolaou, carbolfucsina (Axner et al. 1997, 2002b), Diff-Quick, solución de Hancock o Spermac® (que también da información sobre el estado del acrosoma). Se ha observado que las preparaciones con Spermac® contienen menos gotas citoplasmáticas proximales (5% vs 25% con tinción de Hancock), posiblemente debido a la degeneración de éstas durante el proceso de tinción (Schäfer and Holzmann 2000).

La ultramicroscopía mediante el uso de microscopio electrónico de transmisión se reserva para los trabajos de investigación en los que se evalúan alteraciones morfológicas del espermatozoide o para alteraciones específicas que requieren de esta tecnología para su diagnóstico (disquecia ciliar primaria, síndrome de Kartagener) (Stornelli 2007). En el denominado síndrome de Kartagener, la presencia de una astenozoospermia total (ausencia de motilidad) está asociada a una alteración de los cilios que conforman el flagelo espermático, debido a la ausencia de los brazos de dineína (Lungarella et al. 1982), y sólo es reconocible mediante microscopía electrónica. Al mismo tiempo, el estudio de la morfología espermática con este método permite identificar el tipo y localización del daño tras el proceso de criopreservación. Esta información es sumamente importante cuando se evalúa la capacidad crioprotectora de los diluyentes de semen (Hammerstedt et al. 1990; Ström Host et al. 1998; Peña 2004; Stornelli et al. 2004a,b, 2005; Reyna 2005a, b).

El semen normal de gato posee alrededor del 40% de formas normales, como describen Axnér y Linde-Forsberg (2007) en un estudio retrospectivo. Sin embargo, existe una gran variabilidad según los métodos de evaluación utilizados. De esta forma, otros autores observaron defectos morfológicos en torno al 18% (Baran et al. 2004), 29% (Wildt et al. 1983) y 25% (Pukazhenti et al. 2000). Howard y al. (1990) observaron que el rango de espermatozoides anormales, tanto en felinos domésticos como salvajes era alto. Platz y Seager (1978) obtuvieron un porcentaje menor del 2% de espermatozoides anómalos en muestras obtenidas mediante electroeyaculación. Y con vagina artificial se describieron menos del 10% de anomalías (Sojka et al. 1970; Tsutsui et al. 2000; Tanaka et al. 2000).

Los defectos morfológicos más frecuentemente observados en el semen de gato son los siguientes (Axnér et al. 1997 y 1999; Johnston et al. 2001):

- Anormalidades en el acrosoma (2.3%): acrosoma anudado, acrosoma hinchado, acrosoma con bordes anormales.
- Anormalidades de la cabeza (14.25%): cabeza desprendida (2.3%), cabeza estrecha, macrocefalia, cabeza sin desarrollar.
- Anormalidades de la pieza media (5%): pieza intermedia doble y otros defectos. Muchas veces la presencia de gota citoplasmática proximal (12.8%) o distal (9.95%) induce la angulación de la pieza intermedia e incluso del flagelo (Neubauer et al. 2004).
- Anormalidades de la cola: cola enrollada (11,6%), cola doblada (6,2%), doblemente doblada (2%) y doble flagelo.

Los espermatozoides epididimarios de gato presentan con más frecuencia anomalías morfológicas, con valores entre 36% al 54% (Goodrowe and Hay 1993; Hay and Goodrowe 1993; Lengwinat and Blottner 1994), en contraste con los recogidos mediante otras técnicas. Esto se debe parcialmente al hecho de que los espermatozoides sufren su maduración en el epidídimo y conductos deferentes, observándose por tanto muchas formas inmaduras. Es característica del semen del gato la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o distales en la pieza intermedia, sobre todo en esperma epididimario, y se ha descrito que tras la centrifugación (aprox. a 700g), una gran proporción de gotas citoplasmáticas proximales migran hacia una posición distal o incluso se pierden (Tebet et al. 2006). También se ha indicado que el diluyente puede inducir la rotura de las gotas citoplasmáticas, sobre todo en espermatozoides más maduros (Cooper and Yeung 2003). De este modo, Wagenfeld et al. (2000) constataron una menor cantidad de gotas citoplasmáticas al evaluar semen diluido en PBS. Esto es debido a los cambios osmóticos y de pH que se producen al interaccionar con los diluyentes como el PBS o los fluidos seminales (Larsen et al. 1980; Axnér et al. 1998), disolviendo o rompiendo la gota citoplasmática de la pieza intermedia e incluso doblando y enrollando la cola del espermatozoide.

La **teratospermia** es muy frecuente en poblaciones de felinos salvajes así como en el gato doméstico (Wildt 1994; Pukazhenti et al. 2001). Se considera que un animal es teratospérmico cuando su esperma presenta un valor superior al 60% de

espermatozoides con defectos morfológicos (Howard et al. 1990; Axnér 2000; Johnston et al. 2001; Pukazenthi et al. 2001), pudiendo llegar hasta un 85% (Pukazenthi et al. 2002). Si bien la etiología de la teratospermia es desconocida, se ha observado que puede aparecer en el gato doméstico debido a factores genéticos, estacionales, nutricionales, asociados al período de abstinencia o al estado de salud (Blottner et Jewgenow, 2007; Jewgenow et al., 2009). Por otra parte, los espermatozoides estructuralmente defectuosos observados en felinos salvajes, como el guepardo (Wildt et al. 1984, 1987a, 1987b, 1988), y en poblaciones de león geográficamente aisladas (Wildt et al. 1983) se relacionan con un descenso de la variación genética (alto grado de homocigosis) y bajas concentraciones de testosterona circulante (Wildt et al. 1987; Howard et al. 1990). En este sentido, Howard y Wildt (1990) demostraron que la concentración de testosterona en gatos teratospérmicos era un 33% más baja que en gatos normales. Müller et al. (2012) además señalaron que una alta concentración de estradiol testicular junto a una proporción baja de testosterona:estradiol son causantes de mayor número de anomalías espermáticas.

Las anomalías predominantes en felinos teratospérmicos incluyen la pieza intermedia doblada con o sin gota citoplasmática, colas dobladas y enrolladas en ovillo (Wildt et al. 1988). Otros de los defectos observados en una alta proporción de espermatozoides son la presencia de grandes vacuolas y protrusión de la matriz acrosomal y enrollamiento del acrosoma en sí mismo (Pukazenthi et al. 2001). Estas anomalías son importantes, pues suelen ir acompañadas de una menor motilidad. No existe ningún estudio que relacione el porcentaje de cada tipo de anomalía morfológica en el esperma del gato con su capacidad fecundante (Howard et al. 1984, 1990; Axnér et al. 1997), aunque Axnér y Linde-Forsberg (2007) describen que machos teratospérmicos pueden tener descendencia. Esto puede deberse a la compensación que se produce en el caso de los felinos por las frecuentes cópulas (Guggisberg 1975).

Por otra parte, existen estudios que correlacionan parámetros de motilidad (mediante CASA) con el porcentaje de anomalías morfológicas (gatos normospérmicos vs teratospérmicos) (Stachecki et al. 1993). A esto se añade que en gatos teratospérmicos aparece comprometida la penetración en la zona libre de oocitos de hámster y en la zona pelúcida de oocitos de gato *in vitro* (Howard et al. 1991). Además, estos espermatozoides son más susceptibles a dañarse durante el proceso de congelación debido al shock frío y osmótico (Axnér et al. 2004). Por último, como ya se comentó, se sabe que en razas puras y en poblaciones de felinos en peligro de extinción aisladas poblacionalmente existe un mayor porcentaje de anomalías morfológicas.

4.3.5. INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

Junto a la motilidad, la integridad del acrosoma es otro de los factores limitantes a la hora de la fecundación. Por tanto, no sólo se debe valorar su morfología sino también su función. Existen tinciones específicas que tiñen el acrosoma de un color diferente para poder diferenciarlo dentro de la cabeza del espermatozoide con más

detalle. Una de las tinciones más utilizadas es **Spermac®**. Esta técnica, que se ha usado con éxito en numerosas especies, consiste en una tinción metacromática, rápida, fácil y fidedigna a la hora de observar diferentes niveles de defectos en el acrosoma (Oettle et al. 1986). También se ha utilizado para la evaluación de semen de gato, obteniéndose buenos resultados para la valoración del acrosoma (Schäfer y Holzmann 2000; Baran et al. 2004). Algunos autores compararon esta técnica con la tinción de Hancock (2,47% defectos acrosomales según Kaya 2000) y observaron que Spermac® era más eficaz al revelar los defectos de la cabeza y acrosoma. Al microscopio, el acrosoma, la pieza intermedia y la cola se ven de color verde, la región postacrosomal de color rojo y el segmento ecuatorial de color verde brillante. Por tanto, figuran como espermatozoides con acrosoma intacto aquéllos que muestran la región acrosomal verde y la postacrosomal rosa, con una fina banda verde oscura formando un semicírculo en el extremo de la cabeza. Los espermatozoides con acrosomas reactivos o anormales muestran la región acrosomal de color rosa, o puede ser verde pero con el semicírculo roto, discontinuo, vesiculado, con pérdida parcial de la banda, deshilachada o incluso con pérdida total de ésta. Estos espermatozoides no son apropiados para la fecundación puesto que han perdido ya las enzimas necesarias para penetrar en el oocito.

Para evaluar la funcionalidad del acrosoma se proponen dos tipos de pruebas, por un lado los tests *in vitro* y por otro las técnicas de tinción con fluorocromos específicos.

Test *in vitro*:

- Adhesión a la zona pelúcida (ZP) de oocitos homólogos: esta técnica es posible sólo para espermatozoides capacitados, es decir, que han sufrido la reacción de capacitación.
- Penetración de la ZP de oocitos homólogos y heterólogos: es el mejor indicador de capacitación, ya que no se limita a la adhesión a zona pelúcida del oocito, sino que es necesaria la penetración de la misma. Esta técnica puede realizarse con oocitos conservados en solución salina, ya que esta conservación previene a los oocitos de sufrir la reacción cortical, permitiendo así que más de un espermatozoide penetre la ZP. Esto da información sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados y los oocitos de gato pueden ser empleados incluso para testar semen de felinos salvajes (Howard et al. 1986; Andrews et al. 1992, Donoghue et al. 1992; Word et al. 1993; Swanson et al. 1996).
- Penetración en la “zona libre” de oocitos de hámster: en esta técnica, los oocitos son tratados con una solución de hialuronidasa al 0.1% para eliminar las células del cúmulo y con una solución de tripsina al 0.2% para eliminar la ZP que de otra manera impediría a los espermatozoides heterólogos (interespecíficos) penetrar los oocitos. Como los oocitos de especies amenazadas no siempre están disponibles, los gametos heterólogos pueden sustituirlos, no desperdiciando así valiosos oocitos (Byers et al. 1989, Nelson et al. 1999; Da Paz et al. 2002).
- Fertilización de oocitos homólogos: aunque las técnicas de criopreservación reduzcan la calidad del espermatozoide y su potencial fertilizante, tanto los

espermatozoides refrigerados como congelados se usan para la fertilización *in vitro*, siendo capaces de producir embriones (Pope et al. 1999; Donoghue et al. 1992; Lengwinat and Blottner 1994; Nelson et al. 1999; Leoni 1999; Bartels et al. 2000; Bogliolo et al. 2001). Los oocitos felinos son obtenidos a partir de ovarios de gatas ovariectomizadas, son madurados posteriormente durante 24 horas en un medio especial (TCM 199+1UI/ml hCG+0.5UI/ml FSH+0.3% BSA a 38°C en una atmósfera al 5% de CO₂). Como es de esperar, se obtienen peores resultados cuantos más días lleve el esperma refrigerado y, sobre todo, si se utilizan muestras congeladas-descongeladas (Bogliolo et al. 2001).

Tinciones con fluorocromos específicos

- *Arachis hypogaea* (cacahuete): Las células espermáticas se tiñen usando isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de *A. hypogaea* (FITC-PNA, Sigma, St. Louis). Se puede añadir además propidium iodide para mejorar la visualización del espermatozoide. Esta tinción es específica para la superficie de la membrana acrosomal, de manera que los acrosomas que exhiben un brillo uniforme se clasifican como acrosomas intactos y aquellos que muestran una apariencia fragmentada o brillo sólo en el segmento ecuatorial se clasifican como acrosomas dañados (Pukazhenthil et al. 1999; Pukazhenthil et al. 2001).

- *Pisum sativum*: Otros autores han utilizado *Pisum sativum* (PSA-FITC), con resultados similares al anterior (Long et al. 1996; Axner et al. 2002a).

- Clortetraciclina (CTC): es un antibiótico con un componente fluorescente que puede usarse para visualizar el curso de la capacitación espermática y reacción acrosomal. Usando CTC es posible discriminar entre acrosomas intactos capacitados y no capacitados, hecho que no ofrecen otros métodos, que sólo diferencian entre presencia o ausencia de acrosoma. La técnica está basada en la transferencia de CTC a través de las membranas del espermatozoide penetrando en los compartimientos intercelulares, que contienen altos niveles de calcio libre, donde ioniza un anión y se une al calcio, produciendo como resultado la fluorescencia (Tsien 1989). El complejo CTC-Ca⁺² se une preferentemente a las regiones hidrofóbicas de la membrana celular, dando lugar a un patrón de tinción de membrana característico con varias fases transicionales en los espermatozoides (Saling and Storey 1979). Se ha demostrado que la técnica CTC es útil para evaluar la integridad funcional del espermatozoide de gato (Marinoni 2001).

Valores en semen de gato

Los defectos morfológicos del acrosoma más observados en el semen de gato son acrosoma engrosado, pérdida y disolución del acrosoma, y observación de bordes anormales (Axner et al. 1999; Baran et al. 2004). Habitualmente el porcentaje de defectos del acrosoma en el semen fresco ronda el 2% (Kaya et al. 2000), 3% (Long et al. 1996) e incluso el 9% (Baran et al., 2004 y Pope et al., 1991) en gatos normospermicos (siendo del 10.4% en teratospermicos). Por otra parte, en esperma descongelado se pueden detectar entre un 1 y un 6% de defectos acrosomales (Hay and Groove 1993; Schäfer and Holzmann 2000). Empleando técnicas de

fluorescencia con PNA-FITC, Thuwanut et al. (2008) obtuvieron valores de 41.0 a 56.5% de acrosomas intactos en muestras frescas de esperma epididimario. Estas variaciones entre autores pueden atribuirse a las diferentes técnicas de tinción y fijación usadas.

En cuanto al test de penetración de la ZP de oocitos homólogos (mantenidos a 38°C, 5% CO₂), Wood et al. (1993) consiguieron resultados para semen fresco de 86.7% en gatos normospermicos, frente a 66.7% para teratospermicos. En cuanto a la penetración en el espacio perivitelino, los espermatozoides normospermicos obtuvieron un 53.3%, muy por encima del 23.3% observado en teratospermicos.

Correlación con la fertilidad

Uno de los factores limitantes a la hora de la fecundación en el esperma del gato es la integridad de la función del acrosoma. El acrosoma del espermatozoide debe sufrir una serie de reacciones químicas llamadas proceso de capacitación, que le permite unirse a la zona pelúcida del oocito para llevar a cabo la fecundación. Este estado de capacitación sólo dura unas horas (tiempo necesario para que el espermatozoide en condiciones naturales llegue hasta la zona de fecundación en el tracto reproductor de la hembra) y va acompañado de un estado de hipermotilidad (Bedford 1970; Meizel 1980). El problema en los espermatozoides felinos, sobre todo en los procedentes de epidídimo, es que se produce un estado de capacitación prematuro a consecuencia de los cambios que sufre el espermatozoide durante el proceso de congelación. Esto trae como desventaja una menor longevidad del espermatozoide y, por tanto, su menor capacidad de fecundación *in vitro* (Marinoni 2001).

4.3.6. FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA

La célula espermática está rodeada por una membrana citoplasmática que actúa como separación física del medio exterior, a la vez que intenta equilibrar el medio interno celular con el externo mediante la entrada y salida de agua e iones. De su integridad depende el buen funcionamiento del espermatozoide para llevar a cabo su función fecundante. De este modo, se atribuye una gran importancia a la **osmolalidad** del medio en que se encuentra el espermatozoide, que en el semen del gato oscila entre 290 y 320 mOsm/Kg, valores que debería poseer el diluyente ideal. Las soluciones hiposmóticas producen hinchamiento y ruptura de la membrana, lo que conlleva también la rotura de las gotas citoplásmicas y la presentación de colas dobladas (Glover and Watson 1985; Barth and Oko 1989; Pukazhenthil et al. 2002; Cooper and Yeung 2003), siendo esto más dañino que el “arrugamiento” de la membrana causado por las soluciones hipertónicas. De hecho, en presencia de una solución hipertónica conteniendo un crioprotector, los espermatozoides felinos suelen mantener una proporción casi inalterable de membranas intactas, como observaron Pukazhenthil et al. (2002). Pero aunque la hipertonicidad parezca inocua para las membranas, sí se observan daños irreversibles como consecuencia de la vuelta a condiciones isotónicas durante la rehidratación celular (Gao et al. 1997). Este hecho se acusa más en el caso de

felinos teratospérmicos que, al estar afectados supuestamente de una maduración incompleta de sus membranas, son más sensibles al estrés osmótico (Howard et al. 1993; Wildt 1994; Pukazhenthii et al. 2002).

Aunque las membranas de los espermatozoides de mamíferos generalmente se muestran resistentes al daño bajo condiciones hipertónicas, existen variaciones entre especies. Por ejemplo, al exponer el esperma de toro a >800 mOsm (Liu et al. 1998) o de morueco a >1000 mOsm (Curry et al. 1994) se observó una rotura de membranas masiva. En este contexto, los felinos son bastante diferentes pues más del 90% de las membranas permanecieron intactas incluso cuando fueron expuestas a soluciones de 2400 mOsm (Pukazhenthii et al. 2002). Obviamente hay que tener en cuenta también que el genotipo regula el nivel de sensibilidad dentro de una misma especie. Por ejemplo, Songsasen y Leibo (1997), al examinar tres razas de ratones, observaron que los espermatozoides de una raza híbrida resistían el estrés hipertónico más efectivamente que los de las otras dos razas puras. Diferencias similares en la sensibilidad osmótica también se han observado en genotipos de vacuno (Beatty et al. 1976), humanos (Kramer et al. 1996), caballo (Amann et al. 1987) y cerdo (Gilmore et al. 1996). En gato aún no existen este tipo de estudios comparativos entre razas o genotipos.

En el caso contrario, Gao et al. (1995) observaron que añadiendo agua desionizada a los espermatozoides sometidos a una solución hipertónica, se causaba un excesivo incremento en el volumen de la célula, excediendo de la capacidad máxima que puede soportar la membrana. Aparte de reducir la viabilidad, los espermatozoides que volvían rápidamente a la isotonicidad o con agua desionizada, también sufrían una rápida pérdida de motilidad y movimiento progresivo.

Para valorar la integridad de la membrana de los espermatozoides se suele recurrir al **test hiposmótico o de endósmosis (HOS)** (Rota et al. 1995), en el que se incuba la muestra en solución hiposmótica de 150 mOsm. Tittarelli et al. (2006) emplearon esta técnica en espermatozoides epididimarios de gato tras la refrigeración, obteniendo a las 24h resultados de 76.0 al 82.1% de espermatozoides con la membrana intacta. Los espermatozoides que presenten daños en su membrana citoplasmática no serán capaces de regular osmóticamente su medio intracelular y no podrán soportar los cambios osmóticos que conlleva todo el proceso de adición de diluyente, congelación y descongelación. De hecho, un estudio demuestra que espermatozoides morfológicamente normales y con buena motilidad, procedentes de gatos teratospérmicos, tienen seriamente comprometida la reacción de capacitación y reacción acrosomal in vitro (Pukazhenthii et al. 2001), posiblemente debido a modificaciones en su membrana citoplasmática (fluidez y fase de transición) (Long et al. 1996) que incrementan la susceptibilidad de que se produzca un daño irreversible en ésta tras soportar el proceso de congelación-descongelación.

4.3.7. VIABILIDAD O INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

La detección de células espermáticas vivas es de gran importancia para los protocolos de criopreservación (Garner and Johnson 1995; Neidl et al. 2003), pues sólo el semen de mejor calidad (con el menor porcentaje de células en apoptosis) debería ser usado para la congelación. La viabilidad de una muestra de esperma se mide por el porcentaje de células vivas/muertas. Para ello, se recurre a técnicas de tinción basadas en la integridad de la membrana citoplasmática, como la **eosina-azul de anilina** o la **eosina-nigrosina** (Hay and Groove 1993). En esta tinción, las células muertas absorberán el colorante de color rosa de la eosina y las vivas mantendrán una coloración blanca que contrastará con el fondo negro creado por la nigrosina.

También se puede emplear la citometría de flujo para evaluar los resultados de tinciones como la técnica de combinación de dos fluorocromos: **SYBR-14**, el cual es permeable en las células vivas y se une al ADN de los espermatozoides vivos, y el **ioduro de propidio** (PI), que se une al ADN de las células muertas o moribundas. Esta tinción, descrita por Garner et al. (1994), también permite la evaluación de la calidad de membrana (Wilhelm et al. 1996; Johnson and Welch 1999; Johnson 2000). Las células vivas se observan de un color verde fluorescente, mientras que las muertas o con daños graves en la membrana se ven de color rojo fluorescente. Esta técnica ofrece resultados similares a la tinción de eosina-nigrosina (Siemieniuch and Dubiel 2006); tiene la ventaja de ser más rápida, pero el inconveniente de tener que usar una muestra de al menos un millón de espermatozoides cuando desea utilizarse junto al citómetro de flujo. En esperma procedente de epidídimo se obtuvieron unos porcentajes de células vivas de 84.9% y 82.2% usando la técnica de eosina-nigrosina y de SYBR-14/PI, respectivamente (Siemieniuch and Dubiel 2006). Por su parte, Thuwanut et al. (2008) empleando fluorocromos obtuvieron valores entre 67.5 y 93.0% en esperma fresco de epidídimo.

Otro kit utilizado es **Apoptosis Detection Kit® (Oncogene)** que evalúa la asimetría de la membrana fosfolipídica, uno de los síntomas iniciales de muerte celular (Howes and Jones 2002). Esta asimetría se debe a la translocación de la fosfatidilserina desde el interior a la superficie externa de la membrana celular (Beveris et al. 1999; Duru et al. 2001). Anexina V y PI se combinan pueden detectar células que empiezan a sufrir daños irreversibles en su membrana, lo que les conducirá a la muerte celular. Con los métodos habituales de valoración parecerían totalmente viables, pero en realidad no son aptas para su uso en inseminación artificial.

4.3.8. INTEGRIDAD DEL ADN

Se ha comprobado que durante el proceso de congelación-descongelación se produce fragmentación del ADN del espermatozoide debido a la presencia de los radicales libres producidos en el medio, tal como se ha comprobado con muestras de semen equino (Baumber et al. 2003) y humano (Agarwal et al. 2003). Además, estos efectos negativos aumentan durante el tiempo de incubación post-

descongelación debido probablemente a una mayor producción de radicales libres del oxígeno durante este período.

El método de evaluación de la integridad del ADN espermática usando **naranja de acridina (AO)** fue modificado a partir del descrito para humanos (Tejada et al. 1984; Lui and Baker 1992). Las cabezas espermáticas con la integridad de ADN normal (doble hélice) emiten fluorescencia verde, mientras que aquéllas con ADN desnaturalizado o de una sola cadena despiden fluorescencia de color naranja, amarilla o roja. Existen pocos estudios sobre esperma de gato, por lo que se dispone de muy pocos valores de referencia. Así por ejemplo, Thuwanut et al. (2008) obtuvieron a la descongelación un 87.9% de ADN intacto, comprobando que la cisteína era más efectiva como antioxidante que la vitamina E. Obviamente, aunque un espermatozoide logre unirse al oocito, si su ADN está deteriorado no podrá llevar a cabo la fecundación. La medición de este parámetro refleja el correcto manejo de la muestra congelada y permite comparar entre distintos diluyentes.

4.4. PRESERVACIÓN DEL SEMEN FELINO

El semen de gato fresco sin diluir, almacenado a 37°C, mantiene la motilidad *in vitro* durante 60 min. Este período puede ser prolongado a 140 min si se baja la temperatura a 23°C, e incluso varios días si se diluye con un medio apropiado y se baja la temperatura a 4°C (Goodrowe et al. 1989). Pero si lo que se pretende es crear un banco de esperma para aplazar su uso incluso varios años, se recurre a la congelación en nitrógeno líquido. Esto permite la conservación de material genético muy valioso perteneciente no sólo a gatos domésticos de raza sino también a ejemplares únicos de especies de felinos salvajes en peligro de extinción, en los que cada individuo tiene un incalculable valor genético.

4.4.1. REFRIGERACIÓN

El objetivo de la refrigeración del esperma es aplazar su uso en unos días, mediante su conservación a temperaturas comprendidas entre 4° y 8°C. Tanto los espermatozoides eyaculados (Glover and Watson, 1985; Pope et al. 1989; Pukazhenthii et al. 1999) como los obtenidos de epidídimo (Goodrowe and Hay 1993; Harris et al. 2001) pueden prepararse para el proceso de refrigeración. También es posible refrigerar los testículos y después utilizar los epidídimos y conductos deferentes para recolectar los espermatozoides (Goodrowe and Hay 1993; Hay and Goodrowe 1993). Este procedimiento permite un almacenamiento a corto plazo del esperma, es decir, durante una noche o 24 horas (Glover and Watson 1985; Pope et al 1989, 1991; Goodrowe and Hay 1993), aunque también se ha descrito la supervivencia de espermatozoides felinos refrigerados durante 5-7 días (Glover and Watson 1987; Harris et al 2001) hasta 26 días (Harris et al. 2001).

No existen diferencias de calidad al descongelar espermatozoides epididimarios refrigerados durante 24 horas con respecto a los valores en fresco (Toyonaga et al.

2010). De hecho, se han conseguido concepciones con semen conservado a 4°C durante 3 días y también se ha demostrado que puede desarrollarse la fase de blastocisto tras la fertilización *in vitro* de oocitos de gato con espermatozoides conservados a 4°C durante 14 días (Harris y al. 2001). A la vista de los trabajos publicados se aprecia que el espermatozoides de gato es menos susceptible al shock frío que el de otras especies (Glover et al. 1985, 1987). Según Siemieniuch y Dubiel (2006), es preferible la refrigeración a la congelación del espermatozoides de gato si se pretende utilizar estas muestras en los 2-3 días siguientes, pues los espermatozoides pierden menos calidad que con el proceso de congelado-descongelado.

Para la refrigeración, algunos autores utilizaron Tris + 20% yema de huevo + 1% Orvus ES Paste tanto para refrigerar como para congelar, con buenos resultados (Siemieniuch and Dubiel 2006; Toyonaga et al. 2010). Otro diluyente, empleado sobre todo en felinos salvajes, es el Ham's F10 suplementado con un 5% de suero fetal bovino o incluso con un 5% de suero del propio animal inactivado por calor (Wood et al. 1993; Pukazhenthii et al. 2002). Hay autores que usan este diluyente sólo para diluir el eyaculado antes de centrifugarlo, desechándolo después y añadiendo directamente otro diluyente de congelación (Wood et al. 1993).

Se ha observado que el medio PBS actúa sobre los espermatozoides de epidídimo como lo harían los fluidos de eyaculación (Axné et al. 1998), causando cambios morfológicos como la disminución del porcentaje de gota distal, hecho también observado en la rata (Cooper and Yeung 2003). Esto puede ser debido a los cambios que se producen en la osmolaridad y/o el pH (hinchamiento de la célula, con ruptura de la gota citoplásmica, doblez y enrollamiento de la cola). Tonoyaga et al. (2010) también relacionaron la pérdida de la gota citoplasmática distal con la osmolaridad del diluyente empleado e incluso con la manipulación del epidídimo.

Cuando se obtienen espermatozoides de epidídimo, es indispensable sumergir el epidídimo cortado en un medio que posibilite la salida de los espermatozoides desde su interior, mientras que en el caso de muestras eyaculadas se utiliza un diluyente específico, pero sin añadirle aún el crioprotector. Normalmente se diluye en proporción 1:1 (Pukazhenthii et al. 2002; Baran et al. 2004) ó 1:3 (Wood et al. 1993).

Las muestras son centrifugadas utilizando diversos protocolos: 300g durante 8 min (Pukazhenthii et al. 2002) ó 10 min (Tebet et al. 2006), 700g durante 6 min (Axné et al. 2004) ó 10 min (Siemieniuch and Dubiel 2006), 600g durante 6 min (Thuwanut et al. 2008), 900g durante 8 min (Lengwinat and Blottner 1994) e incluso a 1200g durante 5 min (Toyonaga et al. 2010).

Para intentar que los cambios osmóticos ocurran lo más gradualmente posible, es aconsejable añadir el diluyente gota a gota, a intervalos de varios segundos. El diluyente debe estar a temperatura ambiente, al igual que la muestra (Thuwanut et al. 2008), por lo que se debe dejar reposar 5-10 min a 25°C para la adaptación del diluyente o equilibración (Wood et al. 1993).

La **velocidad de refrigeración** también influye en la supervivencia espermática. Pukazhenti et al. (1999) estudió la sensibilidad de los espermatozoides felinos

frente a varias velocidades de refrigeración y concluyeron que la refrigeración rápida era más perjudicial para la integridad morfológica de los espermatozoides de gato. Mientras que velocidades de refrigeración de 9°C/min se mostraban resultados similares a la velocidad usada por Pope et al. (1991) (descenso de 10°C/min), los resultados mejoraban cuando se mantenía una velocidad de refrigeración de 3.85°C/min (Zambelli 1994). Esta velocidad de enfriamiento puede ser más lenta, de 0.5°C/min, con muy buenos resultados (Siemieniuch and Dubiel 2006) o incluso 0.4°C/min (Axnér et al. 2004), aunque existen algunos autores describen un enfriamiento de las muestras hasta llegar a 4°C en tan sólo 30 min (Wood et al. 1993). A la hora de refrigerar se puede utilizar un contenedor del tipo del Equitainer®, hasta que se alcance una temperatura de 4 a 5°C (Baran et al. 2004, Zambelli et al. 2004).

En cuanto a la calidad obtenida, Harris et al (2001) comparó los efectos de la refrigeración tras 5 días de almacenamiento tanto en espermatozoides eyaculados como en epididimarios, consiguiendo mejores resultados de motilidad en semen epididimario diluido en el buffer TEST-yema de huevo comparado con el semen eyaculado (69.0 vs 51.4%), sin diferencias significativas en su viabilidad (91.0 vs 88.5%). En cuanto a la calidad del acrosoma y de la membrana citoplasmática, Axnér et al. (2004) observó que el proceso de refrigeración apenas alteraba los valores iniciales, al contrario que la congelación posterior.

4.4.2. CONGELACIÓN

La técnica de congelación ha sido empleada exitosamente en el gato doméstico tanto con semen eyaculado (Platz et al. 1976, 1978; Pope et al. 1991; Tsutsui et al. 2000; Zambelli et al. 2002) como en semen epididimario (Hay and Goodrowe 1993; Lewngwinat and Blottner 1994; Stachecki et al. 1994). Y en felinos salvajes también se han realizado congelación de esperma eyaculado (Howard et al. 1986, 1997, 1999; Byers et al. 1989; Donoghue et al. 1992; Swanson et al. 1996a, 1996b) y epididimario (Nelson et al. 1999; Bartels et al. 2000). Las pruebas de viabilidad de estas muestras congeladas han sido utilizadas para corroborar su capacidad fecundante tanto *in vitro* (Hay and Goodrowe 1993) como *in vivo* (Tsutsui et al. 2003). Sin embargo, los resultados de congelación-descongelación de esperma felino son muy heterogéneos e inciertos, lo que se convierte en un importante hándicap a la hora de plantear su uso en individuos de alto valor genético.

La criopreservación del semen eyaculado de gato fue descrita por primera vez por Platz et al. (1976) usando un diluyente compuesto por 20% de yema de huevo, 11% de lactosa y un 4% de glicerol en agua desionizada. Posteriormente, esta técnica se ha desarrollado con diferentes diluyentes y protocolos con éxito, tanto en el gato doméstico como en felinos salvajes.

4.4.2.1. Diluyentes de congelación

Los diluyentes para congelar espermatozoides de gato son similares a los mencionados para la refrigeración, pero acompañados de **agentes crioprotectores**. Los más comúnmente usados son el **glicerol** y el dimetilsulfóxido, y algo menos el

etilenglicol y propilenglicol. Sin duda, el más ampliamente usado es el glicerol. Este componente, sin embargo, tiene un grado de toxicidad que varía según la especie, por lo que hay que ajustar su porcentaje para equilibrar los efectos negativos con el grado de crioprotección que confiere (Zambelli et al. 1994 y 2002 ; Nelson et al. 1999). Hay autores que lo añaden a la primera dilución a una temperatura de 4°C (Pope et al. 1991) y otros que lo hacen a temperatura ambiente alegando una mejor penetración en el espermatozoide durante el tiempo de refrigeración (Zambelli et al. 2002). En los espermatozoides de gato, debido a su especial sensibilidad (Nelson et al. 1999), se añade glicerol en un porcentaje bajo, normalmente entre un 3% a un 8%. Con el objetivo de proteger el acrosoma y prevenir la pseudocapacitación, sobre todo en espermatozoides epididimarios de gato, se añaden detergentes como **dodecil sulfato sódico (SDS)**, comercializado como pasta Orvus ES 1%, tanto para congelación como en refrigeración (Siemieniuch and Dubiel 2006) o pasta Equex STM al 0.5%, recomendados para diluyentes que contienen yema de huevo, ya que modifican la disposición de los fosfolípidos y mejoran así la viabilidad, motilidad, integridad acrosómica (previniendo también la capacitación, lo que se refleja en la ausencia de hiperactivación a la descongelación) y longevidad de los espermatozoides congelados en el caso del perro (Rota et al. 1997; Peña and Linde-Forsberg 2000) y otras especies (Arriola and Foote 1987; Nakatsukasa et al. 2001). En espermatozoides epididimarios de gato se aprecia un efecto protector del acrosoma, pero disminuye la longevidad espermática durante la incubación a 38°C tras la descongelación (Axnér 2004). Así, aunque la pasta SDS ejerce un efecto crioprotector sobre el acrosoma de espermatozoides epididimarios de gato, tiene en cambio un efecto negativo sobre las membranas y la motilidad durante la incubación, a diferencia del perro. Cuando los espermatozoides de perro se congelan con SDS, no se observa hiperactivación tras la descongelación, cosa que sí ocurre en ausencia de este crioprotector (Peña and Linde-Forsberg 2000). Considerando los efectos del SDS sobre otras especies, se puede deducir, en el caso del gato, que la reducción de la longevidad que provoca puede ser debida al efecto tóxico sobre las membranas durante la incubación, aunque esto puede mejorarse si se incuban los espermatozoides a 20°C (Mizutani et al. 2010). De esto no se concluye que los espermatozoides tratados con SDS no sean aptos para la IA, pues una vez depositados en el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides abandonan el diluyente y sus efectos tóxicos. Por otra parte, teniendo en cuenta la gran vulnerabilidad de los acrosomas felinos frente a la congelación (Pope et al. 1991; Hay and Goodrowe 1993; Wood et al. 1993; Lengwinat and Blottner 1994), se hace necesario el papel protector del Equex a pesar de todo.

La inclusión de **monosacáridos** (glucosa, fructosa y galactosa) parece ser la manera más fácil de proveer un substrato de energía exógena. Se ha estudiado que si bien el espermatozoide necesita una fuente de azúcar para llevar a cabo su metabolismo, el plasma seminal carece de monosacáridos (Johnston et al., 1988). Hasta que el espermatozoide no está en el tracto genital femenino, no se encuentra con los azúcares, lo que favorece la motilidad necesaria para llevar a cabo la fecundación.

Estimulantes de la motilidad como la cafeína, pentoxifilina y 2'-desoxiadenosina tienen efectos dosis-dependiente y producen un estado de hiperactivación en los espermatozoides de gato descongelados, reduciendo el descenso de motilidad en un 10% comparado con el valor de precongelación (Stachecki et al. 1994) y manteniendo esta motilidad hasta 6 horas tras la descongelación a 37°C (Stachecki et al. 1994, 1995). Estos compuestos provocan un incremento en los niveles de AMPc que están directamente asociados con la inducción a la capacitación.

Como ya se mencionó, la peroxidación lipídica puede inducir daños directos en la membrana o cambios en su estructura o fluidificación causando una pérdida de motilidad y viabilidad rápida e irreversible. Este hecho ocurre en espermatozoides que, tras haber sido refrigerados, se someten al proceso de congelación y descongelación (Storey 1997; Medeiros et al. 2002). Para contrarrestar la acumulación de radicales de oxígeno reactivos durante la conservación se evaluó el efecto de añadir **antioxidantes** como la taurina (25 o 50 mM) al diluyente usado para congelar semen de epidídimo (Luvoni et al. 2002). La taurina, un β -aminoácido sulfurado, se presenta en el tracto reproductivo de algunos mamíferos (Meizel et al. 1980) y se ha encontrado en altas concentraciones en espermatozoides, plasma seminal y fluido epididimario de gato doméstico (Buff et al. 2001). Los resultados indican que tras la descongelación, la motilidad mejora en presencia de taurina (25 mM: $52.2 \pm 5.9\%$; 50 mM: $53.0 \pm 3.7\%$) comparado con su ausencia ($23.8 \pm 4.6\%$), sin diferencias entre las dos concentraciones de taurina añadidas (50 mM y 25 mM). Aunque este aumento de motilidad puede ser debido al estado de hiperactivación que produce la taurina, con el consecuente estado de pseudocapacitación (Meizel et al. 1980), se ha observado un efecto protector del acrosoma cuando se incluye en el diluyente (Luvoni et al. 2002). Otros antioxidantes probados en semen epididimario de gato son la cisteína y la vitamina E, los cuales han mejorado el porcentaje de motilidad total, motilidad progresiva, integridad de membrana y de ADN (Thuwanut et al. 2008).

4.4.2.2. Proceso de congelación

Para congelar una muestra de esperma se continúan los pasos seguidos para el proceso de refrigeración anteriormente explicado, pero se añade un volumen igual de diluyente de congelación cuando la muestra alcanza los 4°C. A continuación, se deja un tiempo para que los espermatozoides se adapten a los cambios osmóticos, lo que se denomina equilibración, y que comprende desde 30 minutos (Baran et al. 2004) hasta 60-75 min (Linde-Forsberg 2006; Mizutani et al. 2010), o incluso hasta las 3 h (Lengwinat and Blottner 1994; Schäfer and Holzmann 2000). La equilibración se puede realizar antes o después del envasado en pajuelas.

El envasado suele realizarse en pajuelas de 0.25 ml, de forma manual aspirando a través de la pajuela y eliminando un poco del volumen mediante el peine de envasado para permitir la posterior expansión del volumen en el momento de la congelación. Puede sellarse con alcohol polivinílico, bolas de plástico o por ultrasonidos, y deben estar perfectamente identificadas. Algunos autores utilizan pajuelas de 0.5 ml (Schäfer and Holzmann 2000) y otros dividen las pajuelas de

0.25 ml en secciones de 0.35 ml (Wood et al. 1993) e incluso de 0.06 ml (Axnér et al. 2004).

En el caso de muestras de epidídimo se pueden obtener pajuelas con una concentración de 0.5×10^6 spz/ml (Toyonaga et al. 2010), 25×10^6 spz/ml (Axnér et al. 2004) e incluso 50×10^6 spz/ml (Chatdarong et al. 2009) según el grado de dilución aplicado.

Para la congelación en NL las pajuelas se colocan en un soporte unos 4 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido (a una temperatura aproximada de -130°C) y se mantienen así durante 7-20 min (Baran et al. 2004, Siemieniuch and Dubiel 2006; Toyonaga et al. 2010; Schäfer and Holzmann 2000; Tebet et al. 2006). Por otro lado, Rota et al. (1997) describen un método para la congelación de esperma de perro, que consiste en introducir las pajuelas en un globelette y éste en un portaglobelette y bajarlo en tres pasos en un tanque de nitrógeno líquido Apollo SX-18 (MVE Cryogenetics®, New Prague, MN, USA). Wood et al. (1993) usaron una técnica similar en esperma de gato, manteniendo las pajuelas a una altura del vapor con una temperatura de -10°C durante 1 min y luego calcularon una velocidad de enfriamiento de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -100°C antes de sumergir la muestra en el NL. Otro método descrito en gato consiste en disminuir previamente la temperatura con un congelador programado a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde 5°C a -80°C , antes de la inmersión en nitrógeno líquido (Pope et al. 1991) o en varios pasos (desde 4°C a -25°C a velocidad de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y hasta los -100°C a velocidad de $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$) antes de sumergir las muestras directamente en NL (Lengwinat and Blottner 1994).

En el caso de utilizar **pajuelas**, tras los pasos previamente descritos, se sumergen directamente en el NL e introducen en los canister previamente identificados que se colocarán dentro de la bombona de NL (Pope et al. 1991; Axnér et al. 2004).

La **técnica de los pellets**, actualmente no es muy utilizada. Consiste en introducir mediante una pipeta, gotas de semen ($30 \mu\text{l}$) refrigerado a 4°C en huecos de 3mm de diámetro realizados en un bloque de nieve carbónica. Tras un intervalo de 3 min en vapor de NL, el bloque se invierte, dejando caer los pellets centro del NL (Platz et al. 1978; Wood et al. 1993; Swanson et al. 1996).

4.4.2.3. Proceso de descongelación

La descongelación del semen es un punto también crítico. Si la congelación puede lesionar a los espermatozoides, el proceso de descongelación es muy similar, pero a la inversa, por lo que también puede ser fatal para la viabilidad espermática. Sin embargo, no existen medios técnicos para medir el grado y proporción de las lesiones que se les puede inferir a los espermatozoides a causa de ambos procesos (congelado y descongelado) por separado.

Los métodos de descongelación varían ampliamente. Las pajuelas se pueden descongelar a 37°C durante 30 seg (Platz et al. 1978; Word et al. 1993; Tsutsui et al. 2000; Baran and al. 2004), durante 15 seg (Axnér et al. 2004) e incluso en sólo 10 seg (Siemieniuch and Dubiel 2006). Algunos autores (Wood et al. 1993; Pukazhenthii et al. 2002) las mantienen a temperatura ambiente durante 10 seg y

seguidamente las sumergen en un baño a 37°C durante 30 seg, para después vaciarlas en un tubo Eppendorf y añadirle 150-200 µl de diluyente a esa temperatura. Otros autores utilizan períodos más cortos con temperaturas más altas para reducir el tiempo de presencia de cristales de hielo dentro de la célula, pero existe el inconveniente de que hay que ser muy preciso en el tiempo para evitar "matar" al espermatozoide por calor. Así, se describe un descongelación a 40°C durante 10 seg y luego pasar a 38°C (Schäfer and Holzmann 2000), a 70°C durante 6 seg (Thuwanut et al. 2008; Chatdarong et al. 2009) ó a 42°C durante 15 seg (Tebet et al. 2006).

Respecto a los pellets, éstos se descongelan rápidamente por inmersión en una solución salina al 0.9% calentada a 37°C (Howard et al. 1986) o bien en 300 µl de Ham's F10 a 37°C durante 1 min y luego a temperatura ambiente (Wood et al. 1993). Otra opción es dejarlos descongelar a temperatura ambiente durante 10 seg y luego añadir 150-200 µl de diluyente a 37°C, produciéndose la descongelación a los 30 seg (Pukazhenthhi et al. 2002).

Los medios empleados para descongelación tienen la misma composición que los de congelación, a excepción de los crioprotectores, que se encuentran ausentes. Se ha observado que la motilidad del esperma de gato es muy sensible a los cambios de osmolalidad, porque se afecta a la integridad de membrana, aunque la eliminación del crioprotector en múltiples pasos con una solución isotónica minimiza la pérdida de motilidad y disrupción de membrana (Pukazhenthhi et al. 2002).

Ya que la motilidad y la integridad acrosomal se ven muy afectadas por el proceso de congelación-descongelación, para obtener una fracción con alta calidad en motilidad a partir de una muestra descongelada se puede usar la **técnica de swim-up**, basada en el hecho de que los espermatozoides con un mayor grado de motilidad se disponen en la superficie del medio, donde pueden ser recogidos selectivamente (Lengwinat and Blottner 1994; Howard et al. 1990). Otros métodos selectivos más específicos son el **centrifugado con coloides de sílice**, muy efectivos para eliminar las gotas citoplasmáticas proximales y seleccionar sólo los espermatozoides mótils, con membrana y ADN intactos (Chatdarong et al. 2010).

4.4.3. DAÑOS EN EL ESPERMATOZOIDE PRODUCIDOS DURANTE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

La criopreservación requiere de una equilibración de las células en concentraciones relativamente altas de crioprotector (CPA) para minimizar la formación de cristales de hielo dentro de la célula (Gao et al. 1997). Durante el típico protocolo de criopreservación, los espermatozoides se exponen a soluciones hipertónicas con respecto a la permeabilidad de los CPA e isotónicas con respecto a las sales impermeables. En respuesta a estos cambios osmóticos, la célula se encoge inicialmente debido a la salida de agua intracelular y luego se hincha en presencia de un medio isotónico volviendo a su volumen inicial, conteniendo ya en su interior el agua más el crioprotector. Tras la descongelación es necesario eliminar

el crioprotector antes de usar estas células para la IA. Bajo estas circunstancias, las células con altas concentraciones en su interior de CPA son expuestas a una solución cercana a la isotonicidad, dando como resultado un rápido incremento del volumen celular y la salida del CPA (Gao et al. 1995, 1997). Este estrés osmótico puede resultar extremadamente dañino e incluso letal para los espermatozoides. Aunque las membranas plasmáticas de los espermatozoides felinos no suelen resultar dañadas en una única exposición a una solución hipertónica de glicerol o dimetilsulfóxido, un retorno rápido a la isotonicidad (con agua desionizada o Ham's F10) sí que causa un gran daño osmolar-dependiente en la membrana espermática (ej., a mayor osmolaridad mayor rotura de membrana) (Pukazhenthhi et al. 2000).

Existe una teoría que explica este daño: en el caso de los crioprotectores que no penetran en la membrana, éstos dificultan la recuperación del aspecto normal tras el arrugamiento que sufre al exponerse a soluciones hipertónicas (Steponkus et al. 1979); por el contrario, en presencia de crioprotectores permeables, la célula se arruga menos porque en un corto intervalo de tiempo, el crioprotector penetra en la célula y ésta recupera su volumen inicial (Gao et al. 1997). Gao et al (1995) examinó los efectos osmóticos del glicerol sobre espermatozoides humanos, observando los cambios en el volumen celular, y describió los beneficios de añadir y diluir un crioprotector permeable en varios pasos durante el proceso de congelación. Descubrió que la adición de glicerol en tres o más pasos y su posterior eliminación en ocho o más pasos, mejoraba la integridad y motilidad espermática. Pukazhenthhi et al. (2002), comprobó que era más importante eliminar el glicerol en una solución con molaridad parecida que en con volumen parecido (ej., usando la solución Ham's F10 o solución salina al 0.9%) en varios pasos, dando muy buenos resultados en gato doméstico y pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), aunque los resultados no fueron tan buenos con espermatozoides de serval (*Leptailurus serval*).

Otra de las consecuencias de la desestabilización de las membranas debido al frío es una reacción prematura del acrosoma, lo cual acorta la vida útil del espermatozoide y reduce su fertilidad. De hecho, los espermatozoides congelados pueden ser considerados como células que están en un estadio semejante al de un espermatozoide parcialmente capacitado. Sus membranas han sufrido cambios de fluidificación similares a los de la capacitación, de manera que son permeables a los iones de calcio que promueven la capacitación y la reacción acrosomal. Su viabilidad es entonces limitada, ya que los espermatozoides capacitados no tienen una vida muy prolongada ya que normalmente se activan el tiempo justo del encuentro con el oocito. Además, se ha descrito una falsa reacción acrosomal en espermatozoides descongelados, cuyos cambios están asociados a daños irreversibles de membrana (Meizel 1978; Bedford 1979), aunque la motilidad no se vea afectada (Pukazhenthhi et al. 1999). Se ha observado que una alta proporción de espermatozoides epididimarios de gato descongelados muestran el patrón de reacción acrosomal, comparados con semen fresco o diluido. Esta proporción de espermatozoides con acrosoma reactivo en muestras descongeladas indica que muchas células sufren daños durante el proceso y, por tanto, su funcionamiento

está comprometido. En resumen, los espermatozoides deben sufrir la capacitación y la reacción acrosomal para penetrar el oocito y esto es posible únicamente si la integridad acrosomal no se ha alterado durante el proceso de conservación.

El metabolismo de la célula espermática también se ve afectado por el proceso de criopreservación y descongelación, lo que se traduce en una menor funcionalidad de las mitocondrias, traducido en una menor producción de lactato y en un descenso de la motilidad. Sin embargo, se ha observado que existen subpoblaciones de espermatozoides de gato que no se ven afectadas, al contrario de lo que ocurre en otros felinos como el guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Terrell et al., 2012).

Wood et al. (1993) compararon la capacidad de penetración de los espermatozoides de gatos normospérmicos (N) vs teratospérmicos (T) en la zona pelúcida (ZP) y espacio perivitelino (PV) en oocitos homólogos observando tanto semen fresco como descongelado, y aplicando dos técnicas de congelación (pajuelas vs pellets). Los resultados que obtuvieron corroboran que existe un detrimento en la capacidad fecundante de los espermatozoides que han sufrido el proceso de criopreservación, hecho más acusado si se trataba de gatos teratospérmicos. Por el contrario, no encontraron ninguna diferencia en cuanto a la técnica utilizada.

En cuanto a la morfología del espermatozoide, al descender la temperatura, se observa una mayor aparición de defectos morfológicos, sobre todo los que afectan a la cola (colas dobladas y enrolladas (Villaverde et al. 2006). De esta forma, se aprecia un aumento del porcentaje de anomalías morfológicas -de 73.4% a 58.7% según Siemieniuch and Dubiel (2006) o del 76% al 64% según Hay and Groowe (1993) en esperma de epidídimo-, un descenso de motilidad (20-50%) y un incremento de las anomalías acrosómicas del 15 al 30% (Pope et al. 1991; Zambelli et al. 2002; Baran et al. 2004). Wood et al. (1993) observó que, si bien las muestras de gatos teratospérmicos parten de un porcentaje mayor de anomalías acrosomales en semen fresco, a la descongelación este valor desciende en la misma proporción que en muestras de gatos normospérmicos.

Pero quizás el parámetro que se ve más afectado es sin duda la motilidad, sufriendo un marcado descenso conforme transcurre el tiempo de incubación. Se describe que tras 6 horas de incubación de semen fresco, la motilidad se redujo en un 12.5%, mientras que en pellets descongelados la reducción fue de 33.0%, y del 28.8% en pajuelas (Wood et al. 1993). Por esto, algunos autores como Baran et al. (2004), seleccionan las muestras de electroeyaculados con una motilidad mínima de 75% y un máximo de 25% de anomalías morfológicas para congelar.

En resumen, el porcentaje de espermatozoides felinos que superan con éxito el proceso de congelación-descongelación con las técnicas y diluyentes hasta ahora utilizados sigue siendo insatisfactorio para conseguir resultados similares a los obtenidos con otras especies.

		Vigor	Motilidad (%)	Vitalidad (SYBR) (%)	Integridad membrana (%)	Morfología (%)	Integridad acrosomal (%)	DNA intacto (%)
Goodrowe and Hay. 1993 (Media ± SE)	Fresco	2.9 ± 0.1	71.2 ± 2.0			50.7 ± 3.2		
Axnér et al. 2004 (Media ± SD)	Fresco	4.5 ± 0.7	59.0 ± 13.7	83.9 ± 15.5		50.6 ± 13.4	66.7 ± 15.2	
	Congelado	4.3 ± 0.5	60.5 ± 19.2	51.7 ± 17.2			34.6 ± 22.4	
Kashiwasaki et al. 2005 (Media ± SE)	Fresco		80.8 ± 2.0					
	Congelado		31.8 ± 2.4	32.2 ± 4.2				
Villaverde et al. 2006 (Media ± SD)	Fresco	4.3 ± 0.5	83.7 ± 7.6			52.7 ± 5.2		
Tebet et al. 2006 (Media ± SD)	Fresco	4.5 ± 0.7	77.5 ± 8.2		71.7 ± 18.8	23.1 ± 13.9		
	Congelado	3.4 ± 0.7	59.0 ± 19.1		53.0 ± 14.7	31.7 ± 12.8		
Hermansson and Axnér. 2007 (Media ± SE)	Fresco		52.5 ± 8.9	59.7 ± 10.3			50.2 ± 18.8	
Siemieniuch and Dubiel. 2007 (Media ± SD)	Fresco		77.9 ± 6.8	82.2 ± 8.0		72.7 ± 8.8		
	Congelado		57.5 ± 6.4	62.0 ± 6.9		58.7 ± 3.8		
Thuwanut et al. 2008 (Media ± SD)	Fresco	4.4 ± 0.2	80.0 ± 4.6	78.7 ± 7.9			47.9 ± 6.1	
	Congelado	3.6 ± 0.6	59.4 ± 11.5	59.7 ± 10.6			47.2 ± 7.6	86.7 ± 5.2
Filliers et al. 2008 (Media ± SD)	Fresco		79.9 ± 14.4	73.4 ± 11.8		89.3 ± 4.8	78.0 ± 7.3	96.0 ± 3.4
Cocchia et al. 2009 (Media ± SD)	Fresco		54.7 ± 11.3	74.3 ± 8.6		56.8 ± 28.6		
	Congelado		32.0 ± 13.1	45.2 ± 9.4		47.2 ± 9.7		
Chatdarong et al. 2010 (Media ± SD)	Fresco		65.5 ± 7.6	60.5 ± 10.4			60.0 ± 13.2	95.2 ± 2.6
	Fresco*		77.0 ± 5.4	74.4 ± 11.9			49.8 ± 12.1	95.3 ± 2.9
Toyonaga et al. 2010 (Media ± SE)	Fresco		80.0 ± 4.6	86.8 ± 3.1		96.3 ± 2.1		
	Congelado		38.0 ± 2.2	54.8 ± 5.3		92.9 ± 1.6		
Jiménez et al. 2011 (Media ± SD)	Fresco	4.4 ± 0.5	66.7 ± 15.1	83.7 ± 7.5	81.7 ± 5.9	50.0 ± 5.6	58.3 ± 5.5	
	Congelado	4.3 ± 0.8	38.3 ± 17.2	84.8 ± 7.5	64.8 ± 6.8	43.2 ± 11.3	44.7 ± 5.6	

*Centrifugación en una única capa a través de coloides.

Tabla 1. Valores de calidad espermática tras la recogida (frescas) y congeladas-descongeladas en muestras de espermia epididimario obtenido en gatos.

4.4.4. VITRIFICACIÓN

La vitrificación es una alternativa a los métodos convencionales de criopreservación. Es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. Esta técnica de congelación ultrarrápida se basa en el contacto directo entre la solución de vitrificación (que contiene los agentes crioprotectores con las células) y el nitrógeno líquido. Desde el punto de vista físico, se produce la solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a cristalizar, debido a un enorme incremento de la viscosidad, manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación. La solución de vitrificación utilizada posee crioprotectores en alta concentración que no cristalizan al ser enfriados, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de allí su nombre (Rall and Fahy 1985).

Recientemente, se ha descrito un método de criopreservación ultrarrápida (vitrificación) que consiste en la exposición directa de la célula a nitrógeno líquido o a sus vapores, evitando así la cristalización del agua intracelular. Uno de los principios en que se basa este método es el enfriamiento ultrarrápido de las células inmersas en una solución que lleva incorporada crioprotectores no permeables en alta concentración, elevando así la viscosidad de los líquidos intra y extracelulares, y deteniendo finalmente todos los procesos celulares (Isachenko et al. 2003).

Por debajo de temperaturas de -130°C cualquier líquido que permanezca sin congelar entre los cristales de hielo pasa a una transición de vidrio. Las moléculas se pegan unas a otras mediante uniones de hidrógeno débiles. En este estado, las moléculas, en vez de moverse libremente, simplemente vibran en un lugar. Esto hace que se paralice cualquier reacción química, preservando así la vida.

En contraste a los protocolos de congelación lenta, durante la vitrificación toda la solución permanece sin cambiar, el agua no se precipita y no se forman cristales de hielo. Es útil distinguir entre vitrificación reversible y vitrificación morfológica. Mientras que la vitrificación reversible es aquella en la que el material se recupera del proceso de vitrificación en un estado viable, en la vitrificación morfológica hay una buena preservación estructural pero las enzimas u otras biomoléculas importantes se dañan por el procedimiento.

El hecho de que la vitrificación sea el resultado de altas tasas de enfriamientos con altas concentraciones de crioprotector resulta problemático biológicamente hablando y técnicamente difícil. Por tanto, la velocidad de enfriamiento y calentamiento y la concentración de crioprotector son las variables claves en la vitrificación. Debido a las limitaciones que ambas variables imponen (límite técnico en la velocidad y límite de toxicidad del crioprotector), debe existir un equilibrio entre ambas variables para garantizar la eliminación de formación de cristales tanto intracelulares como extracelulares.

La estrategia de vitrificación es básicamente diferente a la estrategia de congelación tradicional. Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto

tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células. Por el contrario, la vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuyen los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por el rango de temperatura de mayor peligro entre +15 a -5 °C (Dobrinsky, 1996, Martino et al., 1996) (Figura 2). Este aspecto es muy importante para las estructuras sensibles, especialmente las que tienen alto contenido en lípidos, como es el caso de los espermatozoides.

La vitrificación como técnica de criopreservación de espermatozoides presenta varias ventajas con respecto a la congelación lenta o tradicional, entre éstas se encuentran aquéllas relacionadas con indicadores de funcionalidad espermática, pues como se ha constatado, indicadores como viabilidad, movilidad, integridad del material genético, potencial mitocondrial e integridad del acrosoma presentan resultados favorables. A esto se deben agregar otros factores que lo hacen más conveniente ya que, el sumergir a las células directamente en nitrógeno líquido es mucho más rápido, de menor costo y un procedimiento relativamente fácil de realizar. No obstante, es necesario seguir perfeccionando los protocolos para disminuir el daño espermático, posiblemente con el uso de antioxidantes para modular el incremento de ROS que se generan en el proceso de congelación, y así lograr una célula con indicadores similares a aquéllos presentados por espermatozoides sin vitrificar.

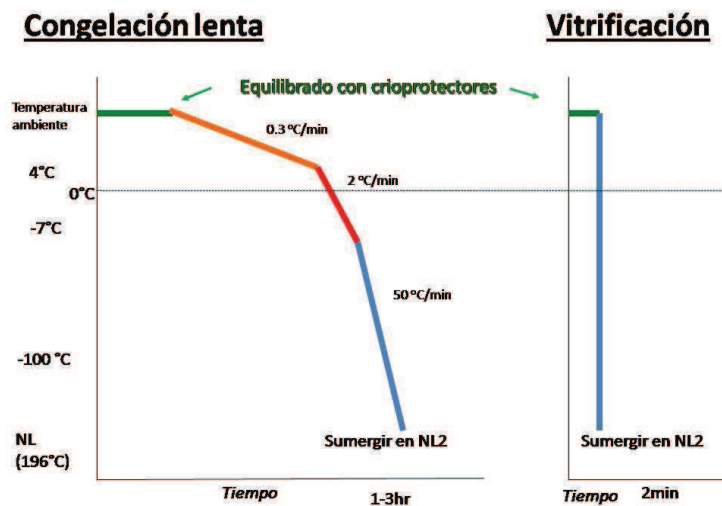


Figura 2. Comparación del procedimiento de congelación lenta y vitrificación para la conservación de espermatozoides felinos.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod*, 2003; 9: 331-345.
- Álvarez JG, Storey BT. Taurine, hipotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*, 1983; 29: 548-55.
- Amann RP, Pickett BW. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, 1987; 7: 145-173.
- Andrews JC, Howard JG, Bavister BD, Wildt DE. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol Repr Devel*, 1992; 31: 200-207.
- Arrighi S, Romanello MG, Domeneghini C. Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*). *Arch Biol*, 1986; 97: 7-24.
- Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci.*, 1987; 70: 1664-1670.
- Axnér E, Ström-Holst B, Linde-Forsberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 1998; 50: 973-9.
- Axnér E, Linde-Forsberg C. Mating and artificial insemination. In: Simpson G, England, Ed. Harvey, Small animal reproduction and neonatology, 1998; 105-111.
- Axnér E, Linde-Forsberg C, Einarsson S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 1999; 52: 767-778.
- Axnér E, Malmqvist M, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. Regional histology of the ductus epididymidis in the domestic cat. *J Reproduction and Development*, 1999; 2: 45.
- Axnér E. Sperm morphology and maturation in the domestic cat with special reference to the morphology and function of the epididymis. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2000.
- Axnér E, Linde-Forsberg C. Semen collection and assessment and artificial insemination in the cat. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, ed. www.ivis.org, 2003, doc n° A1228.0702.
- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM past and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2004; 84: 179-91.
- Axnér E. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 2006; 66: 14-24.
- Axnér E, Linde-Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a restropective study. *Reprod Dom Animal*, 2007; 42: 282-291.
- Barán A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K. Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. *Turk J Vet Anim Sci*, 2004; 28: 545-52.
- Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, 1989.

- Bartels P, Lubbe K, Kilian I, Friedman Y, Van Dic G, Mortimer D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*, 2000; 53: 325.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl*, 2003; 24: 621-628.
- Beatty RA, Stewart DL, Spooner RL, Hancock JL. Evaluation by the heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on the fertility of individual bull semen. *J Reprod Fertil*, 1976; 47: 377-379.
- Bedford JM. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*, 1970; 2: 128-158.
- Benoit J. Recherches anatomiques, cytologiques et istophysiologiques, sur les voies excrétoires du testicule chez les mammifères. *Archs Anat Histol Embryol*, 1976; 5:173-412.
- Bertrand M. Psiquismo et infertilité dans l'espece canine. *Pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 1989; 24 :243-251.
- Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DWC, Zwaal, RFA. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Acta Biochim Biophys*, 1999; 1439: 317-333.
- Blash S, Melican D, Gavin W. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 2000; 54: 899-905.
- Blottner S, Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim*, 2007; 42: 536-540.
- Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 2001; 56: 955-967.
- Bowen RA. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from ductus deferens. *Biol Reprod*, 1977;17:144-147.
- Buff S, Donzé A, Guérin P, Guillaud J, Fonthonne A, Ménézo Y. Taurien and hipotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001; 57: 93-95.
- Buff S, Lambert V, Marchal T, Guérin P. Isolation, culture and characteristics of epididymal epithelial cells from adult cats. *Theriogenology*, 2005; 64:1603-1618.
- Byers AP, Hunter AG, Seal US, Binczik GA, Graham EF, Reindl NJ, Tilson RL. In-vitro induction of capacitation of fresh and frozen spermatozoa of the Siberian tiger. *J Reprod Fertil*, 1989; 86: 599-607.
- Chatdarong K, Ponglowhapan S, Manee-in S, Pongphet K. The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. *Theriogenology*, 2006; 66: 1615-1617.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Suksamai P, Patanatiradaj S, Sangwornrachasup A. Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod Dom Anim*, 2009; 44: 377-380.
- Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B. Use of peanut alutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 1996; 17: 674-682.
- Christiansen IJ. Reprodução no cão e no gato. *Editorial Manole*, 1986; 363.

- Colby ED. Suppression-induction of estrus in cats. In: Current veterinary therapy in theriogenology, Saunders, 1980; 861-864.
- Collu R, Gibb W, Ducharme JR. Effects of stress on the gonadal function. J Endocrinol Invest, 1984; 7: 529-537.
- Concannon P, Hodgson D and Lein D. Refelex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. Biol Reprod, 1980; 23: 111-117.
- Cooper JB. A description of parturition in the domestic cat. J Comp Psych, 1944; 37: 71-79.
- Cooper TG. Epididymis. Encyclopedia of reproduction, vol. 2. San Diego, Academic Press, 1998: 1-17.
- Cooper TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. Microsc Res Techn, 2003; 61: 28-38.
- Courot M. Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. Progress in reproductive biology, vol. 8, epididymis and fertility: biology and pathology. Basle, Switzerland, 1981: 67-79
- Crabo B. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. Acta Vet Scand 1965; 6 (Suppl 5).
- Crabo BG, Hunter AG. Sperm maturation and epididymal function. Control of male Fertility, 1975: 2-23.
- Curry MR, Millar JD, Watson PF. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. Biol Reprod, 1994: 51.
- Da Paz RCR, Züge RM, Morato RG, Barnabe RC, Barnabe VH. Penetration assay of frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm in heterologous oocytes. Theriogenology, 2002; 57: 588.
- Damiani P, Gómez M, Cole A, Pope A, Aguilar E, Hammond B, Nel L, Cortez C., Vaccaro J, Sarrat E, Markey E and Dresser B. The production of intracytoplasmic sperm injection lion (*Panthera leo*) embryos using spermatozoa collected by percutaneous epididymal sperm aspiration. Reprod Fert Dey, 2004; 16: 223-224.
- Davidson AP. Infertility in the queen. In: Current veterinary therapy, 8th edition, Philadelphia, Saunders; 2000; 929-931.
- Donoghue AM, Howard JG, Byers AP, Goodrowe KL, Bush M, Blumer E, Lukas J, Stover J, Snodgrass K, Wildt DE. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). Biol Reprod, 1992; 46: 1047-1056.
- Dooley MP, Murase K, Pineda MH. An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat. Theriogenology, 1983; 20: 297.
- Dooley MP, Pineda MH. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. Am J Vet Res, 1986; 47: 286-292.
- Dooley MP, Pineda MH, Hopper JG, Hsu WH. Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina and matting. Am J Vet Res, 1991; 52: 687-691.
- Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine Fert Steril, 2001; 75: 263-268.

- Durrant BS, Schuerman T, Millard S. Non invasive semen collection in the cheetah. Proc Ann Mtg Amer Assoc Zoo Ps Aquar., 1985; 564-567.
- Elcock LH, Schoning P. Age-related changes in the cat testis and epididymis. Am J Vet Res, 1984; 45:2380-2384.
- Feldman E, Nelson R. Feline reproduction . In: Canine and feline endocrinology and reproduction. 2nd ed., Philadelphia: WB Saunders, 1996; 741-768.
- França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in the domestic cats. Biol Reprod, 2003; 68: 1554-1561.
- Frenette G, Dube JY, Tremblay RR. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. Arch Androl, 1986; 16: 235-241.
- Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van Soom A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. Theriogenology, 2010; 74: 31-39.
- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Human Reprod, 1995; 10: 1109-1122.
- Gao DY, Mazur P, Critser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: arrow AM., Critser JK. Editors. Reproductive tissue banking. New York: Academic Press. 1997: 263-328.
- Garner, DL, Johnson, LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol Reprod, 1995; 53: 276–284.
- Getty R. Anatomía dos animais domésticos. Ed. Interamericana, 5ª edición, 2, 1981: 2000.
- Gilmore JA, Junving D, Jun T, Peter AT, Crister JK. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. J Reprod Fertil, 1996; 107: 87-95.
- Glover TD. Desintegrated spermatozoa from the epididymis. Nature, 1961; 190: 185-186.
- Glover TD, Nicander L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. J Reprod Fertil, 1971; 13: 39–50.
- Glover, TT, Watson, PF. The effect of buffer osmolarity on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5 °C. Theriogenology, 1985; 24: 449-456.
- Glover, TT, Watson, PF. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat spermatozoa stored at 5°C. Anim Reprod Sci, 1987; 13: 229-237.
- Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization: Journal of Reproduction and Fertility, 1989; 39: 73-90.
- Goodrowe KL, Hay M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa . Theriogenology, 1993; 40: 967-75.
- Guggisberg CA. Wild cats of the world. David and Charles, London, 1975.
- Hammerstedt R, Graham J, Nola J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl, 1990; 11: 73-88.

- Hansen LA, Clulow J, Jones RC. Perturbation of fluid reabsorption in the efferent ducts of the rat by testosterone propionate, 17β -oestradiol 3-benzoate, flutamide and tamoxifen. *Int J Androl*, 1997; 20: 265-73
- Harris RF, Pope CE, Gomez MC, Leibo SP, Dresser BL. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology*, 2001; 55: 308.
- Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of capacitation of spermatozoa from epididymis and vasa deferentia of domestic cat. *J Reprod Fertil*, 1993; 47: 297-305.
- Hermansson U. Studies of canine and feline sperm viability under different storage procedures. With special reference to chilling, freezing and the use of zona pellucida binding assays. Doctoral thesis, 2006.
- Herron MA. Feline physiology of reproduction En Burke TJ. Small animal reproduction and infertility: A clinical approach to diagnosis and treatment. Editorial Lea and Phebigier, 1986: 13-23.
- Hewitt D. Physiology and endocrinology of the male . Editorial Saunders, 2001: 592.
- Holtz W, Hassan F. Passage of spermatozoa through the epididymis in the boar Proceedings of the ninth international congress anim reprod AI, 1980; 3: 266.
- Holzmann A. Die objective Beurteilung der Spermatozoenmotilitat- Entwicklung eines neuen Untersuchungsverfahrens. *Wien. Tierärztl. Monatsschr*, 1987; 6: 193-202.
- Howard JC, Bush M, Hall LL, Wildt DE. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species on nondomestic felids. In: International Congress on Animal Reproduction and IA, 10th, Proceedings, 1984: 57-59.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D. Current therapy in theriogenology, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986; 1047-1056.
- Howard JG. In: Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy (3rd edition). Fowler RC, ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 390-399.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing . *J Androl*, 1990; 11: 204-15.
- Howard JG, Wildt DE. Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by in vitro penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Develop*, 1990; 26:163-174.
- Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Journal of Andrology*, 1997; 55: 123.
- Howard JG. In: Murray ME, Fowler RC. (eds), Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy (4th edn). Philadelphia WB Saunders, 1999: 449-457.
- Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol*, 2002; 53: 181-192.
- Isachenko E, Isachenko II, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectant: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online*, 2003; 6: 191-200.

- Jewgenow K, Neubauer K, Blottner S, Schön J, Wildt DE, Pukhazhenti BS. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. *J Andrology*, 2009; 30: 460-468.
- Jiménez E, Pérez-Marín CC, Arrebola D, Agüera E. Sperm pre-frozen assessment can be useful to estimate the impact of cooling and extenders on the epididymal semen quality in cats. *Journal of Animal Reproduction*, 2007; 84, abstract 26.
- Johnson ML, Gay VL. Luteinizing hormone in the cat. Mating-induced secretion. *Endocrinology*, 1981; 109: 247-252.
- Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 1999; 52: 1323-1341.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*, 2000; 60: 93-107.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. Ed Saunders, 2001: 592.
- Johnston SD, Osborne CA, Lipowitz AJ. Characterizations of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings of the 11th international congress anim reprod AI Dublin*, 1988: 560.
- Johnstone SD. Electroejaculation in the domestic cat. *Aust Vet Journal*, 1984; 61: 155-168.
- Kaya M. Ankara kedilerinde elektro-ejakulasyon yöntemiyle sperma alınması ve dondurulması. Ankara niv Vet Fak SaÜlök Bil Enst, 2000; Doktora Tezi, Ankara.
- Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem*, 1996; 271: 11619-11622.
- Liu Y, Baker HWG. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida : a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Human Reprod*, 1994; 9: 1694-1700.
- Lengwinat T, Blottner S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 1994; 35: 291-301.
- Leoni S. Refrigerazione del seme epididimale felino in diversi diluenti. Tesi di Laurea, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli di Milano, 1999.
- Levine N, Marsh DJ. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats *J Physiol*, 1971; 213: 557-70.
- Linde-Forsberg C. In: *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Wankle M, Gobello C. Editorial Intermédica, 2006; 14: 186.
- Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Criobiology*, 1998; 37: 219-230.
- Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, DeRossi RV, Howard J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol Reprod*, 1996; 54: 638-646.
- Lungarella G, Fonzi L, Burrini AG. Ultrastructural abnormalities in respiratory cilia and sperm tails in a patient with Kartagener's syndrome. *Ultrastruc Patho*, 1982; 3: 319-323.

- Luvoni GC, Guffiero C, Marinoni C, Kalchsmidt E. Effect of taurine-containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 2002; 57: 466.
- Luvoni GC. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 2006; 66:101-111.
- Malmqvist M. Regional cytology of the epididymal duct in the cat. *J Ultrastruct Res*, 1978; 63 (Abstract 96).
- Marinoni G. Impiego della clortetraciclina nella valutazione dell'integrità funzionale degli spermatozoi epididimali felini congelati. Tesi di Laurea, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, 2001.
- McLaughlin KC, Hamner CE. A demonstration of cat seminal plasma antifertility activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1984; 145: 103-106.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? *Theriogenology*, 2002; 57: 327-344.
- Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev Growth Diff*, 1980; 22: 483-494.
- Mialot JP. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. Editorial A Hora Veterinaria, 1988: 160.
- Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, Shimizu N and Oba H. Usefulness of addition of Orvus ES Paste and Sodium Lauryl Sulfate to frozen feline semen. *J Vet Med Sci*, 2010; 72(1): 23-27.
- Moberg GP. Adrenal-pituitary interactions: effects on reproduction. *Proc X Int Cong Anim Reprod Artif Insem*, 1984; 4: 29-36.
- Müller G, Martino-Andrade AJ, Santos AS, Reghelin AL, García DM, Sant'Ana GR, Spercosi M, Meyer B, Torres SM, Silva Júnior VA, Morais RN. Testicular testosterone: Estradiol ratio in domestic cats and its relationship to spermatogenesis and epididymal sperm morphology. *Theriogenology*, 2012; 78: 1224-1234.
- Nakatsukasa E, Inomata T, Ikeda T, Shino M, Kashiwazaki N. Generation of live rat Offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Reproduction*, 2001; 122: 463-467.
- Neidl DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MM, Colenbrander B, Auero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 2003; 59: 1693-1705.
- Nelson KL, Chrichton EG, Doty L, Volenec DE, Morato RG, Pope CE, Dresser BL, Brown CS, Armstrong DL, Loskutoff NM. Heterologous and homologous capacity of cryopreserved felid sperm: A model for endangered species. *Theriogenology*, 1999; 51: 290.
- Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, Pukazhenti B. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biol Reprod*, 2004; 71: 1517-24.
- Nicander L, Glover TD. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Anat*, 1973; 114: 347-364.

- Niwa K, O'harea K, Hosoi Y, Iritai A. Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1985; 74:657-660.
- Oettlé EE. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*, 1986; 12: 145-150.
- Orgebin-Crist MC. Passage of spermatozoa labelled with thymidine-3H through the ductus epididymidis of the rabbit. *J Reprod Fertil*, 1965; 10: 241-251.
- Parks J, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 1992; 38: 209-222.
- Penfold LM, Jost L, Evenson DP, Wildt DE. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*, 2003; 69: 1730-1735.
- Peña MAI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*, 2004; 83: 209-224.
- Peter AT. O sistema reprodutor. In: Hoskins JD. *Pediatría veterinaria: Cães e gatos do nascimento aos seis meses de idade*. Editorial Interlivros, 2º ed, 1997: 445-455.
- Pilz E. Untersuchungen zur Fertilitätsprognostischen Bedeutungspermatologischer Merkmale des Ebersamens. Thesis, Tierärztliche Hochschule Wien, 1992.
- Pineda MH, Dooley MP, Martín PA. Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 1984a; 45:1038-1041.
- Pineda MH, Dooley MP. Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 1984b; 45:1520-1525.
- Pineda MH, Dooley MP. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *Am J Vet Res*, 1984a; 45: 391-300.
- Pineda, MH. Reproductive patterns of domestic cats. In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 4ª edición (eds. LE McDonal y MH Pineda), Philadelphia, Lea & Febiger, 1989; 17: 487-502.
- Pineda MH, Dooley MP. Flujo retrógrado de espermatozoa hacia la vejiga urinaria del gato y perro durante la eyaculación. *MEVEPA*, 1991; 5:4-13.
- Pineda MH, Doley MP. Métodos para la recolección de semen en el gato doméstico. *Avances de Medicina Veterinaria*, 1991; vol 6: cap 1.
- Platz CC, Follis T, Demorest N, Seager SWJ. Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. *Proceeding of VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Cracow, 1976; 1053-1056.
- Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc*, 1978; 173:1353-1355.
- Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1978; 52: 279-282.
- Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde-Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 2004; 62: 1498-1517.

- Pope CE, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL, Dresser BL. In vitro fertilization in the domestic cat: a comparison between freshly collected and cooled semen. *Theriogenology*, 1989; 31: 241.
- Pope CE, Turner JL, Quatman SP, Dresser BL. Semen storage in the domestic felid a comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. *Biol Reprod*, 1991; 144: 117.
- Prem J. Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden der Katze (*Felis silvestris familiaris*). Munich: Inaugural Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 1992.
- Pukazhenthil B, Pelican K, Wildt DE, Howard J. Sensitivity of domestic cat sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol Reprod*, 1999; 61: 135-141.
- Pukazhenthil B, Noiles E, Pelican K, Donoghue A, Wildt DE, Howard JG. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, 2000; 40: 139-150.
- Pukazhenthil B, Wildt DE, Howard JG. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil*, 2001; 57:423-33.
- Pukazhenthil B, Spindler R, Wildt DE, Bush LM, Howard JG. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphism: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology*, 2002; 44: 288-300.
- Pursel VG, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1974; 1: 63.
- Renner C, Gehring W, Holzmann A. Korrelationen spermabiologischer Merkmale in nativen und aufgetauten Hengstjakulaten unter Berücksichtigung der Transmigration. *Reprod Dom Anim*, 1992; 7: 148-153.
- Reyna JC, Jurado S, Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli C, de la Sota RL. Light and ultrastructural study of seminiferous epithelium characteristics of domestic cats during queen breeding season. *Inter Am Cong Electron Microscopy*, 8th, La Habana, Cuba, 2005a; abstract 64.
- Reyna JC, Savignone CA, Guzzetti J, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio de la estructura testicular en el gato doméstico y su relación con la estación reproductiva. In: VI Simposio Int de Reprod Animal, Córdoba, Argentina, 2005b; 15.
- Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Catalano VA, de la Sota RL, Stornelli MA. Variaciones observadas en el túbulo seminal y espacio intersticial del gato doméstico en diferentes épocas del año. In: Jornadas de Divulgación Técnico-científicas, Casilda, Argentina, 2005c: 158-159.
- Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. Relationship between photoperiod and spermatid production in tom. *Congreso de FIAVAC (Federación Ibero Americana de Asociaciones Veterinarias de Animales de Compañía)*, 3 y Congreso Brasileiro da ANCLIVEPA, 2006a; 27: 215.
- Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Núñez Favre R, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio de la concentración espermática testicular en diferentes estaciones del año en el gato doméstico. *Cong Arg Soc Argentina Ciencias Morfológicas*, 2006b; 10.

- Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Núñez Favre R, Giménez F, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio histológico de testículos de gatos sometidos a un régimen de luz natural. In: Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, Argentina, 2006c; 23: 284.
- Root Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *JAAHA*, 1998; 34: 348-352.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 1995; 44: 885-900.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, 1997; 47: 1093-1101.
- Saling PM, Storey BT. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *Journal of Cell Biology*, 1979; 83: 544-555.
- Sánchez B, Pizarro M, García P, Flores JM. Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993b; 47: 349-353.
- Sánchez B, Pizarro M, García P, Flores JM. Postnatal development of seminiferous tubules in the cat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993a; 47: 343-348.
- Sánchez B, Flores JM, Pizarro M, García P. Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis. *Anat Histol Embryol*, 1998; 27: 35-140.
- Sánchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WMC. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 1997; 9: 689-696
- Schäfer S, Holzmann A, Arbeiter K. The influence of frequent semen collection on the semen quality of beagle dogs. *Tieraerztl Prax*, 1996; 24: 385-390.
- Schäfer S, Holzmann A. The use of transmigration and Spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Repr Sci*, 2000; 59: 201-211.
- Schmidt PM. Feline breeding management. *Small Animal Practice*, 1986; 16 (3): 435-451.
- Schwartz D, McDonald PDM, Heuchel V. On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod Nutr Dev*, 1981; 21: 979-988.
- Scott PP, Greaves JP, Scott MG. Reproduction in laboratory animals as a measure of the value of some natural and processed foods. *J Reprod Fertil*, 1960; 1: 130-138
- Seager SWJ. Electroejaculation of cats (domestic and captive wild felids). *Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology*. Ed. WR Klemm, Springfield, CC Thomas, 1976; 197: 410-418.
- Setchell BP, Sánchez-Partida LG, Chairussyuhur A. Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. *Reprod Fertil Dev*, 1993; 5 :601-612.
- Siemieniuch M, Dubiel A. Preservation of tomcat semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci*, 2007; 99: 135-144.
- Siemieniuch M, Woclawek-Potocka I. Assessment of selected quality parameters of epididymal cat sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser. *Reprod Domest Anim*, 2008; 43: 633-637.

- Silva AI, Mello MI, Basto V, Lopes MD. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006; 66: 1641-1644.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.) . *Lab. Anim. Care*, 1970, 20: 198-204.
- Sojka NJ. Management of artificial breeding in cats. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in large and small animals*, 2nd edition, Philadelphia: WB Saunders, 1986: 805-808.
- Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology*, 1997; 35: 240-254.
- Souza FF, Martins MM, Tebet JM, Chirinéa VH, Lopes MD. Protein profiles of epididymis and electroejaculated fluids of cats. *5th Int Symp Canine Feline Reprod*, 2004: 266-267.
- Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1999; 61: 188-194.
- Stachecki JJ, Ginsburg KA, Leach RE, Armandt DR. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of Andrology*, 1993; 14: 60-65.
- Stachecki JJ, Ginsburg KA, Armant DR. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine. *J Androl*, 1994; 15: 157-164.
- Stachecki JJ, Dresser B, Pope CE, Armant DR. Stimulation of ejaculated domestic cat sperm motility with caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine. *Arch Androl*, 1995; 34: 63-68.
- Steponkus PA, Wiest SC. Freeze-thaw induced lesions in the plasma membrane. In : Lyons JM, Graham D, Raison JK, eds. *Low temperature stress in crop. The role of the membrane*, New York: Academic Press, 1979: 231-254.
- Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997; 3: 203-213.
- Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación, criopreservación de semen e inseminación artificial en el gato doméstico.. En: *Anuario 2002a. Asoc Argent Med Felina*. Buenos Aires, 87-90.
- Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación de semen e inseminación artificial con semen fresco y criopreservado en el gato doméstico. *Rev Soc Med Vet*, 2002b; 83:136-138.
- Stornelli MA, Savignone CA, Jurado S, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL. Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. En: *IX Congreso de Argentino de Ciencias Morfológicas, La Plata, Argentina. Fac Cien Vet de la UNLP*, 2004a; 1: 48.
- Stornelli MA, Savignone CA, Jurado S, Stornelli MC, Tittarelli CM, De la Sota RL, De la Sota' LR. Viability study and ultrastructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex STM paste concentrations . *XV Int Congress of Anim Reprod, Porto Seguro, BA, Brazil*, 2004b; 2: 516.
- Stornelli MA, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Reyna JC, De la Sota RL. Influencia del fotoperíodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. In: *I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos, Corrientes, Argentina. Fac Cienc Vet de la UNE*, 2004c; 1: 19-20.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Anal Vet*, 2005;25: 28-35.

- Stornelli MA. Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodología especiales en felinos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, 2007; 31:135-140.
- Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez FR, Savinone CA, Titarelli CM, Se la Sota RL. Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats. *Reprod Dom Anim*, 2009; 44: 287-290.
- Ström Host B, Rota A, Andersen-Berg K, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing. Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim*, 1998; 33: 77-82.
- Swanson WF, Brown JL, Wildt DE. Influence of seasonality on reproductive traits of the male Pallas cat (*Felis manul*) and implications for captive management. *J Zoo Wildlife Med*, 1996; 27: 234-240.
- Swanson WF, Roth TL, Blumer E, Citino SB, Kenny D, Wildt DE. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, 1996; 45: 241.
- Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, 2006; 66: 49-58.
- Tanaka A, Kuwabara S, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Tsutsui T. Effect of eyaculation intervals on Semen quality in cats. *J Vet Med Sci*, 2000; 62(11): 1157-1161.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 2006; 66:1629-1632.
- Tejada RL, Mitchell JC, Norman A, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*, 1984; 42: 87-91.
- Terrell KA, Wildt DE, Anthony NM, Bavister B, Libo SP, Penfold LM, Marer LL, Crosier AE. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. *Cryobiology*, 2012; 64: 110-117.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axnér E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DAN integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, 2008; 70: 233-240.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, Bergqvist A, Söderquist L, Axnér A. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa : effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology*, 2010; 73: 1076-1087.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudinc E, Stornelli MC, Desmarás E, De la Sota RL. Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en diferentes épocas del año. En: VII Reunión Interam de Cátedras de Fisiología Animal, Argentina, 2004: 106.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudinc E, Stornelli MC, De la Sota RL. Effects of medium and preserve time on the feline and canine epididymal spermatozoa supervivence. *Theriogenology*, 2006.
- Tsien RY. In: Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B. Quantitative fluorescence microscopy – Imaging and spectroscopy. Taylor DL, Wang YL. New York: Academic Press, 1989; 30: 127-156.

- Toyonaga M, Sato Y, Morita M, Watanabe M, Oba H, Mizutani T, Hori T, Tsutsui T. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J Vet Med Sci*, 2010; 72: 777-780.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. Unilateral uterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, 2000; 62: 1247-1251.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, 2003; 65: 397-399.
- Tsutsui T, Nagakubo K, Hori T. Relationship between the sperm count and the fertilization rate of ova ovulated from the contralateral ovary in intrauterine horn insemination in cat. *J Vet Med Sci*, 2004; 66(9): 1143- 1145.
- Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B, Gunsalus GL. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology*, 1984; 115: 1925-1932.
- Villaverde AI, Martins MI, Castro V, Lopes MD. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymes (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006; 66: 1641-1644.
- Villaverde AI, Fioratti EG, Landim-Alvarenga FC, de Carballo Balieiro JC, Melo CM, Papa FO, Lopes MD. Effect of progesterone and ionomycin on domestic cat sperm motility patterns and acrosome reaction. *Reprod Domest Anim*, 2009; 44: 309-312.
- Wagenfeld A, Yeung CH, Shivaji S, Sundareswaran VR, Ariga H, Cooper TG. Expression and cellular localization of contraception-associated Protein 1. *Journal of Andrology*, 2000; 21: 954-963.
- Watson PF. Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec*, 1975; 97: 12-15.
- Watson PF, Glover TE. Vaginal anatomy of the domestic cat in relation to copulation and artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993; 47: 355-359.
- Way A, Griel LC, Killian GJ. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl*, 2000: 213-219.
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1983; 29 (4): 1019-1025.
- Wildt DE, Meltzer D, Chakraborty PK, Bush M. Adrenal-testicular-pituitary relationships in the cheetah subjected to anesthesia/electroejaculation. *Biol Reprod*, 1984; 30: 665-672.
- Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Charaborty PK, Brown JL, Howard JG, Teare A, Bush M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biol Reprod*, 1988; 38: 245-255.
- Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AC, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*, 1987a; 329: 328-331.
- Wildt DE, O'Brien SJ, Howard JG, Caro TM, Roelke ME, Brown JL, Bush M. Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biol Reprod*, 1987b; 36: 351-360.

- Wildt DE. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: Bartke A., editor. Functions of somatic cells in the testis. New York, NY: Springer-Verlag Inc, 1994: 1-24.
- Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 1996; 46: 559-578.
- Wood TC, Swanson WF, Davis RM, Anderson JE, Wildt DE. Functionality of sperm from normo-versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. *Theriogenology*, 1993; 39: 342.
- Yu I, Leibo SP. Recovery of motile, membrane intact spermatozoa from canine epididymis stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*, 2002; 57: 1179-1190.
- Zambelli D, Bergonzoni ML, De Fanti C, Carluccio A. Sperm morphology evaluation techniques in the cat, Rabbit and dog. *SIS Vet Proceedings*, 1993; 47: 279-283.
- Zambelli D. Study of sperm morphology and preservation in the cat and of reproductive physiologic parameters in the female for the use in the A.I. PhD thesis, University of Perugia, 1994: 69-70.
- Zambelli D, Caneppele B, Castagnetti C, Belluzzi S. Criopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Dom Anim*, 2002; 37: 310-313.
- Zambelli D, Castagnetti C, Belluzzi S, Paladini C. Correlation between fetal age and ultrasonographic measurements during the second half of pregnancy in domestic cats. *Theriogenology*, 2004; 62: 1430-1437.
- Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 2006; 66: 159-165.
- Zambelli D, Iacono E, Raccagni R, Merlo B. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*, 2010; 73: 886-892.
- Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, 2010; 74: 1396-1402.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se realiza una descripción general de los materiales y métodos usados en los estudios que se presentan en esta tesis.

5.1. ANIMALES

A lo largo de 2006, 2007 y 2008 se recogieron muestras correspondientes a gatos castrados a lo largo del año en clínicas privadas y otros eutanasiados en el Centro de Control Animal del Ayuntamiento de Córdoba. En el primer caso contamos con la autorización expresa de los propietarios para utilizar esas muestras para investigación, mientras que el en caso del Centro de Control, se obtuvo la autorización por parte de la Delegación de Agricultura, Ganadería y Pesca, así como del Centro de Control. Todas las actividades fueron aprobadas por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba y cumplían las exigencias recogidas por la Ley Española de Protección Animal (RD 1201/2005) que transpone la Directiva Europea 86/609 concerniente a la protección de animales utilizados en experimentación animal.

Todos los animales se localizaban en la ciudad de Córdoba (España) (37° 53' N-4° 47' O).

Los animales incluidos en los estudios contaban con una edad comprendida entre 9 y 48 meses, y un peso medio aproximado de 3.0-4.0 Kg. Se trataba de gatos cruzados, cuyas condiciones de alojamiento eran variables, dependiendo de que fueran animales de compañía o estuvieran libres en parques.

5.2. OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES REPRODUCTIVOS DE GATOS

Para llevar a cabo este trabajo de Tesis, se recogieron los testículos, epidídimos y conductos deferentes de gatos que había sido castrados o eutanasiados. Se utilizaron diferentes pautas anestésicas (TRABAJO 1), tal y como se describe a continuación:

A) Administración de un agente sedante como la medetomidina ($80\mu\text{g Kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer), y a continuación un bolo intravenoso de pentobarbital sódico (200 mg kg^{-1} , Dolethal; Vetoquinol).

B) Ketamina HCl (5mg kg^{-1} , Imalgene; Merial) combinada con medetomidina ($80\mu\text{g Kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer).

C) Premedicación con medetomidina ($80\mu\text{g Kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer) y anestesia mantenido con isoflurano (Isoflo; Abbott Laboratories) en oxígeno a una tasa de flujo total de gas de 1.5 l/min liberado a un sistema recirculante de respiración.

La analgesia postoperatoria consistió en una inyección subcutánea de meloxicam (0.30 mg kg^{-1} , Metacam; Boehringer Ingelheim).

Tras la orquiectomía, se ligaron los conductos deferentes y se sumergieron los testículos con sus epidídimos en suero salino a temperatura ambiente para su transporte. Una vez en el laboratorio, se procedió a separar el epidídimo del testículo y se eliminaron los pequeños vasos sanguíneos para evitar la contaminación con sangre. Acto seguido, se cortó el epidídimo y los vasos deferentes en pequeñas porciones y se sumergieron en 3 ml de dPBS a 37.8°C para reactivar la motilidad de los espermatozoides y permitir su salida al medio. Se incubaron al baño María a esta temperatura durante 10 minutos, agitándolos frecuentemente y seguidamente se filtraron con un filtro diseñado para semen de porcino, vertiendo otros 3 ml de dPBS a través del filtro para lavar los posibles espermatozoides que quedasen retenidos.

5.3. MEDIOS DE DILUCIÓN PARA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA (CONGELACIÓN Y VITRIFICACIÓN)

Con objeto de evaluar la capacidad de congelación de las muestras obtenidas se compararon tres diluyentes comerciales (Triladyl®, AndroMed® y Gent®) diseñados para otras especies animales, y seguidamente se diseñaron 2 nuevos diluyentes específicos para gatos que contenían taurina y un monosacárido (glucosa o fructosa) en medio TRIS, y los cuales fueron a su vez comparados con Triladyl®, ya que éste había ofrecido los mejores resultados entre los diferentes medios comerciales (TRABAJO 3). Las características de todos los diluyentes empleados y la pauta de congelación seguida puede leerse en el TRABAJO 3.

Para estudiar la viabilidad de la vitrificación espermática en gato, alícuotas de 40µl fueron diluidas 1:1 en cuatro medios diferentes. El medio control estaba compuesto por DPBS suplementado con 1% de BSA, mientras que los otros tres medios contenían además diferentes concentraciones de sacarosa (0.25M, 0.40M, 0.60M) (TRABAJO 6).

5.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

Se evaluó la calidad espermática tras la recogida, durante el proceso de refrigeración (previo a la congelación) y tras la descongelación en las horas 0 (varios minutos tras descongelar), 2, 4 y 6. Para ello se realizaron las determinaciones que se describen a continuación:

Concentración: Se evaluó la concentración de las muestras con una cámara de Neubauer y una pipeta cuentaglobulos, recogiendo 5 µl de la muestra y diluyéndola con 200 µl de formalina. Acto seguido se colocó una gota en la cámara y se contaron todos los espermatozoides incluidos en los 20 cuadros, se multiplicó el resultado por 4 y se dividió entre 8, obteniéndose así la concentración en millones de espermatozoides/ml.

Motilidad: La evaluación de los parámetros de motilidad se realizó en los momentos siguientes:

- Inicialmente en dPBS, tras el filtrado del epidídimo.
- En la muestra a 4°C, tras la adición del diluyente de congelación, justo antes de su exposición al vapor de nitrógeno líquido
- A la descongelación a los 5 minutos (considerado como hora 0), 2 horas, 4 horas y 6 horas.

Para ello, se extrajeron 10 µl de la muestra y se colocaron en un portaobjetos caliente y con un cubreobjetos, para su observación directa al microscopio óptico a x100 y x400 aumentos. Se evaluó la calidad de la motilidad total o velocidad de movimiento (escala del 0 al 5, donde 0 es ausencia de movimiento y 5 es un movimiento progresivo y rápido), porcentaje de motilidad y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en la muestra, evaluando 4 campos.

Morfología: Para evaluar la morfología espermática se realizaron tinciones a partir de alícuotas de 10 µl de cada muestra. Se compararon los resultados con la tinción Diff-Quick y Eosina-nigrosina (TRABAJO 4), para evaluar además el efecto colateral de cada una de ellas sobre la morfología y la detección de defectos morfológicos. Para ello se evaluaron 200 células espermáticas de cada tinción.

La morfología se clasificó en:

Normales

Defectos primarios

- Cabeza: macrocefalia, microcefalia, cabeza piriforme, espermátida, doble cabeza
- Pieza media: Pieza media en ovillo, unión abaxial a la cabeza
- Flagelo: cola en ovillo, biflagelado

Defectos secundarios:

- Cabeza: cabeza suelta
- Pieza media: Gota citoplasmática proximal y distal (asociada o no a otros defectos de la pieza media y cola), cuello doblado, pieza media doblada, pieza media enrollada.
- Flagelo: cola doblada, cola enrollada, cola en gancho, cola partida

Estatus acrosomal: Se utilizaron dos métodos para evaluar el estado del acrosoma:

- *Tinción Spermac®:* Se extendieron 10 µl de la muestra en un portaobjetos y se dejó secar no más de 10 minutos. A continuación, se introdujo en el fijador durante 5 minutos. Posteriormente, se enjuagó con agua destilada y se introdujo en el colorante A durante 2 minutos, enjuagado, colorante B durante 1 minutos, enjuagado y colorante C 1 minuto, enjuagado.

- *Tinción de fluorocromo PSA-FITC:* Se extendieron 10 µl de la muestra en un portaobjetos y se dejó secar. A continuación, se sumergió la muestra en etanol absoluto y se mantuvo a 4°C durante 30 minutos. Seguidamente, se dejó secar a 4°C y se cubrió con solución PNA durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. A

continuación, se enjuagó con agua destilada y se observó con microscopio de fluorescencia, contándose 100 espermatozoides e interpretándose como acrosoma intacto cuando la cabeza presentaba un color verde brillante, y acrosoma perdido o alterado cuando sólo presentaba color verde brillante la zona no acrosomal, apreciándose ésta como una sombra gris.

Integridad de membrana o vivos-muertos: se utilizaron dos métodos para evaluar la integridad de la membrana:

- *Tinción eosina-nigrosina:* se mezclaron 10 µl de muestra con otros 10 µl del colorante en un portaobjetos. Inmediatamente, se realizó la extensión y se dejó secar a temperatura ambiente. La evaluación se realizó al microscopio óptico a x1000 aumentos, sobre 200 espermatozoides, interpretándose como vivos cuando no se teñían, presentando un color blanco sobre un fondo oscuro, y muertos cuando se teñían de color rosado, sobre un fondo oscuro.

- *Tinción de fluorocromo SYBR-14/PI:* se mezclaron 50 µl de la muestra con 175 µl de HEPES, 1,25 µl de SYBR-14 y 1,25 µl de PI, dejándose incubar 10 minutos a 36°C en oscuridad. Inmediatamente se extrajo una alícuota de 10 µl y se evaluó con el microscopio de fluorescencia, contándose 200 espermatozoides e interpretándose como vivos cuando presentaban una coloración verde brillante (algunos presentan además movimiento) y muertos cuando mostraban coloración rojo brillante.

Funcionalidad de membrana: se evaluó mediante la prueba de endósmosis o test HOS. Para ello se diluyó una alícuota de la muestra de 10 µl en 50 µl de citrato sódico a 25°C, y se dejó incubar a esta temperatura durante 25 minutos. A continuación, se extrajo una alícuota de 10 µl, se colocó en un porta y se mezcló con otros 10 µl de glutaraldehído a 25°C. Se colocó un cubreobjetos encima y se evaluaron 200 espermatozoides en el microscopio óptico a x400 aumentos, interpretándose como positivos o con membrana funcional cuando aparecían las colas con un enrollamiento, mientras que eran negativos o con membrana no funcional aquéllos que mantenía la estructura de la cola sin cambios aparentes.

Integridad del ADN: para ello empleamos la tinción con Naranja de Acridina (AO). Una alícuota de 10 µl de la muestra se extendió sobre un portaobjetos y se dejó secar. A continuación se sumergió en la mezcla de Carnoy (ácido acético glacial y metanol, proporción 3:1) durante una noche. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron secar los portaobjetos sin enjuagar y se cubrieron con la solución preparada a diario de naranja de acridina y se dejó incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos antes de su evaluación al microscopio de fluorescencia. Se evaluaron 200 espermatozoides y se interpretó como ADN intacto cuando la cabeza presentaba coloración verde brillante y como ADN dañado cuando la coloración variaba desde amarillo verdoso-naranja hasta rojo anaranjado.

5.5. CONGELACIÓN Y VITRIFICACIÓN

Para su **congelación**, las dosis de esperma fueron preparadas a una concentración final aproximada de 5×10^6 de espermatozoides en pajuelas de 0.25ml y después de

15 min fueron suspendidas horizontalmente durante 10 min y luego sumergidas en NL (TRABAJOS 1, 2 y 3).

Para **vitrificar** se utilizaron pajuelas de 0.25 ml como soporte, en las que se introducía una cantidad aproximada de 10 μ l de esperma diluido en el medio correspondiente y se mantenía durante 2 min en vapores de NL, tras lo cual era sumergida en NL (TRABAJO 6).

5.6. DESCONGELACIÓN Y CALENTAMIENTO

Para su **descongelación**, cada pajuela fue sumergida en un baño María a 38°C durante 30 segundos. Seguidamente, se vaciaron en un tubo Eppendorf atemperado y se añadieron 0,25 ml del diluyente de descongelación (dilución 1:1). Inmediatamente después, el tubo fue introducido en una estufa a 38°C en oscuridad, durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron las evaluaciones y tinciones anteriormente citadas. La muestra se mantuvo en la estufa a 38°C en oscuridad durante 6 horas, y todas las evaluaciones y tinciones ya citadas se repitieron a las 2, 4 y 6 horas de la descongelación (TRABAJOS 1, 2 y 3).

Para el **calentamiento** de las muestras vitrificadas se introdujeron en 0.5 ml de DPBS-BSA 1% a 65°C durante 5 seg y se mantuvo en el incubador a 38°C durante 3 min. Después la muestra fue centrifugada (300g durante 10 min). El pellet es finalmente resuspendido en 50 μ l de DPBS-BSA 1% para llevar a cabo la evaluación espermiática (TRABAJO 6).

5.7. EVALUACIÓN DE LA HISTOLOGÍA TESTICULAR

Procesado y tallado: La fijación de todas las muestras de tejido se realizó por inmersión en formol diluido al 10% en tampón fosfato pH 7.0 durante un mínimo de 24 horas y un máximo de 72 horas. Tras la fijación se tallaron todas las piezas de orquiectomía, preparándose, al menos, 1 bloque por testículo.

El tallado se realizó de tal manera que se pudiera analizar todo el parénquima testicular. Para ello se realizaron 3 cortes, dividiendo el testículo en 4 porciones elípticas. De cada porción se cogió un tercio. Tras el tallado, las muestras de tejido se incluyeron en parafina.

Estudio microscópico: El estudio microscópico se realizó en cortes de tejidos de 3-4 micras de grosor teñidos con la técnica histoquímica de la Hematoxilina-eosina.

Las características histológicas evaluadas al microscopio óptico incluían: la proliferación y maduración del epitelio germinal, el espesor del epitelio germinal, presencia o ausencia de espermatozoides formados en los túbulos seminíferos y cambios histopatológicos localizados en los túbulos seminíferos, estroma, células de Leydig y túnica albugínea. La proliferación y maduración del epitelio germinal incluyó la presencia, ausencia o disminución de los tipos celulares que lo componen: espermatogonia, espermátocitos, espermátidas y espermatozoides. Las lesiones fueron clasificadas acordando a la severidad del proceso (bajo,1;

moderado, 2; alto, 3). Las lesiones histopatológicas de los túbulos seminíferos analizadas incluyeron falta de maduración de espermatozoides lo que se traducía en ausencia de espermatozoide formados en los túbulos, hipoplasia/atrofia, síndrome de células de Sertoli, degeneración tubular (falta de integridad normal), hialinización y células gigantes espermatozoides/espermática. Las lesiones del intersticio incluyeron fibrosis intersticial e inflamación. Las células de Leydig podían estar hipertrofiadas, atrofiadas o ausentes. Las lesiones de la túnica incluían fibrosis (adhesión) e inflamación. Las espermátidas se evaluaron según presentase alteraciones (grasa, apoptosis, multinucleadas o gigantes) o no.

Características evaluadas en las muestras tisulares:

- a) En el parénquima: la organización y cambios vasculares como la hiperemia y/o el edema. Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o la alteración fue baja, moderada o intensa, respectivamente.
- b) En los túbulos se valoraron la existencia o no de: luz, descamación, hipertrofia, hipoplasia, atrofia, degeneración, mineralización, metaplasia ósea, granulomas y/o hialinización. Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o si la alteración afectaba a túbulos aislados, si afectaba entre el 20-60% de los túbulos o a más del 60% de los túbulos, respectivamente.
- c) En el epitelio germinal de los túbulos se analizaron:

Células de Leydig: cantidad y presencia de liposomas. La cantidad se valoró de forma semicuantitativa contando el número de células en 10 campos de 20 aumentos (de 0 a 3). 0, menos de 10 células; 1 entre 11 y 30; 2, entre 31 y 70; y, 3, más de 70 células en 1 campo de 20 aumentos.

Células de Sertoli: Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o si se observaba disminución de ellas en túbulos aislados, si afectaba entre el 20-60% de los túbulos o a más del 60% de los túbulos, respectivamente (de 0 a 3).

Espermatogonias: Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o si se observaba disminución de ellas en túbulos aislados, si afectaba entre el 20-60% de los túbulos o a más del 60% de los túbulos, respectivamente (de 0 a 3).

Espermatozoides 1° y 2°: Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o si se observaba disminución de ellas en túbulos aislados, si afectaba entre el 20-60% de los túbulos o a más del 60% de los túbulos, respectivamente.

Espermátidas: normales, grasa, con degeneración, apoptosis, multinucleadas, gigantes). Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no existía alteración o si se observaba alteración en túbulos aislados, si afectaba entre el 20-60% de los túbulos o a más del 60% de los túbulos, respectivamente.

Espermatozoides: Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no se observaban espermatozoides formados o si se observaban en túbulos aislados, entre el 20-60% de los túbulos o en más del 60% de los túbulos, respectivamente.

Fibrosis/inflamación/otros: Se realizó una valoración cualitativa del 0 a 3 dependiendo si no se observaba o si se observaba de forma focal, difusa o generalizada, respectivamente.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para analizar los datos de calidad espermática obtenidos en muestras frescas y en muestras congeladas-descongeladas se realizó un test de Levene para asegurarnos de que las varianzas eran homogéneas. A continuación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre los diferentes protocolos anestésicos (TRABAJO 1), entre los valores obtenidos en muestras de espermatozoides de epidídimo procesadas tras la castración o después de refrigerarlas durante 12h (TRABAJO 2), y también entre los diferentes diluyentes utilizados para congelación (TRABAJO 3). En este último trabajo se llevó a cabo la prueba de Tukey para determinar diferencias existentes entre diluyentes y entre los tiempos de congelación-descongelación dentro de cada diluyente. Un análisis estadístico similar al descrito fue empleado también en el TRABAJO 6, para conocer el efecto de diferentes diluyentes de vitrificación sobre la calidad espermática.

En el TRABAJO 4 se realizó una comparación de los diferentes métodos de tinción, mediante una prueba ANOVA.

En el TRABAJO 5 se consideraron los parámetros histológicos (grado de espermatogénesis, presencia de células de Leydig, número de liposomas y túbulos con espermatozoides) como variables discretas, mientras que las variables espermáticas (espermatozoides totales recogidos, porcentaje de motilidad progresiva, morfología, defectos morfológicos primarios y estatus acrosomal) fueron analizadas como variables continuas. Las muestras fueron agrupadas en fotoperíodo ascendente o descendente, de acuerdo con el momento en que se había realizado la castración, y se realizó un ANOVA. Por último, se analizó la correlación entre variables discretas y continuas mediante la prueba de correlación de Spearman.

Para todos los análisis utilizamos el paquete estadístico SPSS 11.0 y 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Todos los datos fueron expresados como media \pm SEM y los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se muestran en forma de artículos, algunos de ellos ya aceptados y publicados, y otros en proceso de revisión o pendientes de ser enviados. A continuación se citan dichos artículos:

Artículo 1: Efecto de los anestésicos empleados durante la castración sobre la calidad espermática.

Artículo 2: Evaluación de la refrigeración epididimaria sobre la congelabilidad del esperma.

Artículo 3. Efecto de diferentes diluyentes para congelación sobre las características de esperma epididimario de gato.

Artículo 4. Comparación de dos técnicas de tinción para evaluar la morfología espermática: Diff-Quick y Eosina-nigrosina.

Artículo 5. Características histológicas del testículo y calidad del esperma epididimario de gato a lo largo del año.

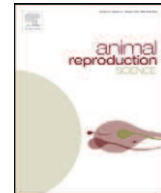
Artículo 6. Efecto de la vitrificación sobre la calidad del esperma epididimario de gato.

TRABAJO INVESTIGACION 1

Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats

Animal Reproduction Science 123 (2011) 265–269

E. Jiménez, C.C. Pérez-Marín, Y. Millán, E. Agüera



Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats

E. Jiménez^a, C.C. Pérez-Marín^{a,*}, Y. Millán^b, E. Agüera^c

^a Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

^b Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

^c Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2010

Received in revised form 9 December 2010

Accepted 4 January 2011

Available online 14 January 2011

Keywords:

Anaesthesia

Castration

Feline

Preservation

Semen

ABSTRACT

The present study investigated the effect of different anaesthetic agents commonly used in cats on the fresh and frozen-thawed epididymal sperm. Seventeen male domestic cats were castrated using pentobarbital, ketamine HCl or isoflurane. Sperm samples were recovered from epididymides and evaluated before and after freezing, determining the vigor, motility, morphology, acrosome status, sperm viability and functional membrane integrity. Fresh epididymal sperm was influenced by the drugs used, noting that motility features, i.e. vigor ($p \leq 0.05$) and progressive motility ($p \leq 0.05$), were higher for the inhalation anaesthetic while the others did not showed statistical differences. In frozen-thawed sperm samples, cats treated with barbiturics showed lower values for acrosome status ($p \leq 0.05$) and integrity and functionality of membrane ($p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively) than in the others groups. Results suggested that drugs used for castration in cats could affect the sperm quality and this should be considered when implementing sperm cryopreservation in the feline.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Today the majority of wild felid species are endangered. A necessary actuation to preserve these species is the conservation of gametes and to gain a better understanding of reproductive control. The domestic cat is the animal model used to achieve these goals. The use of artificial vagina, electroejaculation (EE) or the epididymal recovery after castration or post-mortem has been reported in cats. At the moment, only EE and epididymal recovery are efficient to put into effect in wild felids and it is necessary to know the effects of anaesthetic drugs utilized in these procedures. Recently, inhalation of anaesthetics has been found to affect reproduction and genotoxicity in humans

(Boivin, 1997; Jalszynski et al., 1999), but these studies have been concentrated on the effects of chronic exposure to halogenated anaesthetics (Ceyhan et al., 2005). The impact of vaporized anaesthetic agent on human sperm samples showed that isoflurane increased reversibly the apparent motility and vitality of sperm, while sevoflurane had little effect on motility and viability of sperm at the same concentrations (Wang et al., 2008).

Anaesthesia is necessary if a surgical approach is to be used in animals and, certainly, to recover sperm in wild and domestic felids, but its use could cause some changes in the sperm quality. Although a number of anaesthetic protocols are used in the cat, ketamine HCl is one of the most common either alone or associated with other drugs (Zambelli et al., 2007). Studies on ketamine pharmacokinetics reported a rapid elimination of the drug from plasma/serum that occurred with a half-life ranging between 40 and 60 min (Zambelli et al., 2007). Its use for EE in cats provoked an increase in serum cortisol levels. Other anaesthetic proto-

* Corresponding author. Tel.: +34 957218716; fax: +34 957211093.
E-mail address: pv2pamac@uco.es (C.C. Pérez-Marín).

cols based on volatile agents such as halothane or isoflurane appear to be safe for the animal.

The aim of this study was to evaluate the influence of some anaesthetic agents used in castration on the epididymal sperm quality before and after freezing.

2. Materials and methods

2.1. Animals and protocols

Seventeen mature cats, from 1 to 2 years old, and each weighing 3.0 ± 1.5 kg were assigned to three treatment groups. The study was conducted in Cordoba (Spain) from 2006 to 2008, with the collaboration of the municipal pet control center and private veterinary clinics. Animals that were not claimed or adopted within three days of arrival at the municipal pet control center were painlessly euthanized according to local and regional laws, while private owners were asked to authorize the use of samples after castration. The experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation.

To compare the effect of anaesthetic drugs used for orchietomy on the epididymal sperm quality, animals were divided in three groups. Cats corresponding to the group A ($n=6$) were euthanized, as a part of the animal control programme, with an intravenous bolus of sodium pentobarbital (200 mg kg^{-1} , Dolethal; Vetoquinol), after having been treated with medetomidine ($80 \mu\text{g kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer), a sedative agent. In group B ($n=5$), cats were anaesthetized for castration with ketamine HCl (5 mg kg^{-1} , Imalgene; Merial) in combination with medetomidine ($80 \mu\text{g kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer). Postoperative analgesia consisted of a subcutaneous injection of 0.30 mg kg^{-1} meloxicam (Metacam; Boehringer Ingelheim). Group C ($n=6$) were also anaesthetized for castration. After being premedicated with medetomidine ($80 \mu\text{g kg}^{-1}$ IM, Domtor; Pfizer), anaesthesia was maintained by isoflurane (Isoflo; Abbott Laboratories) in oxygen at a total gas flow rate of 1.5 l/min delivered to a circle rebreathing system. Postoperative analgesia consisted of a subcutaneous injection of 0.30 mg kg^{-1} meloxicam (Metacam; Boehringer Ingelheim). While animals included in group A were those healthy cats euthanized in the municipal pet control center, other cats were randomly assigned to ketamine (group B) or isoflurane (group C) groups based on the surgery time, in agreement with the private veterinary clinics.

2.2. Sample preparation

After orchietomy, deferent ducts were tied and the testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature. Within 1 h of collection, blood vessels were removed and epididymides and proximal deferent ducts were isolated. Spermatozoa were collected by mincing the cauda epididymides in 3 ml DPBS at 38°C . After 10 min the washed tissue was filtered to get the spermatozoa, and 3 ml

DPBS were used to wash again the tissue retained in the filter.

2.3. Cryopreservation of epididymal spermatozoa

After the initial evaluation, semen was centrifuged at $300 \times g$ for 8 min. The sperm pellet was resuspended in TRIS extender containing 20% egg yolk to obtain doses of $250 \mu\text{l}$ containing $30\text{--}40 \times 10^6$ spermatozoa. Straws were cooled to 4°C (at a rate 0.3°C/s) over a period of 15 min. Straws were placed horizontally over liquid nitrogen (LN) vapours for 10 min and thereafter were immersed into LN. The cooling rates were monitored by a digital thermometer. Straws were placed in a 38°C water bath for 30 s to thaw.

2.4. Sperm assessment

Fresh diluted and frozen-thawed sperm samples were evaluated for vigor, motility, morphology, acrosome status, viability (live cells), and functional integrity of the sperm membrane. Ten microliters of epididymal sperm samples were placed on a warm glass slide and the percentage of total and progressive motility was evaluated subjectively at $100\times$ magnification. Vigor of velocity was also estimated, using the following scale: 0, no movement; 1, slight side-to-side movement, no forward progression; 2, rapid side-to-side movement, no forward progression; 3, rapid side-to-side movement, occasional forward progression in spurts; 4, steady, slow forward progression; 5, rapid, steady forward movement (Platz and Seager, 1978). Sperm morphology was studied in smears stained with a Romanowski stain (fixant, eosin and blue solutions for fast staining, Panreac, Barcelona, Spain). A total of 200 spermatozoa in each smear were analyzed under a light microscope at $1000\times$ magnification with immersion oil. The percentages of normal and abnormal spermatozoa were determined. To determine the acrosome integrity, a drop of diluted sperm was placed on a warm glass slide and a thin smear was prepared and air-dried. Then, it was stained using Spermac[®] (Minitüb, Tiefenbach, Germany). The slide was fixed for 5 min and washed with distiller water 5–6 times. It was placed into stain A for 2 min and repeated for 1 min for stain B and C. Finally, the slide was air dried and observed under a light microscope at $1000\times$, with immersion oil. Sperm viability was evaluated using eosine–nigrosine stain. Sperm samples ($20 \mu\text{l}$) were placed together with a $20 \mu\text{l}$ drop of stain on a glass slide, and were mixed immediately with glass rods and the smear was made. The slide was left at 37°C until completely dried. Spermatozoa were categorized as live (or integral membrane) and dead (or altered membrane) when cells were unstained or pink-stained by eosin, respectively. Results were expressed as percentage. Hypo-osmotic swelling (HOS) test was used to evaluate the functional integrity of the sperm membrane. Briefly, $5 \mu\text{l}$ of semen or a diluted sperm suspension was mixed with $50 \mu\text{l}$ of a hypo-osmotic sodium citrate solution (100 mOsmol/kg) and incubating the mixture at room temperature for 25 min. The samples were then fixed in 2% glutaraldehyde/cacodylate, and evaluated under phase-contrast microscopy at $400\times$ magnification. The sperm membrane was considered to be intact if the sperm tail was

Table 1

Fresh sperm parameters for sperm collected from the epididymis.

	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	
Vigor	3.7 ± 0.5 ^a	3.0–4.5	3.5 ± 0.3 ^{a,b}	3.0–4.0	4.4 ± 0.5 ^b	3.8–5.0	0.05
Total sperm motility (%)	55.0 ± 10.4	40–70	68.0 ± 17.9	50–90	75.8 ± 12.0	60–95	0.06
Progressive sperm motility (%)	28.3 ± 13.2 ^a	10–50	51.0 ± 27.0 ^{a,b}	20–85	66.7 ± 15.1 ^b	10–90	0.05
Normal sperm morphology (%)	53.0 ± 10.0	40–66	56.2 ± 6.8	44–60	50.0 ± 5.6	45–60	n.s.
Intact acrosome (%)	54.5 ± 12.4	40–77	55.6 ± 14.2	41–74	58.3 ± 5.53	53–68	n.s.
Live cells (%)	72.3 ± 21.7	34–91	81.6 ± 9.9	69–92	83.7 ± 7.5	73–96	n.s.
Functional membrane integrity (%)	80.3 ± 8.2	68–94	82.0 ± 10.1	73–93	81.7 ± 5.9	71–93	n.s.

^{a, b} Indicate significant differences between treatments.

coiled at the end of the assay, and the result was expressed as the percentage positive endosmosis.

2.5. Statistical analysis

Data obtained for fresh and frozen-thawed epididymal sperm were examined for heterogeneity of variances using the Levene's test. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) for vigor and motility, morphology, percentage of intact acrosome, viability, and functional integrity of the sperm membrane. The SPSS 11.0 package (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. All results are presented as mean ± SD. The significance level was set as $p \leq 0.05$.

3. Results

The effects of the anaesthetic agents used for anaesthesia or euthanasia on cat epididymal sperm quality (fresh and frozen-thawed) are shown in Tables 1 and 2.

The analysis of fresh epididymal sperm, carried out immediately after the orchiectomy, showed that some motion parameters are modified by the agents used during surgery. Cats euthanized with a massive bolus of barbiturics had a significant lower value for vigor ($p \leq 0.05$), and progressive motility ($p \leq 0.05$) than cats anaesthetized by isoflurane (Table 1). A relevant observation was related to progressive motility that reached an overall value of 28.3% when barbiturates were used, versus 66.7% in sperm obtained from cats treated with isoflurane. No significant differences were detected for total motility, morphology, acrosome status, sperm viability and functional membrane integrity when samples were evaluated before freezing. However, total motility was significantly different ($p < 0.06$).

Table 2

Frozen-thawed sperm parameters for sperm collected from the epididymis.

	Group A (n=6)		Group B (n=5)		Group C (n=6)		p value
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	
Vigor	3.3 ± 0.5	2.5–4.0	3.5 ± 0.7	3.0–4.5	4.3 ± 0.8	3.0–5.0	0.06
Total sperm motility (%)	31.7 ± 14.7	20–60	48.0 ± 14.8	30–70	47.5 ± 20.4	20–70	n.s.
Progressive sperm motility (%)	18.3 ± 11.7	10–40	28.0 ± 16.4	10–40	38.3 ± 17.2	10–60	n.s.
Normal sperm morphology (%)	50.5 ± 9.8	36–63	46.8 ± 9.6	31–57	43.2 ± 11.3	27–56	n.s.
Intact acrosome (%)	35.5 ± 8.9 ^a	25–50	44.4 ± 2.3 ^b	39–50	44.7 ± 5.6 ^b	40–55	0.05
Live cells (%)	69.5 ± 14.3 ^a	50–87	75.0 ± 5.9 ^{a,b}	69–85	84.8 ± 7.5 ^b	73–94	0.05
Functional membrane integrity (%)	42.2 ± 11.2 ^a	28–56	58.8 ± 8.5 ^b	44–65	64.8 ± 6.8 ^b	51–69	0.01

^{a, b} Indicate significant differences between treatments.

No significant differences were observed in motility parameters when frozen-thawed sperm samples were analyzed, although vigor was almost significantly different for treatments ($p < 0.06$). Barbituric treatment reported the lowest and isoflurane had the highest values. The functional integrity of the sperm membrane was significantly affected by the treatment used ($p \leq 0.01$), while acrosome status and sperm viability were slightly affected (Table 2). Again, sperm samples corresponding to cat treated with barbiturate showed lower values than cat anaesthetized with ketamine HCl or isoflurane.

4. Discussion

The most usual techniques to obtain feline spermatozoa for freezing are EE and epididymal recovery (after orchiectomy). Both methods require restraint and anaesthesia. Barbiturics, ketamine HCl and isoflurane are some of the most common drugs used for this purpose. Barbiturates are common euthanatic agents in cats due to their low cost and quick effect. After barbiturate overdose, the central nervous system is depressed, provoking a rapid and progressive loss of consciousness, and inducing a cardiopulmonary arrest (Tasker, 2008). Ketamine HCl is a frequently used anaesthetic in cats, due to its large safety margin and compatibility with other drugs (Hau and Van Hoosier, 2003). This agent does not depress respiration or cardiac output, although it has indirect sympathomimetic effects and increases norepinephrine plasma levels (Anton et al., 2004). It is highly lipid soluble and readily crosses the blood–brain barrier and then redistributes to the circulation being metabolized in the liver by cytochrome p450. It can be combined with sedatives such as alpha-2 adrenergics (xylazine, medetomidine, romifidine, etc.) to reduce the muscle rigidity provoked by ketamine HCl. Alternatively inhalation anaesthesia involves delivery of the anaesthetic

via the respiratory system. Isoflurane is an inhalation agent, which has high lipid solubility and is rapidly absorbed through the alveoli into the blood stream and into the brain. Generally, cardiac function is better maintained with isoflurane than with the parenteral anaesthetics, although depression of respiration still occurs. There is typically good muscle relaxation with isoflurane and animals recover rapidly from the anaesthesia (Flecknell, 1996).

The present study was focused on the quality of epididymal spermatozoa recovery in cats after the anaesthesia for surgical collection or euthanasia. It was hypothesized that drugs used for anaesthesia or euthanasia during the orchietomy could induce a potential variation on the sperm quality.

It has been reported that acepromazine–tiletamine–zolazepam or propofol anaesthetic protocols exert significant variation for progressive sperm motility and functional membrane integrity when used to collect semen by electroejaculation in peccaries (Souza et al., 2009). In the present study, sperm quality was assessed to clarify the positive or detrimental effects of three different anaesthetic drugs. After an IV injection of barbituric, used for euthanasia, the motility of the fresh epididymal sperm was significantly lower than samples obtained after isoflurane anaesthesia. However, the other parameters measured in fresh samples, as morphology, integrity of acrosome, viability and functional membrane integrity, did not suffer significant differences. Previous studies conducted in rats to evaluate the effect of five different euthanathic agents, i.e. decapitation, ether, halothane, nembutal or CO₂ asphyxiation, support that they do not affect sperm motion (Slott et al., 1994). These results are in contrast to our observations. Nembutal, a barbiturate, was used intraperitoneal at a dosage of 50 mg kg⁻¹ and rats were immediately decapitated. Subsequently, sperm samples were obtained and processed. In that study, although nembutal-treated rats showed lower sperm motility values than with the other treatments, the difference was not significant. We suggest that the high doses used to provoke euthanasia (200 mg kg⁻¹) could be related to the effect on the sperm motility. A study carried out in Chinchilla showed that none of the indices of sperm quality were affected by anaesthesia with ketamine for electroejaculation (Busso et al., 2005). Few studies have evaluated the effects of other volatile substances, as isoflurane. It has been suggested that halothane, a volatile anaesthetic, inhibits flagellar activity by acting at a site other than the dynein ATPase component of the flagellum or at the level of the mitochondrion (Hinkley, 1979). Other studies report that halothane produces no adverse effects on mice and rat male fertility (Bruce, 1973; Kennedy et al., 1976) and it does not increase the proportion of morphologically abnormal spermatozoa in mice (Land et al., 1981). In humans, the sperm exposition (without direct contact) to different concentrations of isoflurane reversibly increased the apparent motility and viability (Wang et al., 2008), as occurs at the present study. As indicate Dietrich et al. (2005), further studies are necessary to determine whether anaesthetics can penetrate the male reproductive system and influence sperm motility directly or other characteristics.

The differences in epididymal sperm motion observed in fresh samples could be associated with a decrease of ATP levels in spermatozoa. The mentioned differences disappeared when frozen-thawed samples were evaluated. Only the functional membrane integrity resulted in significant affects in cats treated with barbiturate, showing lower values than cats treated with ketamine HCl or isoflurane. An effect at the level of spermatozoa membrane may cause a dose-dependent alteration of intracellular calcium concentration (Schulman et al., 2003). In agreement, a study carried out in pony stallions concluded that halothane does not affect the post-thaw motility of epididymal spermatozoa (Schulman et al., 2003). The results obtained in our study suggest that anaesthetic procedures in cats could affect the motility of fresh epididymal sperm, while other membrane-related sperm parameters such as acrosome integrity, sperm viability and functional membrane integrity were affected in frozen-thawed sperm samples. This variation should be taken in account when semen from felines is going to be preserved, although fertility tests are needed to evaluate *in vivo* effect.

References

- Anton, M., Wagner, B., Haubner, R., Bodenstein, C., Essien, B.E., Bonish, H., Schwaiger, M., Gansbacher, B., Weber, W.A., 2004. Use of the norepinephrine transporter as a reporter gene for noninvasive imaging of genetically modified cells. *J. Genet. Med.* 6, 119–126.
- Boivin, J.F., 1997. Risk of spontaneous abortion in women occupationally exposed to anaesthetic gases: a meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* 54, 541–548.
- Bruce, D.L., 1973. Murine fertility unaffected by traces of halothane. *Anesthesiology* 38, 473–477.
- Busso, J.M., Ponzio, M.F., Chiaraviglio, M., Fiol de Cuneo, M., Ruiz, R.D., 2005. Electroejaculation in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. *Res. Vet. Sci.* 78, 93–97.
- Ceyhan, A., Cincik, M., Bedir, S., Ustun, H., Dagli, G., Kalender, H., 2005. Effects of exposure to new inhalational anesthetics on spermatogenesis and sperm morphology in rabbits. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 51, 305–315.
- Dietrich, G.J., Kowalski, R., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Ciereszko, A., 2005. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of *post-mortem* storage and anesthesia. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 1–9.
- Flecknell, P.D., 1996. *Laboratory Animal Anesthesia*, 2nd ed. Academic Press, San Diego (CA).
- Hau, J., Van Hoosier, G.L., 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Hinkley, R.E., 1979. Inhibition of sperm motility by the volatile anesthetic halothane. *Exp. Cell Res.* 121, 435–439.
- Jaloszynski, P., Kujawski, M., Wasowicz, M., Szulc, R., Szyfter, K., 1999. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied *in vitro* using the comet assay. *Mutat. Res.* 439, 199–206.
- Kennedy Jr., G.L., Smith, S.H., Keplinger, M.L., Calandra, J.C., 1976. Reproductive and teratogenic studies with halothane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35, 467–474.
- Land, P.C., Owen, E.L., Linde, H.W., 1981. Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology* 54, 53–56.
- Platz, C.C., Seager, S.W.J., 1978. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 1353–1355.
- Schulman, M.L., Gerber, D., Nurton, J., Guthrie, A.J., Joubert, K., Volkmann, D.H., 2003. Effects of halothane anaesthesia on the cryopreservation of epididymal spermatozoa in pony stallions. *Equine Vet. J.* 35, 93–95.
- Slott, V.L., Linder, R.E., Dyer, C.J., 1994. Method of euthanasia does not affect sperm motility in the laboratory rat. *Reprod. Toxicol.* 8, 371–374.

- Souza, A.L.P., Castelo, T.S., Queiroz, J.P.A.F., Barros, I.O., Paula, V.V., Oliveira, M.F., Silva, A.R., 2009. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 370–375.
- Tasker, L., 2008. *Euthanasia of Companion Animals: Comparisons and Recommendations*. World Society for the Protection of Animals (WSPA), London, UK.
- Wang, L.-J., Wang, X.-H., Sun, H.-J., Xu, B., 2008. Effects of inhalation anaesthetics on human sperm motility and vitality in vitro [letter]. *Br. J. Anaesth.* 101, 883–884.
- Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F., Merlo, B., 2007. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 68, 796–803.

TRABAJO INVESTIGACION 2

Epididymides cool-storage for 12h does not impact on the cat sperm freezeability

E Jiménez, EI Agüera, Y Millán, CC Pérez-Marín

ABSTRACT

Cat is used like animal model to reproduction studies in wildcat species. Sometimes wildcats are found dead and their sperm conservation should be attempted in order to preserve this important genetic source. The present study evaluates the effect of testes and epididymides cool storage at 4°C during 12 h on cat spermatozoa cryopreservation capacity. Ten domestic cats were castrated, and testes and epididymides were immersed into saline at 18°C. They were randomly assigned to two groups. In group A, epididymal samples were immediately processed and frozen in 0.25-ml straws. In group B, testes and epididymides were conserved in saline at 4°C for 12 h and then sperm was frozen. After mincing the tail of epididymides, sperm was diluted into TRIS extender. Epididymal sperm samples were evaluated before and 0 and 6 h post thawing. Motility (subjective), morphology (Diff-Quick), acrosome status (PSA-FITC), sperm viability (SYBR-14) and DNA integrity (acridine orange) were assessed at the 3 times. Although values were lower in group B, initial and h0 values did not showed significant differences between groups in all parameters evaluated. However, significant differences ($p < 0.05$) were observed at h6 post-thawing values between groups for total sperm motility ($29.0 \pm 2.4\%$ vs $13.0 \pm 4.6\%$, A vs B, respectively) and normal morphology ($47.6 \pm 0.8\%$ vs $40.0 \pm 2.1\%$, A vs B, respectively). In conclusion, these results support that tom genital storage during 12 h at 4°C prior cryopreservation did not affected the immediately post thawing sperm quality.

INTRODUCTION

Freezing sperm is a potential tool to preserve the genetical material in felid species, which are seriously threatened. Sometimes, the sudden death of individuals makes difficult the recovery of sperm and cryopreservation. In these cases, the refrigeration of samples, transportation throughout the specialized laboratory and subsequent sperm freezing could result in a better cryopreservation of this genetical material, which in other situation might not be preserved.

Some studies reveal that sperm of cat is very resistance and can be maintained for some days under refrigeration with good sperm quality throughtout the time (Harris et al, 2001). In the mentioned situations, spermatozoa are protected by different extenders, and later are frozen. The storage of cat spermatozoa within the epididymis in cat has demonstrated no alteration on motility and freezeability (Goodrowe and Hay, 1993). Similarly, Toyonaga et al. (2010) maintained epididymides at 4°C during 72 h and observed that spermatozoa could be frozen during the first 24 h, based in the determination of sperm motility, viability and abnormality. Other study (Chatdarong et al, 2006) describes the effects of pre-freeze cold storage on viability of cat epididymal sperm, although epididymal sperm were collected immediately after castration, diluted in Egg-yolk Tris-glucose containing 3% glycerol, and cooled at 4°C in the refrigerator for 6 days. Success pregnancy results were obtained using 24h-cooled sperm by artificial insemination (AI) in queen, reporting that unilateral intratubal AI is more efective than unilateral intrauterine AI (Toyonaga et al, 2011).

The present study evaluates the effect of testes and epididymides cool storage at 4°C during 12 h on cat spermatozoa cryopreservation capacity, in order to generate knowledge to preserve sperm in wild or domestic feline which suffer a repentine accidents or death.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mature domestic cats between 12 to 16 months and weighing 3.1 ± 1.7 kg were assigned to two experimental groups. The study was conducted in Cordoba (Spain) from 2008 to 2009. Experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation.

Sperm recovery

After orchietomy, vasa deferentia were tied and the testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature. Within 1 h of collection, blood vessels were removed and epididymides and proximal vasa deferentia were isolated. Spermatozoa were collected by mincing the cauda epididymides in 3 mL Dulbecco's phosphate buffered saline (dPBS) (Oxoid, Hampshire, England) (osmolality, 260-290 mOsm) at 38°C. After 10 min the washed tissue was filtered to obtain spermatozoa, and 3 mL dPBS were used to rewash the tissue retained in the filter. Then, the initial evaluation after collection for vigor and motility, morphology, acrosome status, viability and functional integrity of the sperm membrane was carried out as described below. Samples exhibiting motility lower than 50% were discarded for this study.

Samples were randomly assigned to two groups. In group A, epididymal samples were immediately processed and frozen in 0.25-ml straws, while in group B, testes and epididymides were conserved in saline at 4°C for 12 h and then sperm was frozen.

After mincing the tail of epididymides, sperm was diluted into TRIS extender.

After initial evaluation in dPBS medium, sperm sample was centrifuged at 300 X g for 8 min. The sperm pellet was resuspended with 700 μ l TRIS extenders at 20°C. Then, sperm samples were cooled to 4°C (at a rate of 0.3°C/min) using a controlled refrigerator with digital thermometer. Finally, 700 μ l of extender was added to the sperm sample. Equex STM paste (Minitub Ibérica, Tarragona, Spain) was added after cooling to a final dilution of 0.5% as a protection for sperm membranes. The final concentration of glycerol was 4%.

Sperm doses were prepared at a final concentration of approximately 5×10^6 spermatozoa in 250 μ l-straws and after be maintained for 15 min, they were

suspended horizontally over liquid nitrogen (LN) vapours for 10 min and subsequently immersed in LN.

For thawing, straws were placed in a 38°C water bath for 30 s and diluted 1:1 in the extender.

Sperm assessment

Freshly diluted, cooled and frozen-thawed sperm samples were evaluated for vigor and motility, morphology, acrosome status and viability (live cells); DNA integrity was evaluated in frozen-thawed sperm samples. Initial values were obtained after epididymal sperm recovery using dPBS medium, and cooling and frozen-thawed spermatozoa were assessed after dilution in different extenders.

Before sperm assessment, samples were maintained at 38°C for 5 min. Then, 10 µL of epididymal sperm samples were placed on a warm glass slide and the percentage of total and progressive motility were evaluated subjectively at X 100 magnification. Vigor of velocity was also estimated, using the scale from 0 (no movement) to 5 (rapid, steady forward movement) described by Platz and Seager (1978). Sperm morphology was studied in smears stained with a Romanowski stain (fixant, eosin and blue solutions for fast staining, Panreac, Barcelona, Spain). A total of 200 spermatozoa in each smear were analyzed under a light microscope at X 1000 magnification with immersion oil. The percentages of normal and abnormal spermatozoa were determined, according to Howard et al. (1990).

Acrosome integrity was evaluated after staining with *Pisum Sativum* Agglutinin conjugated with fluorescein isothiocyanate (PSA-FITC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), using epifluorescent microscopy (magnification X 400, immersion oil) (Filliers et al. 2008). In brief, 25 µL of sperm suspension was washed in 200 µL of HEPES-TALP and centrifuged (2 min, 500 X g). After removal of the supernatant, the sperm pellet was resuspended in 50 µL absolute ethyl alcohol (EtOH), cooled for 30 min in the refrigerator, and then 50 µL of EtOH was added again to the suspension. A 20 µL aliquot of the resultant suspension was smeared onto a glass microslide and allowed to air-dry. Then, 20 µL of PSA-FITC (2 mg PSA-FITC diluted in 2 mL dPBS) was added and held for 15 min at 4°C. Subsequently, the spermatozoa on the glass slide were washed with fresh water and two hundred spermatozoa were evaluated. Acrosome intact spermatozoa were characterized by intense green fluorescence in the acrosomal area, while for acrosome reacted spermatozoa, fluorescence was restricted to the equatorial area.

Sperm viability was determined by SYBR-14 and propidium iodine (PI) (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) and evaluated by use of Leica DMR fluorescent microscopy (magnification X 400 immersion oil). Briefly, a stock solution of 1 mmol L⁻¹ SYBR-14 reagent was diluted (1:50) in HEPES-TALP, stored frozen at -20°C and thawed just before use. A mixture of 2 µL sperm suspension and 200 µL HEPES-TALP was incubated with 1.25 µL SYBR-14 and 1.25 µL PI, a 10 µL aliquot was removed, placed on a microslide and mounted under a cover-slip. It was incubated for 10 min at 38°C in

darkness. Spermatozoa with an intact plasma membrane stain fluorescent green with SYBR-14, while those with a damaged membrane exhibit red fluorescence. Moribund or slightly damaged spermatozoa exhibit a dual-staining pattern and were counted as cells with a damaged membrane. For each sample, at least 200 spermatozoa were assessed in duplicate.

An adapted method of evaluation of sperm DNA integrity using acridine orange (AO) was utilized (Thuwanut et al. 2008). Briefly, a 10- L sperm sample was previously fixed in methanol-glacial acetic acid (Carnoy's solution; 3:1; v:v). It was dipped into AO staining solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) for 5 min and evaluated under an epifluorescent microscope. Two hundred spermatozoa were evaluated and classified based on the fluorescence emitted, i.e. spermatozoa with normal DNA integrity emitted green fluorescence and denatured or single-stranded DNA showed orange, yellow, or red fluorescence.

Sperm assessment was carried out in fresh samples, after cooling and after freezing (0 and 6 h after thawing). Thawed sperm samples were kept into the incubator at 38°C until the evaluation.

Statistical analysis

Data obtained for fresh and frozen-thawed epididymal sperm were tested for homogeneity of variance using Levene's test. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) for vigor and motility, morphology, percentage of intact acrosome, viability, and DNA integrity, followed by Tukey's post-hoc test. Comparisons were carried out between extenders and within each extender for different cryopreservation times.

The SPSS 15.0 package (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. All results are presented as mean \pm SEM. The significance level was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

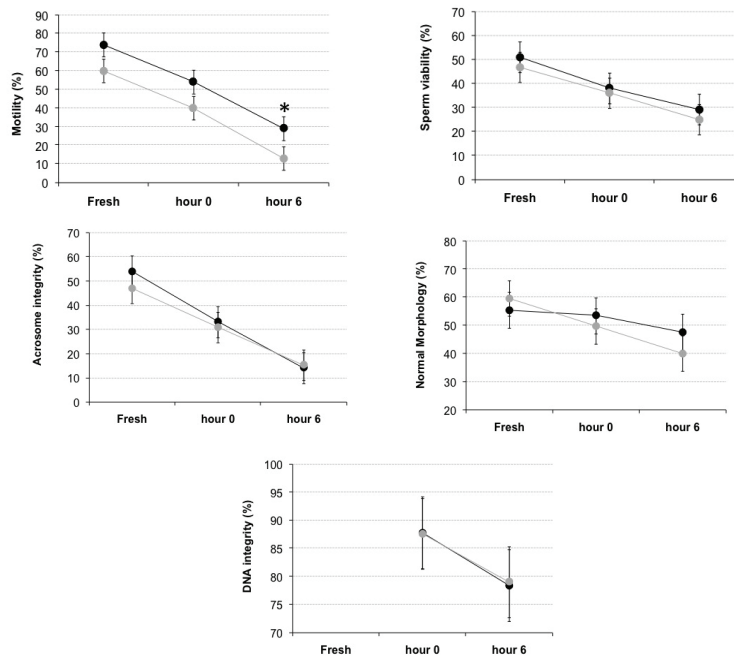
Although values were lower in group B, initial and h0 values did not showed significant differences between groups in all parameters evaluated. However, significant differences ($p < 0.05$) were observed at h6 post-thawing values between groups for total sperm motility ($29.0 \pm 2.4\%$ vs $13.0 \pm 4.6\%$, A vs B, respectively) and normal morphology ($47.6 \pm 0.8\%$ vs $40.0 \pm 2.1\%$, A vs B, respectively) (Table 1).

Sperm parameter	Group	Assessment time		
		Fresh	After thawing	
			hour 0	hour 6
Motility	A	74.0 ±6.4	54.0 ±4.0	29.0 ±2.4 a
	B	60.0 ±4.4	40.0 ±6.3	13.0 ±4.6 b
Sperm viability	A	51.0 ±2.9	38.0 ±2.0	29.2 ±2.8
	B	46.8 ±4.4	36.0 ±2.5	25.0 ±3.2
Morphology	A	55.4 ±3.4	53.4 ±2.2	47.6 ±0.8 a
	B	59.6 ±2.8	49.6 ±2.6	40.0 ±2.1 b
Acrosome status	A	54.0 ±2.0	33.0 ±1.9	14.0 ±1.2
	B	47.0 ±2.0	30.8 ±2.1	15.2 ±1.6
DNA integrity	A	na	87.8 ±0.6	78.4 ±0.4
	B	na	87.6 ±1.3	79.0 ±1.2

na: not assessed.

a, b indicated significant differences ($p < 0.05$) between groups.

Table 1. Fresh and after thawing sperm characteristics of epididymal samples immediately processed after castration (group A) or stored for 12h at 4°C (group B) for sperm freezing (mean ±SE).



DISCUSSION

The cauda epididymides of live animals provide an excellent environment for sperm storage in a quiescent state. Thus, spermatozoa stores within this structure retain their motility and fertilizing ability (Young 1931, White 1993, Paufler et al, 1968). Studies conducted in other species have shown that when males or testes are conserved by refrigeration after death, sperm remain viable and with fertilizing ability for extended periods of time and can be successfully cryopreserved. And studies conducted in male cats demonstrated that epididymides could be stored at 4°C for 24h and sperm could maintain their quality after frozen (Toyonaga et al., 2010). The present study evaluates the effect of the epididymal storage on the freezability for 6 hours.

Previous studies demonstrate that the cat sperm is very resistant to the refrigeration. When samples are maintained at 4°C into or out of the epididymides for different periods of time, sperm maintain their characteristics without a significant drop in this quality. However, the present study reveals that the motility of frozen-thawed sperm after 12h of cooling suffer a significant drop after 6 hours, in comparison with epididymal samples freezed immediately after castration.

It has been reported that sperm abnormalities are higher when epididymides were stored for 24 h (Hay and Goodrowe 1993) or 48 h (Toyonaga et al, 2010) than in samples freezed without storage. In the present study, sperm morphology in epididymal samples processed after castration was similar than epididymides maintained at 4°C for 12h. Differences between studies could be attribute to the storage medium, evaluation method and freezing method, with special attention to the extender composition.

Equex paste seems to effectively protect membrane and acrosome damages caused by chilling and freezing (Axner et al., 2004). After thawing, the percentages of normal acrosome in both groups did not show differences at thawing (hour 0 and 6), assessed by PSA-FITC fluorescent dye.

As described in reed (Soler et al, 2005), the post-thawed sperm motility falls more markedly than others sperm parameters after storage during 24 h of the gonads. It has been suggested that changes occur in the environment that surrounds to epididymal spermatozoa as consequence of the death and then more negative effects are observed on post-thawed motility than on others sperm characteristics.

DNA integrity is essential for the accurate trasmission of genetic information, but few studies assessed DNA in cat sperm. Significant differences were not observed between both studied groups and during 6 h after thawing.

Although the sperm characteristics did not were affected after freezing, the sperm assessment after 6 hours demonstrates a detrimental effect on the sperm motility, and recomends the use of this sperm as soon as posible. Toyonaga et al (2011) demonstrate that better pregnancy rates are obtained after intratubal than intrauterine insemination when frozen-thawed sperm collected from the caudal epididymides that have been stored at a low temperature for 24h. Our find could partially explain this results, since the shorter pathway that spermatozoa must run

after UTAI could be determinant to get good fertilization results, since the sperm motility was significantly reduced after 6 h post-thawing.

The present study was observed that acceptable sperm values are obtained after 24h of reproductive specimen refrigeration at 4°C. And epididymal sperm characteristics in cat are preserved during 6 h after thawing, except motility, which is significantly reduced. Our finding supports the idea that after death, epididymides and testis should be removed and maintained in saline. Although sperm should be collected as soon as possible from epididymides (cauda segment), samples could be maintained for at least 12 h, maintaining the sperm quality. However, this sperm should be utilized rapidly after thawing, because it was observed than sperm motility was significantly reduced after 6 hours. This observation remarks that the AI technique should be improved and sperm must be deposited near to the oviduct, to avoid an important reduction of sperm motility.

REFERENCES

- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM past and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2004; 84: 179-191.
- Chatdarong K, Ponglowhapan S, Manee-in S, Pongphet K. The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. *Theriogenology*, 2006; 66: 1615-1617.
- Goodrowe KL, Hay M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 1993; 40: 967-975.
- Harris RF, Pope CE, Gómez MC, Leibo SP, Dresser BL. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology*, 2001; 55: 308.
- Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of capacitation of spermatozoa from epididymis and vasa deferentia of domestic cat. *J Reprod Fertil*, 1993; 47: 297-305
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*, 1990; 11: 204-215.
- Paufler S, Foote RH. Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. *J Reprod Fertil*, 1968; 17: 125-137.
- Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc*, 1978; 173: 1353-1355.
- Soler AJ, Estes MC, Fernandez-Santos MR, Garde JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elephus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, 2005; 64: 1503-1517.

Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axnér E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, 2008; 70: 233-240.

Toyonaga M, Sato Y, Morita M, Watanabe M, Oba H, Mizutani T, Hori T, Tsutsui T. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J Vet Med Sci*, 2010; 72: 777-780.

Toyonaga M, Sato Y, Sasaki A, Kaihara A, Tsutsui T. Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*, 2011; 76: 532-537.

White WE. The duration of fertility and the histological changes in the reproductive organs after ligation of the vas efferentia in the rat. *Proc R Soc Lond B*, 1993; 113: 554-560.

Young WC. A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens in the ginea-pig. *J Exp Biol*, 1931; 8: 151-62.

TRABAJO INVESTIGACION 3

Effect of different extenders on *in vitro* characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation.

Reproduction in Domestic Animals. Article first published online: 16 JAN 2013,

DOI: 10.1111/rda.12142

E. Jiménez, C. C. Pérez-Marín, G. Vizuete, Y. Millán, E.I. Agüera

Effect of Different Extenders on *In Vitro* Characteristics of Feline Epididymal Sperm During Cryopreservation

E Jiménez¹, CC Pérez-Marín¹, G Vizuete¹, Y Millán² and EI Agüera³

¹Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Cordoba, Spain; ²Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Cordoba, Spain; ³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Cordoba, Spain

Contents

To evaluate and compare the efficacy of various extenders for the cryopreservation of epididymal cat spermatozoa, two experiments were planned. Bovine and equine commercial extenders in the experiment 1 and TRIS–egg yolk–based extenders in experiment 2 were separately studied since the number of sperm collected per cat is reduced. Epididymal sperm samples were packaged into 0.25-ml straws and frozen. Vigour, motility, morphology, acrosome status, sperm viability and functional membrane integrity were assessed at collection, after cooling and after thawing, while DNA integrity was evaluated at 0- and 6-h post-thaw. Experiment 1 compared the effect of three non-feline commercial extenders – based on TRIS–egg yolk (Triladyl), egg-yolk-free medium (AndroMed) and skimmed milk-egg yolk (Gent) – on the quality of frozen-thawed epididymal cat sperm. Values for sperm motility and functional membrane integrity in cooled sperm diluted in Triladyl were higher ($p < 0.001$) than those recorded for Andromed and Gent. Except sperm morphology, the other assessed characteristics showed significant higher values in frozen-thawed sperm diluted in Triladyl than in Andromed and Gent extenders. Experiment 2 analysed the effects of three TRIS–egg yolk–based extenders, one non-feline commercial (Triladyl) and the other two prepared using different monosaccharides (glucose and fructose), on freezing-thawed sperm. Results showed that specifically prepared extenders for cryopreservation of feline spermatozoa performed better than the commercial extender Triladyl, although sperm quality during the freezing-thawing process did not significantly differ associated with the type of monosaccharide (glucose vs fructose) added to the mentioned extenders. Although TRIS–egg yolk–based extenders prepared in experiment 2 improved sperm cryoprotection, Triladyl remains a good option for practitioners who, for ease of use and availability, prefer to work with commercial extenders.

Introduction

The current interest in developing techniques for the preservation of feline spermatozoa reflects not only the need for improved methods than can be extrapolated to *ex-situ* wildcat conservation programmes, but also – given the increasing number of cats kept as pets – the demand for improved sperm cryopreservation and other breeding techniques. Previous research has shown that feline sperm can be frozen (Tsutsui et al. 2003; Tebet et al. 2006; Cocchia et al. 2010), but spermatozoa cryopreservation is associated with a reduction in cell viability and fertilizing capacity (Pukazhenthil et al. 2000). According to the literature, the TRIS-based extender is the hitherto most widely used for freezing feline sperm, although in the absence of feline-specific commercial extenders, there remains a need for easier-to-use diluents and techniques.

Numerous factors affect the sperm quality during freezing-thawing process, and one of them is the extender composition (Axner et al. 2004; Thuwanut et al. 2008; Zambelli et al. 2010). Different proportions of glycerol (Baran et al. 2004), sodium dodecyl sulphate (SDS) (Axner et al. 2004; Zambelli et al. 2010), egg yolk (Glover and Watson 1987; Hermansson and Axner 2007) and different types of sugar (Glover and Watson 1987) have been added to feline extenders, affecting on the sperm quality.

Studies in cat spermatozoa preservation have demonstrated that motility is more sensitive than membrane integrity to changes in osmolality (Pukazhenthil et al. 2000). Although these spermatozoa appear resistant to hypertonic stress, they undergo extensive loss of membrane integrity after returning to isotonic conditions (Pukazhenthil et al. 2000). More delicate plasma membrane in epididymal sperm could be linked to the absent of contact with seminal plasma, provoking a less resistant to the freeze-thaw procedure than spermatozoa obtained by electroejaculation. A protective effect of Equex STM paste on feline epididymal spermatozoa acrosomes has been also shown, while a negative effect on sperm membranes and motility occurs during *in vitro* incubation (Axner et al. 2004), and therefore, the protective effect of Equex STM paste is more pronounced when pre-freeze exposure is brief (Peña and Linde-Forsberg 2000). As occurs during cooling, pre-frozen ejaculates also contain a consistently high proportion of sperm with morphologically deformed acrosomes. These anomalies could further increase susceptibility to irreversible membrane damage after cooling and/or rewarming (Pukazhenthil et al. 1999).

Mammalian spermatozoa need to optimize energy consumption to enhance flagellar contractility and thus ensure adequate motility. Sugars have long been included in sperm diluents as exogenous energy substrates, as osmotic components and as cryoprotective agents (Watson 1979). However, monosaccharide concentrations should be kept moderate, to prevent high sugar concentrations in the extender from saturating the energy-obtaining machinery of the spermatozoa (Rigau et al. 2001). Although all species can use most monosaccharides, there may be differences in metabolism (Rikmenspoel and Caputo 1966). Fructose and glucose are known to be the major energy source for ejaculated spermatozoa, and are common in seminal plasma, although not in all mammalian species (Ponglowhapan et al. 2004). Seminal plasma in cats does not contain monosaccharides (Johnston et al. 1988), and it is possible that the exposure to these sugars occurs in the female

genital tract, serving as a mechanism to induce sperm motility patterns, as has been reported in dogs (Rigau et al. 2001). In cat, fructose (Cocchia et al. 2010; Toyonaga et al. 2010; Baran et al. 2011) and glucose (Siemieniuch and Dubiel 2007; Thuwanut et al. 2008; Chatdarong et al. 2010; Zambelli et al. 2010) are the sugars that are routinely added to sperm freezing extenders. However, while the effects of different sugars (glucose, fructose and galactose) on the survival of cat spermatozoa at 5°C have been analysed (Glover and Watson 1987), no previous studies have been developed in this specie to compare the effect of sugars supplementation on the sperm quality during freezing-thawing process.

The present study compares the effects of non-feline-specific commercial extenders and TRIS–egg yolk–based extenders (containing glucose or fructose) prepared for cat on epididymal sperm quality during freezing-thawing process.

Materials and Methods

Animals

Mature domestic cats between 9 and 24 months and weighing 3.0 ± 1.5 kg were assigned to two experimental groups. The study was conducted in Cordoba (Spain) from 2006 to 2008. Experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation.

Sperm recovery

After orchietomy, vasa deferentia were tied, and the testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature. Within 1 h of collection, blood vessels were removed, and epididymides and proximal vasa deferentia were isolated. Spermatozoa were collected by mincing the cauda epididymides in 3-ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (dPBS) (Oxoid, Hampshire, England) (osmolality, 260–290 mOsm) at 38°C. After 10 min, the washed tissue was filtered to obtain spermatozoa, and 3 ml dPBS were used to rewash the tissue retained in the filter. Then, the initial evaluation after collection for vigour and motility, morphology, acrosome status, viability and functional integrity of the sperm membrane was carried out as described below. Samples exhibiting motility lower than 50% were discarded for this study.

Sperm extenders and freezing-thawing procedures

Experiment 1. Comparison of non-feline commercial extenders

A total of 11 toms were castrated, and their epididymides were used for this study. After initial evaluation in dPBS medium, sperm sample was divided into three aliquots containing 2 ml, and centrifuged at $300 \times g$ for 8 min. The sperm pellet was resuspended with 700 µl of three non-feline commercial extenders (Table 1) at 20°C:

Table 1. Non-feline commercial extenders utilized

	For cooling	For freezing	For thawing
Triladil (T) ^a	Commercial medium, supplemented 20% egg yolk (T-I) 1325 ± 14 mOsm	T-I + 1% Equex 1340 ± 9 mOsm	T-I
AndroMed (A) ^b	Commercial (egg yolk-free) medium (A-I) 1446 ± 12 mOsm	A-I	A-I
Gent (G) ^c	Commercial medium (G-I) 1040 ± 11 mOsm	G-I + 1% Equex 1089 ± 18 mOsm	G-I

^a, ^b, ^cMinitub Ibérica, Tarragona, Spain.

- Extender T: Triladyl (Minitub Ibérica, Tarragona, Spain), a diluent for bovine semen freezing. Triladyl contains TRIS, citric acid, sugars, glycerol, buffers, purest water and antibiotics in accordance with EU Directive 88/407 (tylosin, gentamicin, spectinomycin and lincomycin). It was supplemented with 20% egg yolk. The osmolality of this extender was 1325 (±14) mOsm.
- Extender A: AndroMed (Minitub Ibérica), an egg-yolk-free medium (absence of components of animal origin) for bovine semen freezing, containing glycerol. Osmolality was 1446 (±12) mOsm.
- Extender G: Gent (Minitub Ibérica), a skimmed milk-based extender available for stallion semen freezing, containing egg yolk and glycerol, osmolality 1040 (±11) mOsm.

Then, sperm samples were cooled to 4°C (at a rate of 0.3°C/min) using a controlled refrigerator with digital thermometer. Finally, 700 µl of freezing extenders (Table 1) was added to the sperm sample. Equex STM paste (Minitub Ibérica), included into the egg-yolk-based freezing diluents (i.e. T and G), was added after cooling to a final dilution of 0.5% as a protection for sperm membranes. The osmolality of T and G freezing extender was 1340 (±9) mOsm and 1089 (±18) mOsm, respectively.

Sperm doses were prepared at a final concentration of approximately 5×10^6 spermatozoa in 250-µl straws and after being maintained for 15 min, they were suspended horizontally over liquid nitrogen (LN) vapours for 10 min and subsequently immersed in LN.

For thawing, straws were placed in a 38°C water bath for 30 s and diluted 1 : 1 in their respective commercial extender.

Experiment 2. Comparison of TRIS–egg yolk–based extenders

A total of 12 pairs of epididymides were used for this study. Semen was processed as described in Experiment 1. The sperm pellet was resuspended with 700 µl of three different TRIS-based diluents (at 20°C): T (commercial extender Triladyl, as described above), T-G (TRIS-based extender supplemented with glucose) and T-F (TRIS-based extender supplemented with fructose) (Table 2). Sample was cooled to 4°C (at a rate of 0.3°C/min) and after that, it was diluted 1 : 1 in freezing

Table 2. Composition of TRIS–egg yolk–based extenders prepared for cat sperm freezing (diluted in distilled water to 100 ml)

	For cooling		For freezing		For thawing	
	T-G I	T-F I	T-G II	T-F II	T-G III	T-F III
TRIS (g) ^a	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Citric acid (g) ^b	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Glucose (g) ^a	0.8	-	0.8	-	0.8	-
Fructose (g) ^a	-	0.8	-	0.8	-	0.8
Glycerol (mL) ^b	-	-	8.0	8.0	-	-
Egg yolk (mL)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Equex STM paste (mL) ^c	-	-	1.0	1.0	-	-
Taurine (g) ^a	0.626	0.626	0.626	0.626	-	-
Benzilpenicillin sodium (g) ^a	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Streptomycin (g) ^a	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Osmolality (mOsm)	848 ± 15	743 ± 16	1074 ± 25	1062 ± 11	862 ± 9	846 ± 12

^aSigma Chemical Co., St. Louis, USA.

^bPanreac, Barcelona, Spain.

^cMinitub Ibérica, Tarragona, Spain.

extender (Trilady+Equex1%, T-G II and T-F II), yielding a final dilution of 0.5% Equex STM paste. The final concentration of glycerol was 4% for samples diluted in T-G II and T-F II.

Sperm doses and freezing-thawing procedures were similar to those described above. Straws were diluted 1 : 1 in their respective thawing extenders (T-I, T-G III and T-F III).

Sperm assessment

Freshly diluted, cooled and frozen-thawed sperm samples were evaluated for vigour and motility, morphology, acrosome status, viability (live cells) and functional integrity of the sperm membrane; DNA integrity was evaluated in frozen-thawed sperm samples. Initial values were obtained after epididymal sperm recovery using dPBS medium, and cooling and frozen-thawed spermatozoa were assessed after dilution in different extenders.

Before sperm assessment, samples were maintained at 38°C for 5 min. Then, 10 µl of epididymal sperm samples were placed on a warm glass slide, and the percentage of total and progressive motility were evaluated subjectively at ×100 magnification. Vigour of velocity was also estimated, using the scale from 0 (no movement) to 5 (rapid, steady forward movement) described by Platz and Seager (1978). Sperm morphology was studied in smears stained with a Romanowski stain (fixant, eosin and blue solutions for fast staining, Panreac, Barcelona, Spain). A total of 200 spermatozoa in each smear were analysed under a light microscope at ×1000 magnification with immersion oil. The percentages of normal and abnormal spermatozoa were determined, according to Howard et al. (1990).

Acrosome integrity was evaluated after staining with Pisum Sativum Agglutinin conjugated with fluorescein isothiocyanate (PSA-FITC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), using epifluorescent microscopy (magnification ×400, immersion oil) (Filliers et al. 2008). In brief, 25 µl of sperm suspension was washed in 200 µl of Hepes-TALP and centrifuged (2 min, 500 × g). After removal of the supernatant, the sperm pellet was resuspended in 50 µl absolute ethyl alcohol

(EtOH), cooled for 30 min in the refrigerator, and then 50 µl of EtOH was added again to the suspension. A 20 µl aliquot of the resultant suspension was smeared onto a glass microslide and allowed to air-dry. Then, 20 µl of PSA-FITC (2 mg PSA-FITC diluted in 2 ml dPBS) was added and held for 15 min at 4°C. Subsequently, the spermatozoa on the glass slide were washed with fresh water, and two hundred spermatozoa were evaluated. Acrosome intact spermatozoa were characterized by intense green fluorescence in the acrosomal area, while for acrosome-reacted spermatozoa, fluorescence was restricted to the equatorial area.

Sperm viability was determined by SYBR-14 and propidium iodide (PI) (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) and evaluated by the use of Leica DMR fluorescent microscopy (magnification ×400 immersion oil). Briefly, a stock solution of 1 mM SYBR-14 reagent was diluted (1 : 50) in Hepes-TALP, stored frozen at -20°C and thawed just before use. A mixture of 2 µl sperm suspension and 200 µl Hepes-TALP was incubated with 1.25 µl SYBR-14 and 1.25 µl PI, a 10 µl aliquot was removed, placed on a microslide and mounted under a cover-slip. It was incubated for 10 min at 38°C in darkness. Spermatozoa with an intact plasma membrane stain fluorescent green with SYBR-14, while those with a damaged membrane exhibit red fluorescence. Moribund or slightly damaged spermatozoa exhibit a dual-staining pattern and were counted as cells with a damaged membrane. For each sample, at least 200 spermatozoa were assessed in duplicate.

Hypo-osmotic swelling test was used to evaluate the functional integrity of the sperm membrane. Briefly, 5 µl of sperm or a diluted sperm suspension was mixed with 50 µl of a hypo-osmotic sodium citrate solution (100 mOsm/kg) and incubating the mixture at room temperature for 25 min. The samples were then fixed in 2% glutaraldehyde/cacodylate and evaluated under phase-contrast microscopy at ×400 magnification by counting 200 spermatozoa. The sperm membrane was considered to be intact if the sperm tail was coiled at the end of the assay, and the result was expressed as the percentage positive endosmosis.

An adapted method of evaluation of sperm DNA integrity using acridine orange (AO) was utilized (Thuwant et al. 2008). Briefly, a 10- μ l sperm sample was previously fixed in methanol-glacial acetic acid (Carnoy's solution; 3 : 1; v : v). It was dipped into AO staining solution (Sigma Chemical Co.) for 5 min and evaluated under an epifluorescent microscope. Two hundred spermatozoa were evaluated and classified based on the fluorescence emitted, that is, spermatozoa with normal DNA integrity emitted green fluorescence and denatured or single-stranded DNA showed orange, yellow or red fluorescence.

Sperm assessment was carried out in fresh samples, after cooling and after freezing (0, 2, 4 and 6 h after thawing). For DNA integrity, samples were only analysed at thawing and 6 h later. Thawed sperm samples were kept into the incubator at 38°C until the evaluation.

Statistical analysis

Data obtained for fresh and frozen-thawed epididymal sperm were tested for homogeneity of variance using Levene's test. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) for vigour and motility, morphology, percentage of intact acrosome, viability, functional integrity of the sperm membrane and DNA integrity, followed by Tukey's *post-hoc* test. Comparisons were carried out between extenders and within each extender for different cryopreservation times.

The SPSS 15.0 package (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. All results are presented as mean \pm SEM. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

Experiment 1. Comparison of non-feline commercial extenders

Table 3 shows the effect of three non-feline commercial extenders on epididymal sperm quality.

A significant reduction in motility-related parameters was observed during freezing process with respect to the initial values ($p < 0.05$). Also, significant differences were detected between extenders ($p < 0.001$). While the T extender exhibited higher sperm motility values, a drastic fall in motility-related values for sperm diluted in A and G extenders after cooling were observed.

A significant deterioration was observed in sperm viability over time ($p < 0.001$). At cooling, sperm viability did not show significant differences ($p > 0.05$) between extenders. However, spermatozoa suspended in T maintained a better viability during the post-thawing period tested ($p < 0.05$) than the other extenders. Spermatozoa diluted in T displayed a higher percentage of intact acrosomes, but significant differences ($p < 0.05$) between extenders were become at 0, 2 and 6 h after thawing. Functional membrane integrity was negatively affected by dilution in the A and G extenders, in comparison with the T extender ($p < 0.05$). No variations in sperm morphology were observed between extenders. However, the percentage of morphologically normal spermatozoa was significantly lower when sperm was incubated for 6 h. The percentage of spermatozoa exhibiting DNA damage was significantly higher in samples diluted in AndroMed and Gent extenders ($p < 0.001$), and post-thawing incubation also significantly

Table 3. Effect of different non-feline commercial extenders on epididymal sperm characteristics of cat during different times of the cryopreservation process (mean \pm SEM)

	Fresh ^f	Cooling	Thawing				
			Hour 0	Hour 2	Hour 4	Hour 6	
Vigour	4.1 \pm 0.2 ^a	Triladyl	3.5 \pm 0.2 ^{bc 1}	3.5 \pm 0.2 ^{ab 1}	3.2 \pm 0.2 ^{bc 1}	2.8 \pm 0.1 ^{bc 1}	2.5 \pm 0.1 ^{c 1}
		AndroMed	1.2 \pm 0.5 ^{b 2}	1.7 \pm 0.4 ^{b 2}	1.3 \pm 0.4 ^{b 2}	0.9 \pm 0.3 ^{b 2}	0.7 \pm 0.3 ^{b 2}
		Gent	1.5 \pm 0.5 ^{b 2}	1.5 \pm 0.5 ^{b 2}	1.4 \pm 0.5 ^{b 2}	1.2 \pm 0.4 ^{b 2}	1.0 \pm 0.4 ^{b 2}
Total sperm motility (%)	73.6 \pm 2.0 ^a	Triladyl	57.3 \pm 4.3 ^{b 1}	51.8 \pm 3.5 ^{b 1}	38.2 \pm 3.3 ^{bc 1}	28.2 \pm 3.1 ^{c 1}	23.6 \pm 2.3 ^{c 1}
		AndroMed	20.9 \pm 8.5 ^{b 2}	25.9 \pm 5.0 ^{b 2}	14.1 \pm 5.4 ^{b 2}	9.6 \pm 4.3 ^{b 2}	6.4 \pm 3.6 ^{b 2}
		Gent	26.4 \pm 9.8 ^{b 2}	24.6 \pm 7.4 ^{b 2}	12.3 \pm 4.1 ^{b 2}	9.1 \pm 3.2 ^{b 2}	7.3 \pm 2.6 ^{b 2}
Progressive sperm motility (%)	54.5 \pm 4.1 ^a	Triladyl	42.7 \pm 5.6 ^{ab 1}	35.5 \pm 2.8 ^{bc 1}	22.7 \pm 2.6 ^{cd 1}	14.1 \pm 2.1 ^{d 1}	11.4 \pm 1.9 ^{d 1}
		AndroMed	15.5 \pm 6.9 ^{b 2}	12.9 \pm 4.0 ^{b 2}	6.4 \pm 2.9 ^{b 2}	4.6 \pm 2.5 ^{b 2}	2.9 \pm 1.9 ^{b 2}
		Gent	16.4 \pm 6.6 ^{b 2}	10.5 \pm 2.8 ^{b 2}	5.9 \pm 2.2 ^{b 2}	4.3 \pm 1.5 ^{b 2}	2.7 \pm 1.0 ^{b 2}
Sperm viability (SYBR-14) (%)	77.8 \pm 4.1 ^a	Triladyl	72.0 \pm 3.2 ^a	44.2 \pm 3.6 ^{b 1}	39.6 \pm 4.2 ^{bc 1}	32.8 \pm 4.1 ^{bc 1}	24.7 \pm 3.5 ^{c 1}
		AndroMed	59.9 \pm 5.6 ^b	30.4 \pm 3.0 ^{c 12}	24.2 \pm 3.0 ^{cd 2}	20.6 \pm 3.5 ^{cd 12}	12.7 \pm 1.2 ^{d 2}
		Gent	61.6 \pm 4.5 ^a	25.5 \pm 6.1 ^{b 2}	19.1 \pm 5.0 ^{b 2}	14.3 \pm 4.2 ^{b 2}	8.1 \pm 3.2 ^{b 2}
Functional membrane integrity (%)	73.8 \pm 3.4 ^a	Triladyl	68.6 \pm 4.9 ^{ab 1}	59.0 \pm 4.4 ^{ab 1}	48.6 \pm 3.5 ^{bc 1}	38.4 \pm 3.1 ^{c 1}	29.2 \pm 3.4 ^{c 1}
		AndroMed	66.6 \pm 7.8 ^{a 12}	41.9 \pm 3.0 ^{b 2}	34.6 \pm 2.5 ^{bc 2}	25.4 \pm 2.9 ^{c 2}	20.6 \pm 2.9 ^{c 12}
		Gent	40.6 \pm 9.0 ^{b 2}	40.0 \pm 6.3 ^{b 2}	28.5 \pm 5.0 ^{b 2}	21.2 \pm 3.2 ^{b 2}	16.7 \pm 2.8 ^{b 2}
Intact acrosome (PSA-FITC) (%)	60.9 \pm 2.9 ^a	Triladyl	54.9 \pm 2.3 ^a	32.9 \pm 1.5 ^{b 1}	27.6 \pm 1.6 ^{bc 1}	22.7 \pm 1.6 ^{cd}	15.1 \pm 1.4 ^{d 1}
		AndroMed	51.5 \pm 2.6 ^b	27.8 \pm 1.4 ^{c 2}	23.2 \pm 1.2 ^{cd 2}	19.4 \pm 1.3 ^{de}	12.1 \pm 1.2 ^{e 12}
		Gent	52.2 \pm 2.7 ^b	29.6 \pm 1.4 ^{c 12}	22.9 \pm 0.9 ^{cd 2}	19.3 \pm 1.0 ^d	10.8 \pm 0.6 ^{e 2}
Normal sperm morphology (%)	58.8 \pm 2.0 ^a	Triladyl	56.2 \pm 2.8 ^a	55.5 \pm 1.7 ^a	NA	NA	47.6 \pm 1.8 ^b
		AndroMed	53.9 \pm 3.4 ^a	52.7 \pm 2.4 ^a	NA	NA	45.5 \pm 2.3 ^b
		Gent	58.7 \pm 3.5 ^a	56.5 \pm 3.1 ^a	NA	NA	47.2 \pm 2.6 ^b
DNA integrity (AO) (%)	NA	Triladyl	NA	88.4 \pm 0.9 ^{a 1}	NA	NA	78.9 \pm 1.3 ^{b 1}
		AndroMed	NA	82.6 \pm 1.0 ^{a 2}	NA	NA	73.2 \pm 1.0 ^{b 2}
		Gent	NA	82.6 \pm 0.8 ^{a 2}	NA	NA	72.8 \pm 0.8 ^{b 2}

Significant differences between times are expressed as different superscripts (a, b, c, d, e) within a row ($p < 0.05$).

Significant differences between extenders are expressed as different superscripts (1, 2) within a column ($p < 0.05$).

NA, not assessed.

^fSpermatozoa were diluted in dPBS.

reduced the number of spermatozoa with intact DNA ($p < 0.05$).

Experiment 2. Comparison of TRIS–egg yolk–based extenders

The effects of three TRIS–egg yolk–based extenders on cat epididymal sperm quality (fresh, cooled and frozen-thawed) are shown in Table 4.

No significant differences in sperm motility were detected between extenders. However, values for vigour remained higher and more stable for the T-G and T-F extenders. Vigour values decreased significantly during cooling ($p < 0.01$) when the T extender was used. When sperm was diluted in T-G and T-F, vigour values declined significantly 2 and 4 h after thawing, respectively. Total and progressive motility significantly decreased during the time required for cooling ($p < 0.001$). Fresh sperm diluted in T, T-G and T-F extenders suffered a significant drop in viability ($p < 0.05$) when it was cooled, and values continued to decline after thawing, while no significant differences were detected between extenders. Although no differences between extenders were detected for acrosome integrity at cooling, T-G and T-F extenders maintained a higher percentage of intact acrosomes than T at thawing (hour 0, 2, 4 and 6). From cooling, sperm diluted in T extender showed significantly reduced percentage of functional membrane integrity than sperm samples diluted in T-G and T-F ($p < 0.05$). After 6-h incubation, spermatozoa diluted in T-G and T-F continued to display considerably higher membrane

integrity values than in the T extender, where values dropped to 28.6%. Spermatozoa diluted in the T extender exhibited a significant ($p < 0.05$) lower percentage of spermatozoa with intact acrosomes from thawing to hour 6 of incubation than spermatozoa diluted in the other extenders.

Intact DNA values significantly decreased after 6-h post-thaw incubation ($p < 0.01$), and spermatozoa in T-G and T-F showed a higher rate of DNA integrity than in the T extender ($p < 0.05$).

No significant differences were detected between extenders containing glucose or fructose for any of the assessed sperm parameters.

Discussion

Different freezing extenders were compared at cooling, at freezing and at thawing steps. Two experiments were planned because the reduced number of spermatozoa obtained per cat impeded that one sperm sample were split into five aliquots. Then, this study was divided in one experiment that compared non-feline commercial extenders and other experiment that compared TRIS–egg yolk–based extenders prepared for cat sperm (and using Triladyl as reference). Results showed that the commercial extender Triladyl could be an efficient option for feline sperm dilution in freezing-thawing programmes, based on *in vitro* sperm assessment, but AndroMed and Gent extenders proved ineffective for preserving feline sperm. However, when sperm was diluted in extenders, which were prepared for cats, sperm quality was improved. In this case, no significant

Table 4. Effect of different TRIS-based extenders on epididymal sperm characteristics of cat during different times of the cryopreservation process (mean \pm SEM)

	Fresh ^f	Cooling	Thawing				
			Hour 0	Hour 2	Hour 4	Hour 6	
Vigour	4.3 \pm 0.2 ^a	Triladyl	3.2 \pm 0.3 ^{b 1}	3.4 \pm 0.1 ^{b 1}	3.2 \pm 0.1 ^{bc}	2.8 \pm 0.1 ^{bc 1}	2.5 \pm 0.1 ^c
		TRIS–Glucose	4.1 \pm 0.2 ^{a 2}	3.8 \pm 0.2 ^{ab 2}	3.6 \pm 0.2 ^{ab}	3.1 \pm 0.1 ^{bc 12}	2.7 \pm 0.1 ^c
		TRIS–Fructose	4.2 \pm 0.2 ^{ab 2}	4.1 \pm 0.2 ^{ab 2}	3.6 \pm 0.2 ^{bc}	3.3 \pm 0.1 ^{cd 2}	2.9 \pm 0.2 ^d
Total sperm motility (%)	79.6 \pm 3.0 ^a	Triladyl	51.7 \pm 5.6 ^b	48.3 \pm 4.1 ^{bc}	35.4 \pm 3.1 ^{cd}	24.6 \pm 2.8 ^d	21.7 \pm 2.6 ^d
		TRIS–Glucose	56.7 \pm 6.2 ^b	45.4 \pm 4.5 ^{bc}	39.2 \pm 3.4 ^{bcd}	30.4 \pm 3.8 ^{cd}	23.3 \pm 3.7 ^d
		TRIS–Fructose	55.8 \pm 5.1 ^b	49.2 \pm 4.0 ^{bc}	42.5 \pm 3.8 ^{bc}	35.0 \pm 3.8 ^{cd}	25.4 \pm 3.8 ^d
Progressive sperm motility (%)	67.5 \pm 4.8 ^a	Triladyl	37.5 \pm 5.7 ^b	32.5 \pm 3.3 ^{bc}	20.0 \pm 2.6 ^{cd}	12.9 \pm 1.9 ^d	11.2 \pm 1.8 ^d
		TRIS–Glucose	41.7 \pm 5.8 ^b	31.7 \pm 5.1 ^{bc}	22.7 \pm 3.4 ^{cd}	16.8 \pm 2.7 ^{cd}	9.6 \pm 1.6 ^d
		TRIS–Fructose	35.0 \pm 5.7 ^b	30.4 \pm 3.3 ^{bc}	27.1 \pm 4.3 ^{bc}	21.8 \pm 4.4 ^{bc}	13.7 \pm 2.6 ^c
Sperm viability (SYBR-14) (%)	89.5 \pm 1.5 ^a	Triladyl	70.5 \pm 3.5 ^b	39.9 \pm 4.8 ^c	35.6 \pm 5.0 ^{cd}	29.7 \pm 4.6 ^{cd}	22.9 \pm 3.7 ^e
		TRIS–Glucose	73.1 \pm 4.1 ^b	42.0 \pm 2.9 ^c	35.9 \pm 2.9 ^{cd}	32.2 \pm 3.2 ^{cd}	28.0 \pm 3.1 ^d
		TRIS–Fructose	69.6 \pm 6.1 ^b	36.8 \pm 4.2 ^c	33.3 \pm 3.8 ^c	29.4 \pm 4.0 ^c	25.5 \pm 3.6 ^c
Functional membrane integrity (%)	82.0 \pm 1.8 ^a	Triladyl	62.6 \pm 4.9 ^{ab 1}	50.9 \pm 6.7 ^{bc 1}	40.9 \pm 4.4 ^{cd 1}	36.0 \pm 3.9 ^{cd 1}	28.6 \pm 5.2 ^{d 1}
		TRIS–Glucose	78.0 \pm 3.2 ^{a 2}	65.8 \pm 2.0 ^{b 2}	61.7 \pm 1.7 ^{bc 2}	55.8 \pm 2.1 ^{cd 2}	50.5 \pm 2.4 ^{d 2}
		TRIS–Fructose	76.5 \pm 1.8 ^{a 2}	61.6 \pm 3.1 ^{b 12}	57.8 \pm 2.5 ^{bc 2}	52.5 \pm 2.5 ^{bc 2}	48.6 \pm 3.3 ^{c 2}
Intact acrosome (PSA-FITC) (%)	66.0 \pm 1.9 ^a	Triladyl	55.2 \pm 2.1 ^b	31.9 \pm 1.3 ^{c 1}	27.0 \pm 1.3 ^{c 1}	22.1 \pm 1.4 ^{d 1}	13.9 \pm 1.0 ^{e 1}
		TRIS–Glucose	57.6 \pm 2.0 ^a	42.2 \pm 1.7 ^{b 2}	36.8 \pm 1.9 ^{b 2}	31.8 \pm 1.6 ^{b 2}	22.7 \pm 1.5 ^{c 2}
		TRIS–Fructose	54.3 \pm 2.5 ^b	41.3 \pm 1.8 ^{c 2}	36.4 \pm 1.4 ^{cd 2}	32.3 \pm 1.8 ^{de 2}	23.7 \pm 1.8 ^{e 2}
Normal sperm morphology (%)	54.2 \pm 2.2 ^a	Triladyl	53.1 \pm 1.8 ^a	53.7 \pm 2.0 ^a	NA	NA	47.3 \pm 1.7 ^b
		TRIS–Glucose	50.5 \pm 2.7 ^a	50.1 \pm 2.0 ^a	NA	NA	46.1 \pm 2.3 ^b
		TRIS–Fructose	52.5 \pm 2.5 ^a	51.8 \pm 1.7 ^a	NA	NA	48.3 \pm 1.9 ^b
DNA integrity (AO) (%)	NA	Triladyl	NA	88.3 \pm 0.8 ^{a 1}	NA	NA	77.8 \pm 1.4 ^{b 1}
		TRIS–Glucose	NA	91.7 \pm 1.0 ^{a 12}	NA	NA	85.8 \pm 1.6 ^{b 2}
		TRIS–Fructose	NA	92.2 \pm 1.3 ^{a 2}	NA	NA	86.9 \pm 1.9 ^{b 2}

Significant differences between times are expressed as different superscripts (a, b, c, d, e) within a row ($p < 0.05$).

Significant differences between extenders are expressed as different superscripts (1, 2) within a column ($p < 0.05$).

NA, not assessed.

^fSpermatozoa were diluted in dPBS.

differences in feline sperm quality were detected for either of the monosaccharides (glucose and fructose) added to these extenders.

As no specific commercial extenders are currently available for cats, experiment 1 evaluated the effect of non-feline commercial extenders, designed for cryopreservation of bovine and equine semen, on cat epididymal sperm during the freezing-thawing process.

A significant decline was observed for all sperm parameters from immediately after collection to 6 h after thawing. First differences between extenders were observed during pre-freezing cooling at 4°C for vigour, motility, acrosome status, viability and functional integrity of the sperm membrane. Although motility sperm values for all three commercial extenders fell during cooling, the most marked decline was noted for A and G extenders, which displayed values considered inadequate for sperm freezing. By contrast, the T extender yielded satisfactory values for sperm motility during pre-freezing, and these values were maintained until 2 h after thawing. These results indicated a good response of feline epididymal sperm to the freezing-thawing process when using the T extender, while A and G extenders failed to maintain during freezing-thawing the minimal threshold values required for artificial insemination. Subjective assessment was used to determine the sperm motility. As described by Siemieniuch and Woclawek-Potocka (2008), the number of motile spermatozoa in cat is insufficient for computer-assisted sperm analysis (CASA), in contrast to manual light microscope examination. Although Filliers et al. (2008) reported the motion reference values for fresh and cooled sperm in cat by CASA examination, they assert that this technique is not widely used in feline, and then further improvement is necessary.

Evaluation of sperm vitality using the SYBR-14/PI stain showed that the T extender provided a better protection during cooling than the other commercial extenders, with values higher than those reported by Kashiwasaki et al. (2005). The G extender displayed significantly lower values for sperm vitality than the others. Using the T extender, sperm membranes (assessed by sperm viability, functional membrane integrity and acrosome testing) did not vary until samples were frozen-thawed, as reported elsewhere (Jimenez et al. 2011); spermatozoa diluted in A and G were adversely affected at the cooling stage. Finally, DNA integrity assessed at 0- and 6-h post-thawing showed significant differences in all three commercial extenders, indicating that this parameter was affected by incubation time.

The present study demonstrates that Gent extender, a commercial skimmed-based diluent, affects negatively the sperm quality during the freeze-thaw procedure in cat. However, the use of skimmed-based diluent for cat sperm freezing reported by Baran et al. (2011) contrasts with our findings. Those authors described similar results for sperm motility and morphology and for conception rates when skimmed-based extender was compared with TRIS-based extender. It could be suggested that the bad results obtained in our study with the use of Gent extender for cat sperm freezing might be associated with its commercial composition,

specially designed for other species. As supported by Baran et al. (2011), skimmed milk-based extender may offer similar advantages than TRIS-based extenders for the cryopreservation of cat spermatozoa, and further studies should be conducted.

Is Triladyl, a commercial extender designed for ruminant sperm freezing, a good extender for feline sperm? Results obtained in experiment 1 suggest that it provides greater support to spermatozoa undergoing the various changes involved in the cryopreservation process. Experiment 2 was conducted to compare Triladyl versus TRIS-egg yolk-based extenders prepared for feline sperm and containing different sugar sources. As expected, all sperm values decreased over time, and particularly after freezing, although the magnitude of the decline varied depending of the sperm characteristics assessed. The present study found that, during the cooling process, sperm diluted with glucose displayed slightly higher motility values than sperm diluted with fructose ($p > 0.05$). Similar findings have been reported by Glover and Watson (1987), who included various monosaccharides in diluents for cooling and noted that metabolisable sugars such as glucose and fructose did not provide any evident advantage over galactose, a non-metabolisable sugar. They reported that cat spermatozoa exhibited limited metabolic activity and/or had sufficient endogenous energy substrates. It has been suggested that glucose and fructose may be beneficial at body temperature (Lapwood and Martin 1966), but no advantages are reported during storage at 5°C, as was also the case with the epididymal sperm evaluated here (Table 4). The beneficial effects of sugar supplementation on the post-thaw viability of spermatozoa vary among species due to physical and chemical differences in sperm composition (Purdy 2006). After thawing, however, samples diluted in T-F extender displayed stable motility during incubation at 38°C. Fructose induces a faster and more linear motility pattern in canine spermatozoa than glucose (Rigau et al. 2001). The addition of glucose to a goat extender improves the forward motility percentage after cryopreservation, in contrast with disaccharides, while no significant differences are detected when fructose is added (Naing et al. 2010). Spermatozoa subpopulations in samples may display varying sensitivity to environmental stimuli (Rigau et al. 2001), and their response may vary as a function of the type and concentration of sugars present. In the present study, addition of glucose or fructose was not associated with significant variation in epididymal sperm characteristics, as reported by Castelo et al. (2010) in peccaries.

The freezing-thawing process had a mild effect on motility parameters, while adverse effects on the plasmalemma led to a marked deterioration in sperm quality. Research using a TRIS-glucose-based extender has shown that feline frozen-thawed sperm yields adequate results in terms of cell viability and motility, but poor results for acrosome integrity (Siemieniuch and Dubiel 2007). Freezing has also been found to damage feline sperm membranes and acrosome status, whereas cooling does not significantly affect spermatozoa morphology (Axner et al. 2004). In agreement with Axner et al. (2004), there was no significant decrease in sperm

motility immediately after thawing. Some samples had higher motility post-thaw than prior to freezing, perhaps due to capacitation-like changes.

Enzymatic and non-enzymatic systems work synergistically to prevent the harmful effects of byproducts of the aerobic metabolism (De Laraminde et al. 1993). Reactive oxygen species (ROS) products increase during post-thaw incubation, and can induce pre-mature capacitation, an acrosome reaction, or acrosome damage (De Laraminde et al. 1997). Seminal plasma contains many compounds with non-enzymatic antioxidant activity (e.g. ascorbic acid, α -tocopherol, taurine and albumin) that may play a role in the protection of spermatozoa against ROS (Bustamante Filho et al. 2009). In the present study, only TRIS–egg yolk–based extenders prepared for cat sperm were supplemented with taurine, an antioxidant that protects the sperm membrane against lipid peroxidation (Buff et al. 2001). It has been suggested that taurine may enhance membrane fluidity and integrity, as well as sperm motility (Luvoni et al. 2002). However, taurine has been reported not to enhance the acrosomal integrity of frozen-thawed cat spermatozoa (Luvoni et al. 2002). Although sperm diluted in taurine-containing extenders showed better results for many of the assessed parameters, it cannot be affirmed that this improvement is due to this antioxidant, and other studies to analyse this aspect should be further designed.

Extenders and incubation time after thawing significantly affected the DNA integrity of sperm. Some research has shown that sperm DNA fragmentation is reduced by antioxidants (Lopes et al. 1998), and it has been reported that DNA integrity after 6 h of post-thaw incubation could be enhanced following supplementation with DL-cysteine (Thuwanut et al. 2008). Addition of a taurine supplement in the present study may also have improved this parameter. Significantly, ($p < 0.05$) less DNA damage was observed in sperm samples diluted in TRIS–egg yolk–based extenders prepared for

experiment 2, suggesting that the components of these extenders protect feline sperm DNA.

Although the cooling process used here is standard for feline sperm, results indicate that this step needs to be improved because it seems to prompt a marked deterioration in sperm quality; indeed, the decline in sperm quality has been reported more pronounced during cooling than during freezing (Villaverde et al. 2006). Gradient density centrifugation has recently been suggested as an adjunct to the freezing-thawing procedure, as a way of improving epididymal cat sperm quality (Filliers et al. 2008; Chatdarong et al. 2010). In the present study, although T-F extender yielded the best sperm values during the freezing-thawing process, differences were not significant. Furthermore, Triladyl proved to be a suitable extender for freezing feline sperm, although the presence of glycerol throughout the freezing process may adversely affect sperm quality, compared with other extenders to which glycerol was added after the refrigeration step. Although TRIS–egg yolk–based extenders here prepared provide better results, the difficulties involved in preparation and management could limit their practical value. Further research should focus on evaluating fertilization success using the sperm thus obtained, through zona pellucida binding assays or artificial insemination.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

Guillermo Vizuete and Emilia Jiménez carried out jointly the tom orchidectomy and the sperm evaluation. Carlos C. Perez-Marin prepared the experimental design and was involved in statistical analysis. Estrella Aguera and Yolanda Millán prepared and discussed the manuscript. In any case, all the authors were equally involved in the interpretation of the results and in manuscript preparation.

References

- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C, 2004: The effect of Equex STM past and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **84**, 179–191.
- Baran A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K, Ileri IK, 2004: Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing tris extender. *Turk J Vet Anim Sci* **28**, 545–552.
- Baran A, Tek Ç, Demir K, Sabuncu A, Özdaş ÖB, 2011: Intrauterine insemination with cat semen frozen with various extenders. *Turk J Vet Anim Sci* **35**, 311–318.
- Buff S, Donzé A, Guérin P, Guillaud J, Fontbonne A, Ménézé Y, 2001: Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 93–95.
- Bustamante Filho IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM, Mattos RC, 2009: Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod* **6**, 392–399.
- Castelo TS, Bezerra FSB, Lima GL, Alves HM, Olivera IRS, Santos EAA, Peixoto GCX, Silva AR, 2010: Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Cryobiology* **61**, 275–279.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Morrell JM, 2010: Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology* **73**, 1284–1292.
- Cocchia N, Ciani F, El-Ras R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Montagnaro S, Avallone L, Tortora G, Lorizio R, 2010: Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* **18**, 1–8.
- De Laraminde E, Eiley D, Gagnon C, 1993: Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl* **16**, 258–266.
- De Laraminde E, Leclere P, Gagnon C, 1997: Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* **3**, 175–194.
- Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, De Causmaecker V, Dewulf J, Pope CE, Van Soom A, 2008: Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cold storage (4 °C) on sperm quality. *Theriogenology* **70**, 1550–1559.
- Glover TE, Watson PF, 1987: The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. *Anim Reprod Sci* **13**, 229–237.
- Hermansson U, Axner E, 2007: Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C. *Theriogenology* **67**, 1239–1248.

- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE, 1990: Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* **11**, 204–215.
- Jimenez E, Perez-Marín CC, Millán Y, Agüera E, 2011: Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Anim Reprod Sci* **123**, 265–269.
- Johnston SD, Osborne CA, Lipowitz AJ, 1988: Characterizations of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings 11th International Congress Anim Reprod AI Dublin*, p. 560.
- Kashiwasaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa E, Kojima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Shino M, 2005: Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Dev* **51**, 735–739.
- Lapwood KR, Martin ICA, 1966: The use of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37°C and 5°C. *Aust J Biol Sci* **19**, 655–671.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF, 1998: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human sperm. *Hum Reprod* **13**, 896–900.
- Luvoni GC, Ruggiero C, Marinoni G, Kalchschmidt E, 2002: Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal sperm. *Theriogenology* **57**, 466.
- Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Risnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM, 2010: Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* **122**, 23–28.
- Peña A, Linde-Forsberg C, 2000: Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* **54**, 859–875.
- Platz CC, Seager SWJ, 1978: Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc* **173**, 1353–1355.
- Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C, 2004: Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* **62**, 1498–1517.
- Pukazhenthil B, Pelican K, Wildt D, Howard JG, 1999: Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol Reprod* **61**, 135–141.
- Pukazhenthil B, Noiles E, Pelican K, Donoghue A, Wildt D, Howard JG, 2000: Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology* **40**, 139–150.
- Purdy PH, 2006: A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res* **63**, 215–225.
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE, 2001: Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* **56**, 801–815.
- Rikmenspoel R, Caputo R, 1966: The Michaelis-Menten constant for fructose and for glucose of hexokinases in bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* **12**, 437–444.
- Siemieniuch M, Dubiel A, 2007: Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci* **99**, 135–144.
- Siemieniuch MJ, Wołcawek-Potocka I, 2008: Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (*Felis catus s. domestica*, L. 1758) sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser. *Reprod Dom Anim* **43**, 633–637.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD, 2006: Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* **66**, 1629–1632.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Techakumphu M, Axner E, 2008: The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* **70**, 233–240.
- Toyonaga M, Sato Y, Morita M, Watanabe M, Oba H, Mizutani T, Hori T, Tsutsui T, 2010: The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J Vet Med Sci* **72**, 777–780.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T, 2003: Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci* **65**, 397–399.
- Villaverde AISB, Martins MIM, Castro VB, Lopes MD, 2006: Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* **66**, 1641–1644.
- Watson PF, 1979: The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, pp. 283–351.
- Zambelli D, Iacono E, Raccagni R, Merlo B, 2010: Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* **73**, 886–892.

Submitted: 24 Jul 2012; Accepted: 14 Dec 2012

Author's address (for correspondence): CC Pérez-Marín, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Córdoba, Córdoba 14014, Spain.
E-mail: pv2pemac@uco.es

TRABAJO INVESTIGACION 4

Subjective assessment to valuate feline sperm morphology using different staining techniques

E. Jiménez, C. C. Pérez-Marín, Y. Millán, E.I. Agüera

ABSTRACT

Morphological semen examination remains an important tool for the diagnosis of feline fertility. Numerous techniques can be used for this proposal, but it is possible to find several differences in this assessment. The morphology of seventeen cats' spermatozoa obtained from epididymal samples were examined with two staining methods: an air dried stain (Diff-Quick) and a wet stain (eosin-nigrosin), in order to determine if the proportion of normal spermatozoa were over- or underestimated. Moreover, the epididymal spermatozoa present more abnormalities because maturation process has not concluded. Mean percentages of morphologically normal spermatozoa were significantly lower in eosin-nigrosin slides than in Diff-Quick preparations (46.5% vs 53.4%; $p < 0.01$) both examined by brightfield microscopy. Differentiated analysis of head, midpiece and tail sperm abnormalities showed that both methods may differ in their capacity to identify the various anomalies. Although no significant differences were observed for secondary abnormalities, when cytoplasmic droplets were studied, differences were detected (1.6% vs 8.2%; $p < 0.001$). Results suggest that staining techniques may alter the morphology of feline spermatozoa artifactually, moreover in epididymal sperm that present more cytoplasmic droplets than ejaculated sperm. In this sense, a wet stain method may be better than an air-dried stain method for monitoring changes in abnormal spermograms. Neither centrifugation nor refrigeration affects the sperm morphology in the epididymal samples evaluated.

INTRODUCTION

One important step in assisted reproductive techniques in feline is the recovery of spermatozoa, that it is difficult by the wild character of these animals. Nowadays, different techniques have been used to get spermatozoa, as electroejaculation, epididymal and urethral collection. The epididymal recovery could be carried out after castration or post-mortem, allowing to recover a valuable genetic material that, in other case, are going to be lost.

However, the epididymal sperm shows a high percentage of abnormalities, ranging from 36 to 54% (Goodrowe and Hay, 1993, Hay and Goodrowe, 1993; Lengwinat and Blottner, 1994). Numerous sperm cells obtained from epididymis are not completely developed, resulting in a high immaturity sperm rate. Therefore, a high number of epididymal sperm samples could be considered as teratospermic (when $>60\%$ of abnormal cells are presented). Teratospermy has a detrimental impact on the *in vitro* gametes interaction in domestic cats (Wildt 1994; Pukazhenti et al. 2001). Sperm morphology reflects the health of the seminiferous tubules and the epididymides. Consequently, the morphological evaluation of epididymal sperm samples is very important to anticipate the result of frozen-thawed sperm in an artificial insemination or *in vitro* fertilization program.

The literature reports frequently studies about motility or functionality of sperm, which are affected by different factors. However, few studies have been conducted to evaluate the variations in morphological aspects of feline sperm. It has been

reported that in cat, the teratospermy is relatively frequent, although the fertilization capacity is not apparently reduced. Therefore, sperm morphology could be an important qualitative characteristic of semen and could be used as a basic indicator for predicting the fertilising ability of spermatozoa (Axner and Forsberg, 2007) and alert on the disorders in spermatogenesis (Axner et al. 1998). There is not a standard method to assessment the morphology in feline sperm, and reported variations could be attributed to the method used.

Two stains, eosin-nigrosin versus Diff-Quick dye, are compared in the present study. Eosin-nigrosin stain (Hancock 1951) is a supravital stain recommended for sperm morphology assessment. Both stains have been used to analyse the sperm structure, but differences related with preparation, type of dye, osmolality, and others could be related with divergences in the obtained values. Works developed in human reveal that different methods to identified spermatozoa morphology have differences in their capacity to identify the anomalies (Björndahl et al, 2003).

The aim of this study was to analyse if the epididymal sperm morphology is influenced by the stain methods (Diff-Quick vs EN), and also if centrifugation or refrigeration could modify the sperm morphological results.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Thirty-six cats were subjected to orchietomy. Their mean age range from 12 to 24 months and their mean weight 3.2 ± 0.6 Kg. After that, deferent ducts were tied and the testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature for processing. The study was carry out in Cordoba (Spain) and private veterinary clinics collaborate supported the specimens previous authorization by owners. The experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation.

Blood vessels were removed and epididymides and proximal deferent ducts were isolated. Spermatozoa were collected by mincing the cauda epididymidis in 3 ml 38°C DPBS. After 10 min the washed tissue was filtered to get the spermatozoa, and 3 ml DPBS were used to washed again the tissue retained in the filter.

Morphology sperm assessment

Sperm morphology were evaluated using two different staining method, an air dried stain (Diff-Quick) and a wet stain (Eosin-nigrosine), to determine if the proportion of normal spermatozoa were over- or underestimated.

A 5 µl aliquote of sperm diluted in DPBS were smeared and dried-air. Then, samples were stained with Diff-Quick and sinked for 1 min in each solution (fixative and stains). At the end, smears were clean with distilled water.

For Eosin-nigrosine stain, a 5 µl aliquote of sperm diluted in DPBS were mixture with one droplet (the same volume) of the eosin-nigrosin staining solution. The suspension was incubate for 30 s at room temperature (20°C) and one droplet was transferred to a labelled micriscope slide where it was smeared by sliding a cover slip in front of it. The smears were air dried and examined directly. At least 200 sperm were assesed at a magnification of 1000 x under oil immersion. All smears were mounted and coded before assesment.

Morphological defects were classified attending to the spermatozoa region affected, i.e. head, midpiece and tail. Head anomalies were considered macrocephalic, microcephalic, piriforme head and spermatid. Midpiece anomalies were considered detached head, bent neck, proximal and distal cytoplasmic droplet, bent midpiece and coiled midpiece. Tail anomalies were bent tail, coiled tail, bent tail hook and split tail.

Statistical assesment

Diff Quick and eosin-nigrosine (n=36) were compared in order to evaluate if staining process affects the sperm morphology. Also, samples were centrifugated (n=12) to evaluate if centrifugation process affects the sperm morphology. Finally, samples were refrigerated (n=8) to know if the effect of cold shock during the sperm manipulation affects the sperm morphology. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA). The data assumed a normal distribution. The influence of technique on percentage of morphologically normal spermatozoa, percentage of spermatozoa with abnormal heads, percentage with abnormal midpieces, and percentage with abnormal tails were assessed, with a p value of less than 0.05 considered significant. Pair-wise comparisons were made using the least significant difference test.

RESULTS

Mean percentages of morphologically normal spermatozoa were significantly lower in eosin-nigrosin slides than in Diff-Quick preparations (46.36% vs 53.44%; $p=0.002$), both examined by brightfield microscopy. Analysis of head, midpiece and tail abnormalities showed that both methods may differ in their capacity to identify the anomalies. Eosin-nigrosine staining gave a significant higher percentage of defects than Diff-Quick on midpiece abnormalities (27.88% vs 20.33%; $p<0.01$) and tail abnormalities (24% vs 20.63%; $p<0.05$). On the other hand, the head abnormalities were higher in Diff-Quick than Eosine nigrosine staining (5.58% vs 1.19%).

In this experiance, the mean percentage of normal sperm morphology was 53.4 ± 1.4 and 46.4 ± 1.7 (mean \pm SE) when Diff-Quick or Eosin-nigrosine stains were used, respectively. Differences were statically significant in both stains ($p=0.002$).

While head anomalies were higher when Diff-Quick stain was used (5.6 ± 0.9 vs 1.2 ± 0.3), the evaluation of midpiece and tail reveals significantly lower values with the mentioned stain (Table 1).

DEFECTS	DIFF-QUICK	EOSIN-NIGROSINE	P value
Normal	53.44±1.43	46.50±1.70	<0.01
Abnormal			
Head	5.58 ±0.9	1.19 ±0.3	<0.01
Midpiece	20.33 ±1.7	27.88 ±1.5	<0.01
Tail	20.63 ±1.1	24.00 ±1.2	<0.05

Table 1. Descriptive statistic comparison for spermiogram categories as derived by Diff-Quick and Eosin-nigrosine methods.

Samples were evaluated and then centrifuged at 300 X g for 8 min. The percentage of morphological sperm abnormalities was similar before and after centrifugation ($p > 0.05$) for both staining methods. For this analysis, defects were grouped according to the part of the spermatozoa affected (i.e., head, midpiece or tail) (Table 3).

Epididymal sperm were diluted in TRIS-based extender for refrigeration at 4°C and then, it was compared with initial values. No significant differences were detected between cooled and fresh samples ($p > 0.05$) when abnormalities were grouped as affecting the head, midpiece or tail (Table 4).

DEFECTS	DIFF-QUICK	EOSIN-NIGROSINE	P value
Normal	53.44±1.43	46.50±1.70)	<0.01
Abnormal			
Macrocephalic	3.44±0.80	0.25±0.83	<0.01
Microcephalic	1.28±0.33	0.58±0.23	n.s.
Pear shape	0.44±0.14	0.75±0.24	n.s.
Spermatides (immature)	0.33±0.14	0.08±0.05	n.s.
Detached heads	6.56±0.97	4.67±0.76	n.s.
Bent neck	1.28±0.32	1.00±0.23	n.s.
Bent midpiece	6.72±1.10	8.61±1.04	n.s.
Coiled midpiece	1.14±0.31	1.75±0.41	n.s.
Proximal droplets	2.94±0.49	7.67±1.10	<0.01
Distal droplets	1.31±0.34	4.08±0.61	<0.01
Bent tail	13.78±1.14	18.14±1.24	<0.05
Coiled tail	2.86±0.57	3.86±0.76	n.s.
Bent tail hook	1.56±0.29	1.31±0.26	n.s.

Table 1. Morphological sperm evaluation in epididymal samples under two different staining methods (mean ±SE) (n=36).

DEFECTS	LIVE SPZ	DEATH SPZ	P value
Normal	41.89±1.75	4.86±0.87	<0.01
Abnormal			
Macrocephalic	0.19 ±0.08	0.06±0.04	n.s.
Microcephalic	0.17±0.17	0.42±0.12	n.s.
Pear shape	0.06±0.04	0.03±0.03	n.s.
Spermatides	0	0.08±0.05	n.s.
Detached head	1.08±0.26	3.58±0.64	<0.01
Bent neck	0.75±0.18	0.25±0.10	<0.05
Bent midpiece	7.53±0.9	1.33±0.35	<0.01
Coiled midpiece	1.58±0.37	0.17±0.06	<0.01
Proximal droplet	7.06±1.04	0.61±0.14	<0.01
Distal droplet	3.67±0.58	0.43±0.16	<0.01
Bent tail	14.14±1.32	3.72±0.61	<0.01
Coiled tail	3.14±0.58	0.83±0.30	<0.01
Bent tail hook	1.22±0.26	0.11±0.07	<0.01

Table 2. Morphological sperm abnormalities detected by eosin-nigrosine stain. Differences between live and death spermatozoa were analysed (mean ±SE) (n=36).

		After collection	After centrifugation	P value
Normal				
	D-Q	56.3 ±1.7a	56.5 ±1.5a	n.s.
	E-N	50.3 ±1.8b	46.5 ±1.9b	n.s.
Abnormal				
Head defects				
	D-Q	6.0 ±1.9 a	3.8 ±0.9 a	n.s.
	E-N	1.0 ±0.2 b	1.0 ±0.3 b	n.s.
MP defects				
	D-Q	18.7 ±3.7	19.7±2.4 a	n.s.
	E-N	26.5 ±3.3	28.1 ±1.7 b	n.s.
Tail defects				
	D-Q	19.1 ±1.6	20.1 ±1.8	n.s.
	E-N	21.2 ±2.2	24.3 ±2.1	n.s.

Table 3. Comparison of morphological defects observed in epididymal sperm samples at the collection time and after centrifugation by Diff-Quick and Eosin-Nigrosine stains. *a, b* indicate differences between stain methods within columns.

		Fresh	Cooled	P value
Normal				
	D-Q	55.5 ±1.7 a	54.3 ±3.5 a	n.s.
	E-N	49.6 ±1.9 b	41.7 ±2.8 b	n.s.
Abnormal				
Head defects				
	D-Q	7.1 ±2.5 a	1.6 ±0.8	0.05
	E-N	1.1 ±0.3 b	0.9 ±0.3	n.s.
MP defects				
	D-Q	16.1 ±2.5 a	23.3±3.1	n.s.
	E-N	26.3 ±2.5 b	30.1 ±3.8	n.s.
Tail defects				
	D-Q	19.3 ±2.3	20.9 ±1.7 a	n.s.
	E-N	22.9 ±2.3	27.3 ±2.3 b	n.s.

Table 4. Comparison of morphological defects observed in epididymal sperm samples at the collection time and after cooling by Diff-Quick and Eosin-Nigrosine stains. *a, b* indicate differences between stain methods within columns.

DISCUSSION

Results concerning to morphological aspects in epididymal sperm in cats showed that a great between-individual variability. It was observed that the percentage of normal forms was 53.4% when Diff-Quick stain was used. Only seven cats had >40% morphologically normal spermatozoa. The percentage of abnormal morphological spermatozoa is similar than data reported by Tebet et al. (2006) in epididymal spermatozoa, but slightly lower than values observed by Axner and Forsberg (2007). However, sperm morphology shows higher normality percentage when it is ejaculated after electrostimulation or collected by artificial vagina (Axner et al, 1998).

As describe by Axner and Forsberg (2007), the average percentage of normal spermatozoa in domestic cats may have a percentage lower than 60% of normal spermatozoa, while Wildt et al (1983) and Howard et al (1990) report values higher than 60%. Also, differences between laboratories have been noted as consequence of different methods of fixing, staining and spermatozoa classification (Axner et al, 1997).

Chatdarong et al (2010) report that head abnormalities in sperm frozed-thawed samples do not differ when different methods of sperm selection were used, although a significant increase of normal midpieces and tails were observed, and a lower percentage of proximal droplets were observed in the methods (i.e. single-layer centrifugation through colloid) different to the simple washing method.

Our study compares the capacity to distinguish morphoanomalies in epididymal feline spermatozoa using two staining techniques. The interpretation of semen morphological results remains an important laboratory practice undertaken in the selection and diagnosis of subfertility in the animal or human clinic. In domestic cats, semen morphology assessment can approach the potential fertility of the obtained sperm (Howard, 1992), and also can be a measure that suggests the process or reject of a sperm sample for freeze. However, great variations can appear due to different classification systems, various slide preparation and staining techniques or level of experience of different technicians. In this sense, Axner and Forsberg (2007) recommend to consider the effects of age and season on sperm morphology to make a correct assessment of a semen sample.

In the literature about feline sperm morphology, scientific papers reported different stain techniques as 0.3% glutaraldehyde (Howard et al., 1990, Penfold et al., 2003), carbol fuchsine (Axner et al, 1998, 1999, 2004), Eosin-nigrosine (Glover and Watson, 1987; Johnston et al, 2001, Tittarelli et al, 2006), Diff-Quick (Mota and Ramalho-Santos, 2006), Spermac (Baran et al, 2004 a, b), Pope's staining (Tebet et al. 2006) and Fast Green FCF Bengal pink (Villaverde et al, 2006), and also differences were reported in preparation smears as wet not-stained smears (Zambelli, 1993) or fixation in formol (Axner, 1999).

Differences on the percentage of normal sperm morphology due to the different techniques for preparing the slides for microscopic assessment have been reported in others species as dog (Root-Kustritz et al, 1998), human (Meschede et al., 1993), fowl (Bilgili et al, 1985) or bull (Sprecher and Coe, 1996). We also have detected

morphological differences between the staining methods used to assess feline epididymal sperm. The Diff-Quick stain identified higher normal spermatozoa than did the Eosin-Nigrosin stain (recommended by the Society of Theriogenology, Hasting, NE).

In domestic cat is frequent to find males producing high proportions of abnormal spermatozoa (>60%/ejaculate) defined as teratospermic. And normal spermatozoa obtained in this teratospermic toms take longer to capacitate in vitro, are compromised their ability to undergo tyrosine phosphorylation, and have a reduced ability for acrosomal reaction (reviewed in Penfold et al, 2003).

Other handicap respect to the feline morphological semen assessment is the use of different classification systems. It can be found scientific papers than refer primary, secondary and tertiary abnormalities when occur in the testis, in the epididymis or vas deferens, or when are caused usually by improper handling of the semen after collection (Platz and Seager, 1978; Zambelli and Cunto, 2005). Other authors prefer classified morphological abnormalities as primary and secondary, reflecting a spermatogenic versus epididymal origin (Axner, 1998). And finally, it is reported abnormalities referred to the part of the spermatozoa that is affected, as head, midpiece or tail (Axner et al, 1998).

It has been demonstrated that staining or preparation technique may alter the morphology of canine ejaculated spermatozoa artifactually, showing higher average percentages of morphologically normal spermatozoa in samples attained with Diff-Quick than in samples stained with eosin-nigrosin (Root Kustritz et al, 1998). Our results obtained in feline epididymal sperm samples are in agreement with mentioned, and it may be suppose that the effect observed could be repeated in ejaculated samples, although we could not obtained this type of semen samples. Further studies may be planning to confirm this hypothesis.

In the present study, less macrocephalic spermatozoa were counted after eosin-nigrosine stain. It could be suggested that these spermatozoa are teratospermic (Pukazhenthil et al. 1999, 2000), with altered membrane and higher sensitivity to osmotic stress, which could provoke the spermatozoa rupture. Then, wet stain as eosin-nigrosine can affect the sperm membranes and macrocephalic sperm could disappears.

Cytoplasmic droplets were less observed after Diff-Quick stain. Similar observations were obtained after Spermac stain, in which case the elimination of droplets were attributed to the fixation with alcohol (Schäfer and Holzmann 2000). It is suggested that alcohol fixation during Diff-quick stain could explain this reduced presence of cytoplasmic droplets. In any case, distal cytoplasmic droplets are considered as normal in epididymal feline sperm (Tebet et al. 2006). Meschede et al (1993) and Oral et al. (2002) described that the percentage of head, midpiece and tail defects in human were wide divergence when three different preparation techniques (Papanicolaou, Shorr and wet stains) were compared.

Results suggest that staining techniques may alter the morphology of feline spermatozoa artifactually, moreover in epididymal sperm that present more cytoplasmic droplets than ejaculated sperm. In this sense, a wet stain method may

be better than air-dried stained method for monitoring changes in abnormal spermograms. Also, centrifugation or refrigeration did not alter the morphology of epididymal sperm in cat.

REFERENCES

- Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM past and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2004; 84:179-191
- Axnér E, Linde-Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Dom Animal*, 2007; 42: 282-291.
- Axnér E, Linde-Forsberg C, Einarsson S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 1999; 52: 767-778.
- Axnér E, Ström B, Linde-Forsberg C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, 1997;47:929-934.
- Axnér E, Ström-Holst B, Linde-Forsberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 1998; 50: 973-979.
- Barán A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K. Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. *Turk J Vet Anim Sci*, 2004; 28:545-552.
- Bilgili SF, Renden JA, Sexton KJ. The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. *Poult Sci*, 1985;64:2358-2361.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Morrell JM. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*, 2010; 73: 1284-1292.
- Glover, TT, Watson, PF. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat spermatozoa stored at 5°C. *Anim Reprod Sci*, 1987; 13: 229-237.
- Goodrowe KL, Hay M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 1993; 40: 967-975.
- Hancock 1951 A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature*, 1951;167:323-324.
- Hay MA. Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymis and vasa deferentia of domestic cat. *J Reprod Fertil*, 1993; 47: 297-305.

- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl*, 1990; 11: 204-215.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J Androl*, 1991; 12: 36-45.
- Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol Reprod*, 1993; 49:131-139.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. Philadelphia, WB Saunders, US, 2001.
- Lengwinat T, Blottner S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 1994; 35: 291-301.
- Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl*, 1993; 16:362-369.
- Mota PC, Ramalho-Santos J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology*, 2006;65:1360-1375.
- Oral E, Yetis O, Elibol F, Senol H, Irez T, Aksu FM. Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparison of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quik method. *Archives of Andrology*, 2002;48:307-314.
- Penfold LM, Jost L, Evenson DP, Wildt DE. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*, 2003; 69: 1730-1735.
- Platz CC, Seager SWJ. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc*, 1978; 173:1353-1355.
- Root Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *JAAHA*, 1998; 34: 348-352.
- Sprecher DJ, Coe PH. Differences in bull spermiograms using eosin-nigrosin stain, feulgen stain and phase contrast microscopy methods. *Theriogenology*, 1996;45:757-764.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 2006; 66: 1629-1632.

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudinc E, Stornelli MC, De la Sota RL. Effects of storage medium and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 2006;66:1637-1640.

Villaverde AI, Martins MI, Castro V, Lopes MD. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymes (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006; 66: 1641-1644.

Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien Sj, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1983; 29: 1019-1025.

Zambelli D, Bergonzoni ML, De Fanti C, Carluccio A. Sperm morphology evaluation techniques in the cat, Rabbit and dog. *SIS Vet Proceedings*, 1993; 47: 279-283.

Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 2006; 66: 159-165.

TRABAJO INVESTIGACION 5

Testicular histological features and epididymal sperm quality in domestic cats castrated throughout the year.

E. Jiménez^a, Y. Millán^b, E. Agüera^c, C.C. Pérez-Marín^{a,*}

Testicular histology and epididymal sperm quality in domestic cats castrated throughout the year.

E. Jiménez ^a, Y. Millán ^b, E.I. Agüera ^c, G. Vizquete ^a, C. C. Pérez-Marín ^{a,*}

^a Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Cordoba 14014, Spain

^b Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

^c Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

ABSTRACT

The present study evaluates the influence of seasonality on the testicular histological features and epididymal sperm quality in cats, and how the reproductive season could affect the sperm freezeability. A total of 57 cats were castrated and testes and epididymides (including deferent ducts) were collected in order to evaluate the histological structure and the sperm quality, respectively. Samples were grouped according with the photoperiod: long days (LD) from 21st December to 20th June and short days (SD) from 21st June to 20th December. Spermatogenesis grade, sperm present into the tubules, number of Leydig cells and liposomes were used to evaluate the histology of testis. Progressive motility, acrosomal status, primary morphological defects and total sperm collection were determined in order to know the epididymal sperm quality. Sperm was frozen into French straws and values at thawing were used to evaluate the sperm freezeability. Season effects were analysed by ANOVA, and the relationship between variables were analysed by Spearman correlation. Sperm quality characteristics improved during the LD, although no significant differences ($P>0.05$) were observed in acrosomal status, sperm morphology and total of recovery spermatozoa in samples collected in LD and SD period. Only progressive motility showed significant higher percentages during the LD ($59.4 \pm 5.2\%$ vs $32.5 \pm 4.8\%$; $P<0.001$). Testis volume ($P<0.01$) was also significantly influenced by season, and highest values were observed during LD (2.63 ± 0.14 vs 1.98 ± 0.18 cm³). The evaluation of testicular histology did not revealed significant variations in cat castrated at different seasons, and no significant differences were observed in freezeability of epididymal sperm collected during LD or SD period. Spermatogenesis grade positively correlated with the presence of sperm into the seminiferous tubules ($r=0.51$, $p<0.05$), Leydig cells ($r=0.34$; $p<0.05$) and sperm motility ($r=0.52$, $p<0.01$). Results indicate that male cat has acceptable spermatogenesis and sperm quality during the year and then, seasonality exert a slight influence on them. Sperm freezeability were not affected by the time of castration, but better values were observed during the period with long days, coincident with the reproductive breeding season in female cat.

Keywords: seasonality, feline, testis, sperm quality.

INTRODUCCION

The preservation of feline sperm has currently many difficulties, mainly when cryopreservation is attempted. Very heterogeneous responses are obtained, but reasons for this failure are not known. Studies have been usually realized in domestic and free-lived common cats, but when they are carried out in wild felines results are worse, possibly as a consequence of nutritional deficiencies and/or stress (Howard and Allen, 2008). Seasonality should be had into account, since this is very important in many small wild felids who have an extreme reproductive seasonality controlled primarily by photoperiod. A cause of this, attempting semen collection for artificial insemination during the non-breeding season is unsuccessful on a routine basis (Swanson et al., 2006). In the domestic cat, some authors have described that sperm production is maintained throughout the year (Spindler and Wildt 1999; Blottner and Jewgenow 2007). The estrous cycle regulation in queen is mediated by melatonin, which it is released according to the light hours at day (Leyva et al. 1989). The light hours is increased, the melatonin is inhibited. And, then, the breeding season of queen is initiated. In the North hemisphere, the ascendant photoperiod is extended from 22nd December from 21st June, and then queen shows cyclic sexual activity. Coincident with the sexual activity in female cats, males copulate repetitively and then, as occur in other seasonal species, the sperm quality should be higher.

Sperm motility, morphology and acrosome status are the more usual test for the assessment of sperm quality, although there are another tests for a better understanding of the sperm processes. And during the histological evaluation of testis, special attention is required for testicular parenquime, seminiferous tubules and germinal epithelium changes. Many factors have been associated with the reduction of sperm quality before and after cryopreservation. In this sense, the testicular tissue characteristics may inform about the sperm maturity and quality at the collection, and maybe on the ability for sperm cryo-survival.

Controversial studies about the influence of seasonality on the sperm quality and histological architecture in toms have been reported. Spindler and Wildt (1999) affirmed that sperm collected from the epididymides did not differ in motility, structural or functional variables evaluated throughout the year. Later, Axner and Forsberg (2007) studied the sperm morphology and suggested that seasonal and breed effects should be considered, although other effects as the cat housing could make difficult the evaluation of data. Blottner and Jewgenow (2007) analysed sperm characteristics and testicular findings in order to discuss about the influence of seasonality on the mentioned parameters. They reported that quantity of sperm is moderately affected by season, while more pronounced variations were observed in hormone production and clear seasonal effects occurred on functional sperm parameters. Stornelli et al (2009) analysed the seasonal effects on testicular morphology, concluding that variation in testis cell morphology occurs throughout the year, and suggesting that could be related with seasonal sperm production (although it was not studied).

The present study aims to investigate the effect of season on the testosterone concentration, testicular histology and sperm quality in cats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

A total of 57 mixed-breed domestic cats aged between 10 and 48 mo (18.5 ± 1.7 mo) and weighing 3.9 ± 0.1 Kg were castrated. Samples were grouped according with the photoperiod: long days (LD) from 21st December to 20th June and short days (SD) from 21st June to 20th December. Owners give us the authorization in order to use the genetic material of their pets. This study was conducted in Córdoba (Spain) (37.53N-4.47O), and experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation, and approved by the Bioethic Committee of the University of Cordoba (Spain).

Sperm collection

After orchietomy, deferent ducts were tied and the testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature. Within 1 hour of collection, blood vessels were removed and epididymides and proximal deferent ducts were isolated. Spermatozoa were collected by mincing the cauda epididymides and deferent ducts in 3 ml dPBS at 38°C. After 10 min the washed tissue was filtered to obtain spermatozoa, and 3 ml dPBS were used to rewash the tissue retained in the filter. Initial evaluation of semen was carried out in these samples.

Epididymal sperm samples having progressive motility higher than 50% and normal sperm morphology higher than 40% were chose in order to evaluate the freezeability of sperm samples. The diminution of the percentage of progressive motility from sperm collection to sperm thawing was calculated.

Histological evaluation of testis

The combined testes-epididymides weight was calculated for each male. Also, the length and width of each testis were measured to calculate the testicular volume (cm^3) (Howard, 1993). The dimensions of each testis were measured (in cm) for length (L) and width (W) using laboratory callipers. The volume (V) of each testis was calculated as $V=L \times W^2 \times 0,524$ and total testes volume was determined by combining the volume of the left and right testes (Morais et al, 2002).

They were dipped into formol and refrigerated until their processing. Three transversal sections (one central and two apical) were realized in each testis. Paraffin sections (3-4 μm) were mounted on slides and stained with haematoxylin-eosin.

Semi-quantitative assessment was used to evaluate the testicular histological features. Spermatogenesis was classified as spermatogenic arrest (incomplete spermatogenesis, not beyond the spermatocyte stage) (Figure 1),

hipospermatogenesis (all germ cell stages present including spermatozoa, but there is a distinct decline in the number of germ cells) and normal spermatogenesis (Figure 2). The presence of spermatozoa into the seminiferous tubules were determined and classified as 0 (when no sperm appear into the tubules), 1 (when sperm were observed into the few tubules), 2 (sperm observed into the 20-60% of tubules) and 3 (sperm presence in more than 60% of tubules). Leydig cells were semi-quantitatively evaluated counting the number of cells in one field at 20x (Figure 3). Liposomes contained into the Leydig cells were also classified from 0 to 3, where 0 means no liposomes into the Leydig cells and 3 corresponds to the high presence of intracellular liposomes (Figure 4).

Sperm quality assessment and cryopreservation

Fresh sperm samples were evaluated for total recovery sperm, percentage of progressive motility, morphology and acrosome status. Initial values were obtained after epididymal sperm recovery using dPBS medium, and cooling and frozen-thawed spermatozoa were assessed after dilution in TRIS extender.

Ten μ l of epididymal sperm samples were placed on a warm glass slide and the percentage of progressive motility were evaluated subjectively at 100 x magnification by counting 200 spermatozoa. Sperm morphology was studied in smears stained with a Romanowski Stain (fixant, eosin and blue solutions for fast staining, Panreac, Barcelona, Spain). A total of 200 spermatozoa in each smear were analyzed under a light microscope at x1000 magnification with immersion oil. The percentages of normal and abnormal spermatozoa were determined. Also, primary defects were calculated in order to evaluate the morphological defects occurred into the testis (Axnér et al., 1999; Pukazhenthil et al., 2001). The primary defects detected were macrocephalic, microcephalic, piriforme head, espermatide head, acrosomial atrophy, double heads, double tails, and bent tail.

To determine the acrosome integrity, a drop of diluted sperm was placed on a warm glass slide and a thin smear was prepared and air-dried. Then, it was stained using Spermac® (Minitüb, Tiefenbach, Germany). The slide was fixed for 5 min and washed with distiller water 5-6 times. It was placed into stain A for 2 min and repeated for 1 min for stain B and C. Finally, the slide was air dried and observed under a light microscope at x1000, with immersion oil. Two hundred spermatozoa were evaluated.

Semen doses were prepared at a final concentration of 5×10^6 spermatozoa in 250 l-straws. TRIS-based extenders were used for sperm dilution and freezing according to Jiménez et al (2012). Straws were cooled to 4° C (at a rate of 0.3°C/s), later suspended horizontally over liquid nitrogen (LN) vapours for 10 min and finally immersed in LN. Cooling rates were monitored using a digital thermometer. For thawing, straws were placed in a 38°C water bath for 30 sec. After 10 min, progressive motility percentage was evaluated in sperm frozen-thawed samples.

Blood samples collection and assessment

Blood samples were collected by foreleg venipuncture before castration into heparin tubes. They were centrifuged at 1500g for 10 min and plasma was immediately frozen at -20°C until analysis.

Total testosterone was measured in a commercial laboratory using a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (Immulite 1000; Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) (Gañan et al, 2009).

Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the SPSS program (SPSS version 11.0, Chicago, IL, USA). Results are showed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered significant. Histological parameters (spermatogenesis grade, presence on Sertoli cells, presence of liposomes and tubules with spermatozoa) were analysed as discrete variables, and sperm values (total recovery sperm, percentage of progressive motility, normal morphology, primary morphological defects and acrosomal status) were analysed as continue variables. Samples were grouped according with the LD and SD photoperiod and variables were compared by ANOVA. Spearman correlation was also calculated using all discrete and continuous data.

RESULTS

Seasonality effects on testis and sperm quality

The overall combined testis-epididymis weight was 2.18 g, showing a tendency to have higher values during LD (2,34 vs 1,94 g; $p = 0.059$). However, the comparison of testis volume revealed significant differences between LD and SD ($2,63 \pm 0,14$ and $1,98 \pm 0,18$ respectively, $p < 0.01$) (Table 1).

During the LD period, animals had more tubules with spermatozoa than during SD ($P = 0.01$), but others testicular variables did not showed significant differences associated with the season.

When sperm parameters were analysed at different photoperiods, only motility parameters were significantly affected, showing higher values during LD (59.4 ± 5.2 vs 32.5 ± 4.8 ; $P < 0.001$) (Table 1). The photoperiod did not affect significantly in the percentage of progressive motility after frozen-thawing process, i.e. in the sperm freezeability.

	LD Long Photoperiod	SD Short photoperiod
Combined epididymis-testis weight (g)	2.21 ±0.09	1.94 ±1.71
Testicular volume (cm ³)	2.63 ±0.14 ^a	1.98 ±0.18 ^b
Testosterone (ng/ml)	3.32 ±0.80	2.58 (±1.03)
Total recovery sperm (10 ⁶)	108.58 ±16.03	78.68 ±13.14
Progressive motility (%)	59.44 ±5.20 ^A	32.50 (±4.85) ^B
Intact acrosome (%)	63.00 ±1.97	60.33 ±2.45
Normal morphology (%)	51.72 ±1.84	55.39 ±2.18
Primary morphological defects (%)	9.94 ±1.45	10.67 ±1.74

a,b p<0,01; A,B p<0,001; different letters within rows indicate significant differences,

Table 1. Comparative results concerning to testis weight and volume, testosterone and sperm parameters during long and short photoperiods.

Histological evaluation of testis

A total of 14% of studied animals showed normal spermatogenesis (n=8), while spermatogenic failure and hipospermatogenesis were detected in 29,8% (n=17) and 56,1% (n=32) respectively.

The 8.8% (n=5) of animals presented tubules without spermatozoa, while the 45.6%, 38.6% and 7.0% (5, 26 and 22 animals) showed less, medium or high sperm quantity inside the tubules.

A low presence of Leydig cells was observed in 50.9% of toms, and a similar percentage of animals (but not the same before referred) showed a higher presence of liposomes (Table 2).

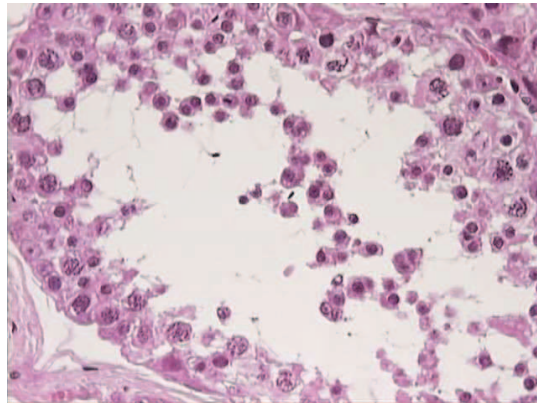


Figure 1. Spermatogenic arrest (HE, 40X).

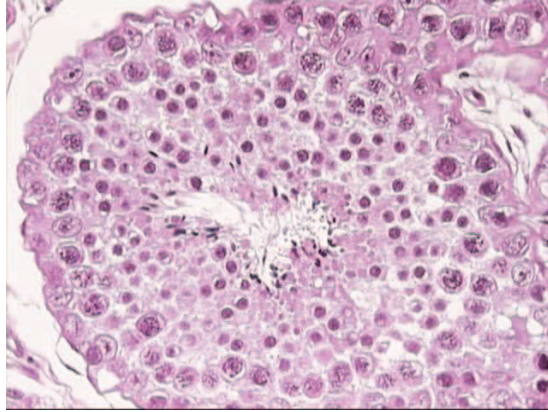


Figure 2. Normal spermatogenesis (HE, 40X).

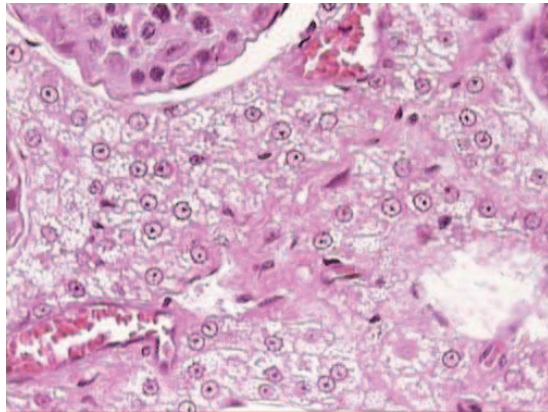


Figure 3. Numerous Leydig cells containing liposomes (HE, 40x).

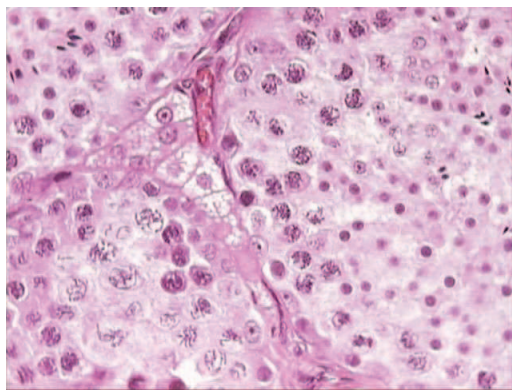


Figure 4. Field showing a section containing few Leydig cells showing liposomes inside (HE, 40X).

		Long Photoperiod (LD)	Short photoperiod (SD)
Spermatogenesis grade	Spermatogenic arrest	27.8	33.3
	Hypospermatogenesis	52.8	61.9
	Normal spermatogenesis	19.4	4.8
Tubules containing sperm	0 (no spermatozoa)	13.9	0
	1 (few spzs)	55.6	28.6
	2 (medium spzs)	22.2	66.7
	3 (many spzs)	8.3	4.8
Leydig cells	0 (no cells)	0	0
	1 (few cells)	44.4	61.9
	2 (medium cells)	41.7	28.6
	3 (many cells)	13.9	9.5
Liposomes	0 (no liposomes)	0	4.8
	1 (few liposomes)	16.7	9.5
	2 (medium liposomes)	27.8	42.9
	3 (medium liposomes)	55.6	42.9

Table 2. Frequency of different testicular histological features at LD and SD periods.

Correlations

Significant negative correlation between normal sperm morphology and combined epididymis-testis weight ($r=-0.47$) and testicular volume ($r=-0.42$) were observed. Testicular volume was also significantly correlated with combined epididymis-testis weight ($r=0.40$) and with Leydig cells ($r=0.33$). Progressive motility was correlated with spermatogenesis grade ($r=0.52$), with primary morphological defect in spermatozoa ($r=-0.38$) and with acrosomal status ($r=0.33$). Spermatogenesis grade was also correlated with presence of spermatozoa into the tubules ($r=0.51$) and with Leydig cells ($r=0.34$) (Table 3). The total collected spermatozoa were significantly correlated with Leydig cells ($r=0.45$). Post-thawing progressive motility was significantly correlated with normal sperm morphology ($r=0.36$) and with the presence of granules of liposomes into Leydig cells ($r=-0.38$) at the collection sperm time (Table 3).

	Test	TE-weight	T-volume	Total Spz	Spmtg	Spz-T	Leydig	Liposo	Mot	Mot-thaw	Morphol	P-defect	Acros
Test													
TE-weight			0.40*				0.38**				-0.47**		
T-volume		0.40*					0.33*				-0.42*		
Total Spz							0.45**						
Spmtg						0.51**	0.34*		0.52**				
Spz-T					0.51**								
Leydig		0.38**	0.33*	0.45**	0.34*								
Liposo										-0.38*			
Mot					0.52**							-0.34*	0.33*
Mot-thaw								-0.38*			0.37*		
Morphol		-0.47**	-0.42*							0.37*			
P-defect									-0.34*				
Acros									0.33*				

* p<0.05; ** p<0.01

Table 3. Significant Spearman correlation coefficients of testosterone (Test), testicular-epididymal combined weight (TE-weight), testicular volume (T-volume), total of recovery spermatozoa (Total Spz), spermatogenesis grade (Spmtg), spermatozoa present in the seminiferous tubules (Spz-T), number of Leydig cells (Leydig), presence of liposomes (Liposo), progressive sperm motility (Mot), Progressive sperm motility after freezing-thawing (Mot-thaw), normal sperm morphology (Morphol), primary sperm defects (P-defects) and intact acrosome (Acros) in samples collected throughout the year.

DISCUSSION

Results here obtained supported that photoperiod, i.e. seasonality, slightly affected the testicular and spermatogenic parameters, since the testicular volume was significantly higher when the photoperiod was ascendant. And, in particular, significant differences were detected for tubules containing spermatozoa in the testis and for progressive sperm motility after collection. It was observed that the longer light hours, the higher progressive motility. From pineal gland, melatonin synthesis and secretion is under-regulated by the light exposition, and it could be the responsible for the increment of sperm motility and the presence of spermatozoa into the seminiferous tubules in the testis.

Higher progressive motility values in toms have been positively correlated with the capacity of in vitro fertilization (Zambelli et al, 2006). And then, it could be interesting to determine when toms have better sperm quality, in order to optimize

the fertilization (*in vitro* and *in vivo*), or to collect the best samples of sperm for its cryo-storage.

The breeding season in female cats is coincident with the increment of photoperiod (Robinson and Cox, 1970), when a negative regulation of melatonin exists. And, as occur in other seasonal species, male should by prepare for an intensification of their reproductive behaviour. Different authors have previously reported seasonal variation in the sperm motility of cats by studies carried out throughout the year. In consonance with our findings, Blottner and Jewgenow (2007) described a better progressive motility in cat during spring. Nevertheless, Spindler and Wildt (1999) did not detected differences between seasons, although results showed higher motility values in spring and lower in winter. The improvement of the percentage of sperm motility was associated with a low percentage of primary morphological defects ($r=-0.339$; $p<0.05$), which had been corroborated by others (Axnér and Forsberg, 2007; Blottner and Jewgenow, 2007). In contrast, Spindler and Wildt (1999) did not find observed this association.

The sperm quality assessment in the present study showed that there is not seasonal influence on the acrosomal status, in agreement with Spindler and Wildt (1999), nor on the sperm morphology. This last observation is contrary to Axnér and Linde-Forsberg (2007), although the collection method, staining methods, or the geographical area might explain the mentioned differences. Axner and Linde-Forsberg (2007) indicated that higher values of normal sperm morphology occur from February to July, i.e. during the considered as breeding season by these authors, and concluded that seasonality affects the sperm morphology in cat. This affirmation differs from our findings because so the sperm normal morphology as the primary sperm defects where constant at different periods.

The overall combined epididymis-testis weight was 2.12 g. No similar data were found during the literature revision, because usually testes are weighted alone. It has been reported that it is not necessary the omission of the epididymis from the “gonad” weight determinations based on statistical evidence alone (Adkins et al, 1982). The epididymis is dependent upon androgen production for functional maturation and its weight has value as an indicator of testicular function. In view of these relationships, the negative implications of including the epididymis in routine male gonad weight determinations would be minimal; however, the appropriateness of including epididymal weight would necessarily depend on the individual study objective (Adkins et al, 1982). Epididymides and testes (jointly) showed a tendency to be weightier/heavier during the long-light period, while others describe a significant increment of testis weight at the mentioned season (1.46 g in spring versus 1.29 in autumn/winter; $P<0.031$) (Blottner and Jewgenow, 2007) and at monthly monitorization (Kirkpatrick 1985). The testis dimensions should be always having into account, and recently, Mota et al (2012) describe that testis weight may be used to predict xenographt success, highlighted their importance at male evaluation. Similarly, it has been affirmed that measurement of testicular volume is important for evaluating testicular function because testicular volume represents the quality of spermatogenesis (Dohle et al, 2005). In the present study, seasonal differences were detected for the testicular volume.

Stornelli et al (2007) affirm that seasonal changes occur in the testicular cell morphology, which might be associated with seasonal sperm production, although it was not analysed. The present study partially confirms the proposal of Stornelli et al (2007) since some testicular histological features (seminiferous tubules containing spermatozoa) and quality sperm values (progressive motility) suffer variation throughout the year. In contrast, Spindler and Wildt (1999) affirm that no seasonal effect occurs on the quality and quantity of epididymal sperm in toms, and spermatogenesis is maintained during the year in free-living and outdoor cats. In the same study it is affirmed that seasonality affect the oocyte quality in queen. Authors suggest that it could be a genetic advantage for domestic male cats to be reproductively active throughout the year, or at least to remain active well outside of the usual female breeding season. During the present study, spermatozoa were present at seminiferous tubules during breeding and non-breeding season, in agreement with Kirkpatrick (1985). It supports the idea of Spindler and Wildt (1999) that spermatogenesis is maintained throughout the time.

The spermatogenesis was increased during ascendant photoperiod, although differences were not significant, in contrast with others (Blottner and Jewgenow, 2007; Stornelli et al., 2009). It was observed a relationship between the increase of Leydig cells and the improvement of spermatogenesis, although it was not linked to the quantity of liposomes.

Seasonal fluctuations in testosterone concentration were suggested by Johnston et al (1984) and corroborated by Kirkpatrick (1985). The marked fluctuations in testosterone concentrations emphasized that measurement of testosterone in a single sample is not sufficient for an evaluation of the androgenic function of the testis in cat. Blottner and Jewgenow (2007) described a seasonal variation in testicular testosterone, and likewise, Tsutsui et al (2009) concluded that a decline appears out of the reproductive season. It is interesting the observation of Kirkpatrick (1985) about that sexual stimulation did not produce effect on the testosterone concentration in male cats. Cats castrated throughout the year did not showed seasonal differences of testosterone concentration, but it should be considered that the experimental design was not aimed to monitor the hormonal variation since a single sample was available.

The present study support the idea that domestic male cats maintain the sexual activity inclusive out of the considered reproductive or breeding season, although different factors could modify the sperm production and quality. Similar finding have been reported in other seasonally species, as buck (Arrebola et al, 2010) or stallion (Janett et al, 2003). In conclusion, the testicular activity of domestic cats located in the Mediterranean area did not showed a seasonal pattern, suggesting a constant spermatogenic activity throughout the year. However, sperm quality, and particularly the progressive motility (considered as a functional parameter), varied according to the photoperiodic season. Higher values were observed during the breeding season, which could be considered as a synchronization of male and female sexual receptivity in cat. The absence of marked seasonality in this specie also favours the reproductive management of males at any moment. These findings could be interesting in order to choose the best moment for semen collection and to

reach good results in frozen-thawing sperm, since the best sperm motility appears during long-light days.

REFERENCES

- Adkins AG, Alden CL, Kanerva RL. Optimization and standardization of male gonad weight determination in rats. *Toxicologic Pathology* 1982, 1, 33-37.
- Arrebola FA, Perez-Marin CC; Santiago-Moreno. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Rumin Res* 2010, 89:31-35.
- Axnér E. and Forsberg C.L. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Dom Anim*, 2007; 42: 282-291.
- Axnér E., Linde-Forsberg C., Einarsson S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 1999; 52: 767-778.
- Blottner S., Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Dom Anim*, 2007; 42: 536-540.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU Working Group on Male Infertility, EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol*. 2005; 48:703–711.
- Gañan N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sanchez I, Aguilar JM, Gomendio M, Roldan ERS. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology* 2009; 72: 341-352
- Howard J., Allen M. Nutritional factors affecting semen quality in felids. *Zoo and wild animal medicine*. Fowler M., Miller R., Ed. Saunders Elsevier, 2008, chapter 33: 272-283.
- Howard JG. Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler M, editor. *Zoo and wildlife medicine: current therapy*. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 390–9.
- Janett F, Thun R, Niederer K, Burger D, Hässig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. 2003, 60, 453-61.
- Johnstone IP, Bancroft BJ, McFarlane JR. Testosterone and androstenedione profiles in the blood of domestic tom-cats. *Animal Repord Sci* 1984, 7, 363-375.
- Kirkpatrick JF. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. *Canadian Journal of Zoology* 1985, 63, 1285-1287.
- Leyva h., Madley T., Stabenfeldt Gh. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of estrogen and coital responses in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil.*, 1989; Suppl. 39: 135-142.
- Morais RN, Mucciolo RG, Gomes MLF, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Seasonal analysis of semen characteristics,

- serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 2002;57:2027-2041.
- Mota PC, Ehmcke J, Westernströer B, Gassei K, Ramalho-Santos J, Schlatt S. Effects of different storage protocols on cat testis tissue potential for xenografting and recovery of spermatogenesis. *Theriogenology* 2012;77:299-310.
- Pukazhenti B., Wildt D., Howard J. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J. Reprod. Fertil.*, 2001; *Suppl.* 57: 423-433.
- Robinson R. and Cox HW. Reproductive performance in a cat colony over a 10-year period. *Laboratory Animal*, 1970; 4:99-112.
- Spindler E., Wildt D. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod*, 1999; 61: 188-194.
- Stornelli MA., Reyna JC., Stornelli MC., Nuñez Favre R., Savignone CA., Titarelli CM., and de la Sota RL. Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats. 2009; 44: 287-290.
- Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 2006; 66: 49-58.
- Tsutsui T, Onodera F, Oba H, Mizutani T, Hori T. Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. *Reprod Dom Anim* 2009;44 (Suppl. 2): 291-293.
- Zambelli D, Merlo B, Iacono E, Belluzzi S. Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic animals. *Reprod Domest Anim* 2006;41:137-141.

TRABAJO INVESTIGACION 6

Effect of vitrification on epididymal sperm motility, morphology and acrosome integrity in domestic cats.

C. C. Pérez-Marín ^{a,*}, E. Jiménez ^a, G. Vizueté ^a, E.I. Agüera ^b

En evaluación

Effect of vitrification on epididymal sperm motility, morphology and acrosome integrity in domestic cats.

G. Vizuite ^a, E. Jiménez ^a, C. C. Pérez-Marín ^{a,*}, E.I. Agüera ^b

^a Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Cordoba, Cordoba 14014, Spain

^b Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain

* Corresponding Author. Tel.: +34957218716; fax: +34957211093.

E-mail address: pv2pemac@uco.es (C.C. Pérez-Marín).

Abstract

The objective of the present study was to investigate the influence of sucrose concentration to motility, morphology and acrosomal integrity of vitrified-warmed epididymal cat spermatozoa. A total of 10 cats was castrated and sperm was collected from epididymides and vasa deferentia. Before vitrification, sperm samples were divided into four aliquots and diluted 1:1 with DPBS-BSA 1% (control) or the same extender supplemented with different sucrose concentrations (0.25, 0.4 and 0.6 M). From each group, 10 µl of sperm were loaded into 0.25ml-straw and directly immersed into liquid nitrogen. For warming, the top of straws containing the sperm sample were dipped into 0.5 ml of DPBS-BSA 1% at 65°C, centrifuged and the final pellet was resuspended in DPBS-BSA 1%. Afterwards, sperm motility, morphology and acrosome status were assessed in fresh samples and after vitrification-warming procedure. The number of progressive motile spermatozoa was significantly higher when sperm were vitrified in medium containing 0.4 M sucrose than in the control group ($12.9 \pm 3.9\%$ vs $0.3 \pm 0.3\%$, $P \leq 0.05$). No significant differences were detected among groups for sperm morphology and acrosome integrity. Results support that cat sperm survives after vitrification using sucrose as a cryoprotectant, and the best results were achieved when 0.4M of sucrose was used. This is the first report on sperm vitrification in cat and further studies on extenders, management or carriers should be carried out in order to improve sperm cryosurvival.

Keywords: cryopreservation, feline, spermatozoa, vitrification, motility.

1. Introduction

The preservation of genetic material is essential for the maintenance of endangered wild felines, where domestic cats should be used as experimental model for standardization and implementation of better cryopreservation processes. The conventional freezing techniques for cat sperm have been widely reported with this

scope (Cocchia et al., 2010; Goodrove and Hay 1993; Jimenez et al, 2011; Tebet et al., 2006; Tsutsui et al, 2003), but numerous variables has been reported that could modify these results as the anaesthetic drugs used (Jimenez et al, 2011; Zambelli et al., 2007), the sample-collection and sperm-management techniques employed (Chatdarong et al., 2010; Filliers et al., 2010; Totonaga et al., 2010), the pre-freezing conditions (Villaverde et al., 2006), the freezing procedure (Zambelli et al., 2002), the extender composition (Zambelli et al., 2010; Thuwanut et al., 2008; Axner et al., 2004; Comizzoli et al., 2012), or the analytical techniques used for sperm assessment (Siemieniuch and Dubiel, 2007). Swanson (2006) affirms that multiple variables can affect the viability of feline frozen spermatozoa, and recommends more studies on this field. Then, advances in feline sperm cryopreservation procedures and other related techniques could ameliorate the use of genome resource banks for the biodiversity preservation.

From the last 70 years, slow freezing procedure has been the main, if not the only, method used to preserve spermatozoa for a long-term. However, vitrification may be an alternative approach for cryopreserving sperm from many felid species. Vitrification is a physical cryopreservation procedure that avoids the formation of ice crystal through the combination of ultra-rapid cooling rate, high viscosity of medium and small sample volume. This method has been investigated extensively in female gametes and embryos of different mammalian species (Arav et al., 2002; Cervera et al., 2003; Vatja et al., 1998) and recent studies have reported potential benefits of this technique for human (Isachenko et al., 2004, 2004b, 2008) and for animal sperm cryopreservation, as reported by Cuevas-Urbe et al. (2011) in fish and by Sánchez et al. (2011) in dog. New cryopreservation methods should be explored in order to reduce the sperm cryo-damage, to improve the cryo-storage and to get cheaper processes.

The aim of this study was to analyze the effect of sucrose concentrations on motility, morphology and acrosome status of vitrified-warmed feline epididymal spermatozoa.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Ten mature domestic cats between 12 to 24 months and weighing 3.0 ± 1.5 kg were castrated and reproductive tissues were transported to the lab of the University of Cordoba for their preparation with the owner's authorization. Experimental procedures were performed in accordance with Spanish Animal Protection Law RD 1201/2005, implementing Directive 86/609 of the European Union concerning the protection of animals used in scientific experimentation.

2.2. Sperm collection

After orchietomy, vasa deferentia were tied and testes and epididymides were transported to the laboratory in a sterile 0.9% sodium chloride solution at room temperature. Within 1 h of collection, blood vessels were removed and epididymides and proximal deferent ducts were isolated. Spermatozoa were

collected by mincing the cauda epididymides and proximal deferent ducts in 3 ml Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Oxoid, Hampshire, England) (osmolality, 260-290 mOsm) at 38°C. After 10 minutes, supernatant was centrifuged at 300 g x 10 min and the pellet was resuspended into 1 ml of DPBS at a final concentration of approximately $87 \pm 8.5 \times 10^6$ spz/ml. Then, the evaluation of sperm was carried out. Only samples exhibiting motility $\geq 40\%$, and normal morphology $\geq 70\%$ were used.

2.3. Sperm dilution and vitrification protocol

The steps followed for sperm vitrification and warming are shown in Figure 1. Sperm aliquots (40 μ l) were diluted 1:1 in four different media. The control media were based on DPBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA), while three others were composed by the same medium supplemented with different sucrose concentrations (0.25M, 0.40M, 0.60M). After 10 sec, 10 μ l of diluted sperm was loaded into the top of a 0.25ml-straw, which were placed horizontally over liquid nitrogen (LN) vapors for 2 min and subsequently immersed in LN. Samples were maintained under vitrification for at least 24 hours before to use. For warming, the top of the straw was immersed in 0.5 ml of DPBS-BSA 1% at 65°C for 5 sec and then it was maintained into the incubator at 38°C for 3 min. Afterwards it was centrifuged at 300g for 10 minutes. The pellet was finally resuspended in 50 μ l of DPBS-BSA 1% for sperm evaluation.

2.4. Sperm assessment

Fresh diluted and vitrified-warmed sperm samples were evaluated for motility, morphology and acrosome status. Initial values were obtained after epididymal sperm collection, and vitrified-warmed spermatozoa were assessed after dilution in different extenders (see section above).

Ten μ l of epididymal sperm samples were placed on a warm glass slide and the percentage of total and progressive motility were evaluated subjectively at X 400 magnification. A total of 200 spermatozoa were counted.

Sperm morphology was studied in smears stained with a Romanowski stain (Panreac, Barcelona, Spain). A total of 200 spermatozoa in each smear were analyzed under a light microscope at X1000 magnification with immersion oil. The percentages of normal and abnormal spermatozoa were determined (Howard et al., 1990).

To determine the acrosome integrity, a drop of diluted sperm was placed on a warm glass slide and a thin smear was prepared and air-dried. Then, it was stained using Spermac® (Minitüb, Tiefenbach, Germany). The slide was fixed for 5 min and washed with distiller water 5-6 times. It was placed into stain A for 2 min and repeated for 1 min for stain B and C. Finally, the slide was air dried and two hundred spermatozoa were evaluated under light microscope at X1000 magnification.

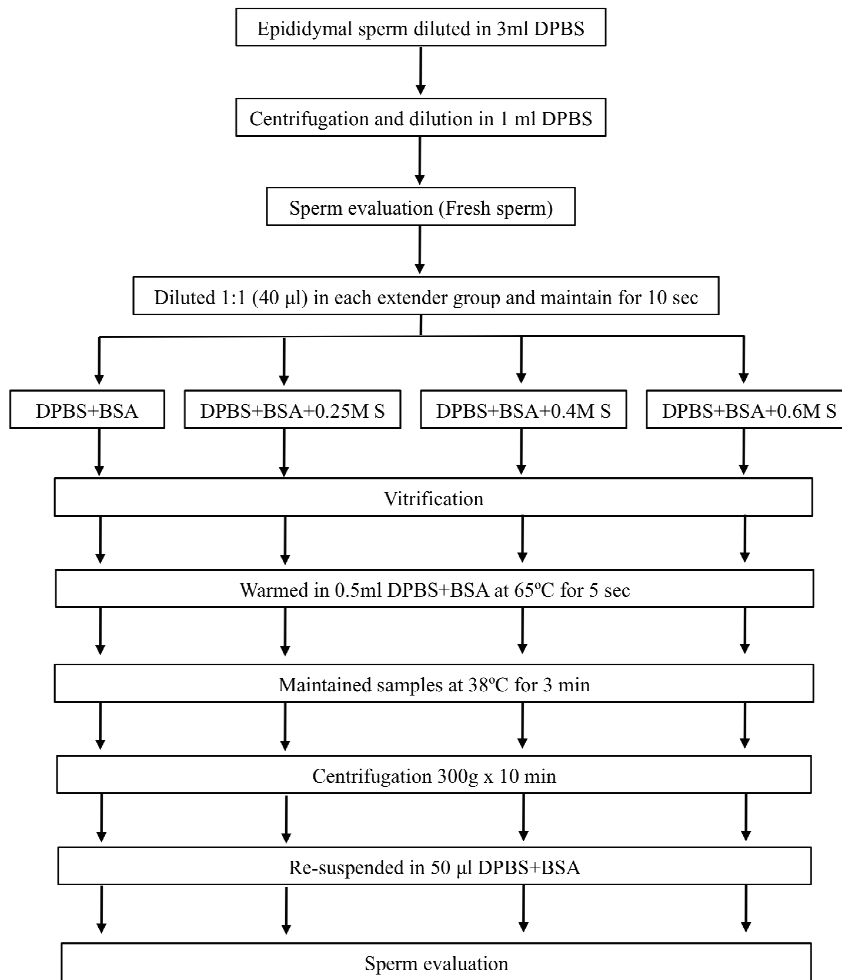


Figure 1. Flow chart for vitrification and warming protocol of epididymal feline sperm.

2.5. Statistical analysis

Data obtained for fresh and vitrified-warmed epididymal sperm were tested for homogeneity of variance using Levene's test. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) for motility, morphology and percentage of intact acrosome, followed by Tukey's post-hoc test.

The SPSS 15.0 package (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. All results are presented as mean \pm SEM. The significance level was set at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Sperm motility

Motility parameters (total and progressive motility) showed a significant reduction after vitrification-warming in contrast with fresh sperm, as expected. The post-vitrification assessment showed that sperm diluted with different sucrose concentrations had higher values ($P < 0.05$) than control samples (without sucrose).

The effects of vitrification with sucrose supplemented with BSA 1% on the sperm motility are showed in Table 1. The total and progressive motility after warming were significantly increased ($p < 0.05$) in the sperm samples vitrified with 0.40M sucrose ($12.9 \pm 3.9\%$ and $9.9 \pm 3.3\%$) compared with control ($0.3 \pm 0.3\%$ and $0.1 \pm 0.1\%$). Although the use of lower (0.25M) or higher (0.60M) concentrations of sucrose improved the progressive motility ($6.8 \pm 1.9\%$ and $4.7 \pm 2.1\%$, respectively), no significant differences ($p > 0.05$) were found in comparison with the control group.

3.2. Sperm morphology

The percentage of normal sperm morphology after vitrification-warming did not show significant differences with fresh semen ($p > 0.05$). Also, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between the sperm vitrified groups containing 0, 0.25, 0.40 and 0.60M sucrose (Table 1).

3.3. Acrosome integrity

The percentage of intact acrosome before cryopreservation reached the $60.2 \pm 2.9\%$. The vitrified sperm maintained similar values than obtained in fresh samples, and no differences were detected when different concentrations of sucrose were added to the sperm ($p > 0.05$), as illustrated in Table 1.

	Fresh	BSA (control)	BSA + 0.25M S	BSA + 0.40M S	BSA + 0.60M S
Progressive motility	36.8 ± 5.0 a	0.1 ± 0.1 b	6.8 ± 1.9 b, c	9.9 ± 3.3 c	4.7 ± 2.1 b, c
Total motility	45.0 ± 4.8 a	3.0 ± 0.3 b	9.2 ± 2.3 b,c	12.9 ± 3.9 c	6.7 ± 2.7 b, c
Morphology	76.8 ± 5.0	63.7 ± 8.2	70.2 ± 3.9	72.7 ± 5.1	68.8 ± 2.5
Intact acrosome	60.2 ± 2.9	56.0 ± 3.9	58.0 ± 2.0	60.0 ± 0.5	57.0 ± 1.4

Significant differences between columns are expressed as different superscripts (a, b, c) within a row ($P < 0.05$).

Table 1. Progressive motility (%), total motility (%), normal morphology (%) and intact acrosome (%) of epididymal cat sperm in fresh and in vitrified samples (using different sucrose concentrations). Data are shown as means \pm SEM ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

The present study explores how different concentrations of sucrose affects on vitrified sperm characteristics. Non-permeable cryoprotectants, as sucrose, are

usually combined with other permeable substances, as glycerol, since these penetrating solutes are necessary to reduce the cryo-damage of ice crystals.

The lack of ice crystal formation is achieved during vitrification due to the fast cooling rate, which avoids the solidification phase and transforms the fluids into a glass-like amorphous solid (called vitreous status) (Dinnyes et al, 2007). While this procedure has demonstrated good results for female gamete and embryo cryoprotection, few studies have used vitrification as a mean to preserve male gametes. In this regard, the best results reported in the literature correspond to the human sperm (Isachenko et al., 2008; Satirapod et al., 2012), inclusive when no cryoprotectants were added (Saki et al., 2009), while some attempts of sperm vitrification have been carried out in animals (reviewed by Cuevas-Urbe 2011).

It has been suggested that slow freezing may not be appropriated for human spermatozoa collected from epididymis and testis because of their low number and poor in-situ motility (Endo et al., 2011). These authors have proposed sperm vitrification to overcome the aforesaid difficulties. In this way, vitrification may be an option for cat sperm, since it also shows reduced spermatozoa concentration when epididymal collection is carried out.

The shape and size of the spermatozoa are related to their competence to be cryopreserved, and it has been reported that gametes with big blade-shaped flat head are most sensitive to cold injury (Watson and Plummer, 1985). Horse, dog and cat are the domestic mammals with smaller spermatozoa head dimensions (Garner 2006), although longer than human spermatozoa, and it has been accepted that they have the highest stability to cold shock. Recently, it has been informed that vitrification preserves important physiological sperm parameters in dog using a non-permeable cryoprotectant (sucrose) to reduce the freezing injuries (Sánchez et al., 2011). The good results reported in canine sperm vitrification, the small size of the cat spermatozoa head and the little volume of sperm collected in cats (usually from epididymides) suggest that vitrification could be an alternative procedure for cryopreservation of feline spermatozoa.

Sucrose jointly to BSA was chosen in the present study to reduce the cold damage on cat spermatozoa during vitrification. Many other permeable and non-permeable cryoprotectants (as ethylene glycol, acetamide, dimethyl sulfoxide, trehalose, propanediol, polyvinyl alcohol, methyl glycol, glycerol, methanol, butanediol, polyethylene glycol, X-1000TM, and Z-1000TM) have been checked out to standardize the fish sperm vitrification (Cuevas-Urbe 2011, Cuevas-Urbe et al., 2011). In preliminary studies, the combination of permeable cryoprotectants (DMSO and ethylene glycol) was tested for cat sperm in our laboratory, but they were discarded because non-motile sperm was obtained (unpublished results).

As well as the sperm size, it has been suggested that the ultrastructural composition of cells is another important factor linked to the sperm survival after cryopreservation. The high concentration of sugars, proteins and other components into the sperm cells may act as natural cryoprotectants, since they make the intracellular spermatozoa matrix highly viscous and compartmentalized (Isachenko et al., 2003). The reduced water content into the spermatozoa, in contrast with

embryos and oocytes, may contribute to reduce the ice crystal formation during the intracellular vitrification (Isachenko et al., 2003). A recent review (Morris et al., 2012) calls into question the intracellular formation of ice crystals during freezing, and suggests that the osmotic imbalance during freezing and thawing is the main reason for sperm injury. These authors consider that intracellular vitrification occurs always during the freezing process, and propose that sperm vitrification process could achieve cryopreservation throughout the vitrification of extracellular medium and the minimizing of the cell damage during warming.

This is the first study carried out in cat sperm vitrification, and hopeful results have been obtained, since motility was slightly maintained. The absence of cryoprotectants prevented the motility in vitrified cat sperm, in contrast with Isachenko et al. (2004b) that described around 50% of sperm motility after free-cryoprotectant vitrification in human. However, sucrose showed cryoprotective properties for vitrified cat sperm, although lower than described in dog (Sánchez et al., 2011) and human (Isachenko et al., 2008). The best motility percentages after vitrification in cat sperm were reached with sucrose 0.4M plus BSA 1% (12.9%), whereas a lower concentration of sucrose (0.25M) was the most effective for vitrified dog sperm (Sánchez et al., 2011), obtaining 42.5% of progressive motility.

Domestic and wild felines have a high percentage of sperm morphological abnormalities (Axner et al., 1999), and epididymal samples contain higher defective spermatozoa (around 36-54%) than ejaculated samples (Goodrowe and Hay, 1993; Lengwinat and Blottner, 1994). In the present study, the average normal sperm morphology was $76.8 \pm 5.0\%$ in epididymal fresh sperm. After vitrification, sperm morphology did not show significant differences ($p < 0.05$) with fresh samples or between different sucrose concentrations, suggesting that this cryopreservation method does not negatively affect the sperm morphology in cat.

Acrosome integrity seems to be the most important factor influencing fertilization rates, and cooled (Pukazhenthil et al., 1999) or freeze-thaw processes (Goodrowe and Hay, 1993) easily damage the feline spermatozoa. It has been suggested that epididymal spermatozoa have a more delicate plasmatic membrane and they are less resistant to the freezing-thawing process than spermatozoa obtained by electroejaculation (Zambelli et al., 2010). The spermatozoa damage after slow freezing has been associated with the production of oxygen reactive substances (ROS), osmotic stress linked to cryoprotectants and cooling, or ice crystal formation (Morris et al., 2012). In the present study, the percentage of intact acrosome after vitrification was similar to values obtained in fresh sperm, and sperm vitrification media did not affect the acrosome membrane. Data here reported are in agreement with studies carried out in dog (Sánchez et al., 2011). The special sensitivity of sperm membranes to cooling and thawing temperatures in cat are associated with a reduction of intact acrosome during the freezing-thawing process (Jiménez et al., 2011). The absence of this critical temperature range during vitrification could explain that acrosome structure was not significantly affected in the present study. In this sense, it has been affirmed that any structural change in the membrane and cellular organelles is reduced by vitrification, since cells are “frozen” instantly (Sánchez et al., 2011).

In summary, sperm vitrification is a cheaper and faster method than conventional freezing, and offers encouraging results for the preservation of epididymal cat sperm. The use of sucrose associated with BSA eliminates the washing sperm process to remove the cryoprotectants. Therefore, sperm warming runs as a very straightforward process and a reduction in sperm loss is obtained (Hossain and Osuamkpe, 2007). The best motility results were reached using sucrose 0.40M and vitrification did not affect negatively the acrosome and morphology of cat spermatozoa.

Although vitrified-warmed sperm values in cat are too low for a practical use in artificial insemination, it might be an alternative for spermatozoa cryopreservation to be used for intracytoplasmic sperm injection or *in vitro* production of embryos. Further research is necessary for evaluating other cryoprotectants, sperm carriers, or sperm processing.

References

- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H., 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 77-81.
- Axnér, E., Linde-Fosberg, C., Einarsson, S., 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 52, 767-778.
- Axnér, E., Hermansson, U., Linde-Forsberg, C., 2004. The effect of Equex STM past and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 179-191.
- Cervera, R., Garcia-Ximénez, F., 2003. Vitrification of zona-free rabbit expanded or hatching blastocysts: a possible model for human blastocysts. *Hum. Reprod.* 18, 2151-2156.
- Chatdarong, K., Thuwanut, P., Morrell, J.M., 2010. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology* 73, 1284-1292.
- Cocchia, N., Ciani, F., El-Ras, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Montagnaro, S., Avallone, L., Tortora, G., Lorizio, R., 2010. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* 18, 1-8.
- Comizzoli, P., Songsasen, N., Hagedorn, M., Wildt, D.E., 2012. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology* 78, 1666-1681.
- Cuevas-Uribe, R., 2011. A general approach for vitrification of fish sperm. Doctoral Thesis. Kentucky State University.
- Cuevas-Uribe, R., Leibo, S.P., Daly, J., Tiersch, T.R., 2011. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology* 63, 186-197.

- Dinnyes, A., Liu, J., Nedambale, T.L., 2007. Novel gamete storage. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 719-731.
- Endo, Y., Fujii, Y., Shintani, K., Seo, M., Motoyama, H., Funahashi, H., 2011. Single spermatozoon freezing using Cryotop. *J. Mamm. Ova. Res.* 28, 47-52.
- Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., Zambelli, D., Anastasi, P., Hoogewijs, M., Van Soom, A., 2010. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology* 74, 31-39.
- Garner, D.L., 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943-957.
- Goodrowe, K.L., Hay, M.A., 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 40, 967-975.
- Hossain, A.M., Osuamkpe, C.O., 2007. Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch. Androl.* 53, 99-103.
- Howard, J.G., Brown, J.L., Bush, M., Wildt, D.E., 1990. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J. Androl.* 11, 204-215.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Dessolet, S., Nawroth, F., 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectant: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed. Online* 6, 191-200.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P., Dessolet, S., Nawroth, F., 2004a. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.* 19, 932-939.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessolet, S., Nawroth, F., Van Der Ven H., 2004b. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol. Reprod.* 71, 1167-1173.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, A.G., Risopatrón, M.J., Sanchez, R., 2008. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 136, 167-173.
- Jimenez, E., Perez-Marin, C.C., Millan, Y., Agüera, E., 2011. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 265-269.
- Lengwinat, T., Blottner, S., 1994. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 291-301.
- Morris, G.J., Acton, E., Murray, B.J., Fonseca, F., 2012. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71-80.

- Pukazhenthil, B., Pelican, K., Wildt, D., Howard, J.G., 1999. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol. Reprod.* 61, 135-141.
- Saki, G., Rahim, P., Zergani, M.J., 2009. Vitrification of small volume of normal human sperms: use of open pulled straw carrier. *J. Med. Sci.* 9, 30-35.
- Sanchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., Isachenko, E., 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 43, 233-241.
- Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S., Choktanasiri, W., 2012. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia* 44, 786-790.
- Siemieniuch, M., Dubiel, A., 2007. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 135-144.
- Swanson, W.F., 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66, 49-58.
- Tebet, J.M., Martins, M.I.M., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D., Lopes, M.D., 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66, 1629-1632.
- Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Axner, E., 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70, 233-240.
- Toyonaga, M., Sato, Y., Morita, M., Watanabe, M., Oba, H., Mizutani, T., Hori, T., Tsutsui, T., 2010. The qualities of cryopreserved epididymal sperm collected from feline epididymides stored at low temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 777-780.
- Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M., Hori, T., 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 397-399.
- Vatja, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H., 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 53-58.
- Villaverde, A.I.S.B., Martins, M.I.M., Castro, V.B., Lopes, M.D., 2006. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* 66, 1641-1644.
- Watson, P., Plummer, J.M., 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling, in: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds), *Deep freezing of boar sperm*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pp. 113-127.

Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., Belluzi, S., 2002. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 310-313.

Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F., Merlo, B., 2007. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in domestic cat. *Theriogenology* 68, 796-803.

Zambelli, D., Iacono, E., Raccagni, R., Merlo, B., 2010. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 73, 886-892.

7. DISCUSIÓN GENERAL

La criopreservación de esperma se presenta como una tecnología reproductiva indispensable dentro de los programas de conservación en felinos salvajes, cuya subsistencia se encuentra terriblemente amenazada. Pero son muchas las dificultades que existen a la hora de establecer protocolos repetibles y eficaces; y no se conoce en profundidad cuáles son los factores que inciden a nivel individual en la capacidad de congelación del esperma. El desarrollo e implementación de nuevas y mejores técnicas de criopreservación espermática en felinos salvajes adquiere más importancia si cabe, debido a que a menudo las muestras sobre las que se trabajan son únicas e irrepetibles, ya que pueden pertenecer a animales que han muerto, y la recuperación y conservación de su material genético resulta indispensable.

Se desconoce qué factores afectan negativamente a la calidad espermática en gato, y por ende a su conservación. Se ha postulado que el clima, la dominancia, la edad, el ambiente endocrino, la estación, la raza, el tipo de alojamiento o la alimentación, entre otras causas pueden condicionar la calidad del esperma. Pero también factores relacionados con el método de recogida de esperma, manipulación de la muestra, diluyentes o protocolos de congelación se deben tener en cuenta a la hora de manipular esperma de gato. En este sentido, se propuso evaluar la repercusión de los protocolos anestésicos empleados para la castración de gatos sobre la calidad espermática. Las técnicas más utilizadas para la obtención de esperma felino son la electroeyaculación y la recogida epididimaria (tras orquiectomía). Ambos métodos requieren la inmovilización y anestesia del animal, para lo cuál las sustancias anestésicas más utilizadas son los barbitúricos, ketamina e isoflurano. Los barbitúricos son agentes utilizados para la eutanasia en gatos debido a su bajo coste y su rápido efecto. Tras la sobredosificación de estas sustancias, el sistema nervioso central se deprime, provocando una rápida y progresiva pérdida de conciencia e induciendo una parada cardio-respiratoria (Tasker, 2008). El HCl de ketamina se utiliza también con frecuencia en gato, ya que tiene un amplio margen de seguridad y es compatible con otras sustancias (Hau and Van Hoosier, 2003). Este agente no deprime la función respiratoria ni cardíaca, sino que tiene efectos simpaticomiméticos indirectos e incrementa los niveles plasmáticos de norepinefrina (Anton et al, 2004). Su alta liposolubilidad le permite atravesar la barrera hemato-encefálica y redistribuirse por la circulación, siendo metabolizado en el hígado. Su combinación con sedantes como α -2 adrenérgicos (xilacina, medetomidina, romifidina...) consigue la reducción de la rigidez muscular asociada a la ketamina. Por otro lado, el isoflurano tiene también alta solubilidad lipídica y es rápidamente absorbido a través de los alveolos, pasando hacia la sangre y el cerebro. Generalmente la función cardíaca se mantiene mejor con isoflurano que con anestésicos parenterales, aunque debe cuidarse la posible depresión respiratoria. Consigue una buena relajación muscular y la recuperación es bastante rápidamente (Flecknell, 1996). El artículo 1 de esta Tesis Doctoral hipotetiza que las sustancias utilizadas en la anestesia o eutanasia en gatos previa a la orquiectomía podía inducir variaciones en la calidad espermática. Estudios realizados en pecarís describen que la combinación de acepromazina-tiletamina-zolazepam o el propofol ejercen variaciones significativas en la motilidad espermática progresiva y sobre la integridad de membrana cuando se utilizan para electroeyaculación (Souza et al.,

2009). En nuestro estudio, la calidad espermática fue evaluada para conocer si las 3 sustancias anestésicas utilizadas tenían un efecto positivo o detrimental sobre él. Tras la administración intravenosa de barbitúricos (en la eutanasia) se encontraron valores significativamente inferiores a los obtenidos en muestras de gatos anestesiados con isofluorano. Sin embargo, otros parámetros como la morfología, integridad de acrosoma, viabilidad y funcionalidad de membrana, no sufrieron cambios significativos. Estudios previos realizados sobre ratas para evaluar el efecto de 5 diferentes métodos de eutanasia (decapitación, eter, halotano, nembutal y asfixia por CO₂) no mostraron diferencias reseñables (Slott et al., 1994), lo que contrasta con nuestros hallazgos. Aunque los resultados en las ratas tratadas con barbitúricos (nembutal) eran inferiores, las diferencias no eran significativas. Consideramos que las altas dosis de barbitúricos empleadas para eutanasiar a los gatos incluidos en este estudio (200 mg kg⁻¹) podrían estar relacionadas con su efecto sobre la motilidad. Respecto a la ketamina, un estudio realizado en chinchillas (Busso et al., 2005) demostró que la calidad espermática no se altera tras la anestesia previa a la electroeyaculación. En cuanto a sustancias anestésicas volátiles como el isofluorano, pocos estudios han evaluado su efecto sobre el esperma. Pero respecto al halotano, otro agente volátil, se describe que inhibe la actividad flagelar al actuar sobre los componentes ATPasa de la dineína del flagelo (Hinkley, 1979). Otros estudios demuestran que el halotano no tiene efectos adversos sobre la fertilidad del ratón o de la rata macho (Bruce, 1973; Kennedy et al., 1976), y no incrementa la proporción de espermatozoides morfológicamente anormales en ratón (Land et al., 1981). En el hombre, la exposición de esperma (no contacto directo) a diferentes concentraciones de isofluorano incrementaron de forma reversible la motilidad y viabilidad espermática (Wang et al, 2008). En nuestro estudio, las diferencias observadas en la motilidad espermática de muestras frescas desaparecían cuando las muestras congeladas-descongeladas eran evaluadas. Sólo la integridad de membrana mostró valores significativamente inferiores en muestras de gatos tratados con barbitúricos. En un estudio realizado en ponies afirma que el halotano no afecta a la motilidad post-descongelación de los espermatozoides epididimarios (Schulman et al., 2003), lo que está de acuerdo con nuestros resultados. De todo el estudio se desprende que los anestésicos pueden afectar a la motilidad del esperma tras la recogida, mientras que otros parámetros como la integridad de acrosoma, viabilidad espermática y la integridad de membrana se vieron afectados en muestras congeladas-descongeladas.

Además de evaluar el efecto de los anestésicos, se estudió el efecto del tiempo y de la refrigeración sobre la calidad espermática y su congelabilidad, ya que esto podría condicionar el desarrollo de nuevos protocolos de conservación. La cola del epidídimo proporciona en animales vivos un excelente ambiente para mantener a los espermatozoides en un estado quiescente. Y por tanto, los espermatozoides ahí retenidos mantienen su motilidad y capacidad de fertilización (Young 1931, White 1993, Paufler et al, 1968). En otras especies se ha demostrado que cuando los animales o sólo los testículos son refrigerados tras la muerte, los espermatozoides se mantienen viables y con capacidad fertilizante durante periodos largos de tiempo, pudiendo ser criopreservados con éxito. Por su parte, estudios realizados en gatos demuestran que los epidídimos pueden ser mantenidos a 4°C durante 24h,

manteniéndose la calidad espermática a la descongelación (Toyonaga et al., 2010). En el artículo 2 de esta tesis se evaluó el efecto que puede ejercer la refrigeración de testículo y epidídimo de gato sobre la calidad seminal tras la congelación, valorando dichas muestras hasta 6 horas después de su descongelación. Estudios previos demuestran que el esperma de gato es muy resistente a la refrigeración; cuando las muestras son mantenidas a 4°C dentro o fuera del epidídimo durante diferentes periodos de tiempo, los espermatozoides mantienen sus características sin sufrir un descenso significativo en su calidad. Sin embargo, como refleja el artículo 2 de esta Tesis, la motilidad del esperma congelado-descongelado sometido a refrigeración previo de 12h, sufre un descenso significativo después de 6 horas, en comparación con las muestras de epidídimo congeladas inmediatamente después de la orquiectomía. Se describe que las anomalías espermáticas son más numerosas cuando los epidídimos son refrigerados durante 24h (Hay and Goodrowe 1993) o 48h (Toyonaga et al, 2010) que cuando las muestras se congelan sin refrigeración previa. En nuestro estudio observamos que la morfología espermática en muestras de epidídimo procesado justo después de la castración era similar al de epidídimos mantenidos durante 12h a 4°C. Las variaciones apreciadas entre estudios pueden atribuirse al medio utilizado para mantener los especímenes, al método de evaluación y al método de congelación. La pasta Equex ejerce un papel protector sobre el daño potencial que tanto la refrigeración como la congelación ejercen sobre las membranas y acrosoma (Axner et al., 2004). Después de la descongelación, los porcentajes de acrosomas normales, evaluado mediante tinción PSA-FITC, no mostró diferencias a la descongelación (hora 0 y 6). Como se describe en ciervo (Soler et al., 2005), la motilidad post-descongelación disminuyó de forma más marcada que otros parámetros espermáticos después de mantenerlo durante 12 h en las gónadas. Se ha sugerido que debido a la muerte de los espermatozoides, se producen cambios del ambiente que rodea al resto de espermatozoides epididimarios, lo que reduce de forma más marcada la motilidad post-descongelación que otras características espermáticas. La integridad del DNA es esencial para la transmisión de información genética, pero existen pocos estudios en gato que lo valoren. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados ni durante las 6h post-descongelación en que se evaluaron las muestras. Aunque no se alteraron las características espermáticas después de la descongelación, el análisis espermático después de 6h demostró un efecto detrimental sobre la motilidad espermática y recomienda el uso de este esperma tan pronto como sea posible. Toyonaga et al (2011) demostró que las mejores tasas de gestación se obtienen cuando el esperma se deposita intratubárico, en lugar de intrauterino (IUTAI). En dicho estudio se utilizó esperma epididimario mantenido a baja temperatura durante 24h. Consideramos que los resultados obtenidos en el artículo 2 explican parcialmente las observaciones de Toyonaga et al (2011), ya que los espermatozoides tendrán que recorrer un camino más corto después de la inseminación intratubárica y ésto será determinante para conseguir mejores tasas de fertilización. Las características del esperma epididimario de gato conservado en refrigeración fueron mantenidas durante 6h después de la congelación-descongelación, excepto en el caso de la motilidad que sufrió una reducción significativa. Nuestro estudio demuestra la utilidad de mantener tanto epidídimos

como testículos en solución salina a 4°C durante 12h antes de ser congeladas, cuando esto sea necesario.

El presente trabajo de Tesis ha abordado la problemática de los diluyentes para criopreservación en el artículo 3, tratando de dar solución a aquellos clínicos que desean congelar esperma pero no pueden preparar complejos cóckteles ni pueden seguir protocolos con infinidad de pasos hasta llegar a la congelación. Diferentes diluyentes para congelación se evaluaron en el artículo 3, comparando los resultados a la refrigeración, congelación y descongelación. Para este estudio se plantearon 2 experimentos debido a que el reducido número de espermatozoides que se recogen desde epidídimo limitaba la división de las muestras en 5 alícuotas. En el 1^{er} experimento se compararon diluyentes comerciales específicos para otras especies animales, mientras que en el 2^o experimento se comparó el diluyente que mejores resultados ofreció en el 1^{er} experimento, frente a diluyentes específicos para gato, preparados en nuestro laboratorio. Los resultados demostraron que el diluyente Triladyl puede ser una opción válida para diluir esperma de gato en programas de congelación según los resultados laboratoriales obtenidos, mientras que AndroMed y Gent no se mostraron eficaces para dicho fin. El presente estudio utilizó la evaluación subjetiva para conocer los valores de motilidad espermática. Como describen Siemieniuch y Woclawek-Potocka (2008), el número de espermatozoides móviles en gato es insuficiente para llevar a cabo estudios computerizados por CASA. Filliers et al (2008) describieron los valores de referencia para evaluar la motilidad en muestras frescas y refrigeradas de gato, pero recordaron que no es una técnica de amplia difusión y por tanto, es necesario que sea mejorada. Para la evaluación de la vitalidad espermática se empleó SYBR-14/PI, y observamos que el diluyente Triladyl proporcionaba una mejor protección durante la refrigeración que los otros diluyentes comerciales, con valores superiores a los descritos por Kashiwasaki et al. (2005). La integridad del ADN a la descongelación y 6h después mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo, lo que indicaba que este parámetro variaba con el tiempo de incubación.

En el 2^o experimento del artículo 3 se observó que, durante el proceso de refrigeración, el esperma diluido en un medio conteniendo glucosa tenía mayor motilidad que aquel que se diluía en medio con fructosa, aunque las diferencias no eran significativas. Hallazgos similares fueron publicados por Glover y Watson (1987) que compararon diluyentes con glucosa, fructosa o galactosa. Dichos autores indicaron que el espermatozoide felino exhibe una limitada actividad metabólica y/o tiene suficiente substrato energético endógeno. Se ha sugerido que la glucosa y la fructosa pueden ser beneficiosas a temperatura corporal (Lapwood and Martin 1966), pero no ofrecen ventajas cuando el esperma es almacenado a 5°C, al igual que demuestran los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Los efectos beneficiosos de la suplementación con azúcares sobre la viabilidad post-descongelación de los espermatozoides varía entre especies debido a las diferencias físicas y químicas en la composición del semen (Purdy 2006). A la descongelación, las muestras diluidas en Tris-fructosa mostraron una motilidad estable. La fructosa induce una motilidad más rápida y lineal en esperma canino que la glucosa (Rigau et al. 2001). La adición de glucosa a diluyentes utilizados en macho cabrío mejoró la motilidad progresiva después de la congelación, en contraste con lo ocurrido tras

la adición de disacáridos, mientras no se observaron diferencias después de añadir fructosa (Naing et al. 2010). Las subpoblaciones espermáticas pueden mostrar diferencias en la sensibilidad al estímulo ambiental (Rigau et al. 2001) y su respuesta puede variar según el tipo y concentración del azúcar presente. Nuestros resultados demuestran que la suplementación del medio con glucosa o fructosa no está asociado con variaciones en las características espermáticas, de acuerdo con los trabajos de Castelo et al. (2010) en pécaris. Se describe que el proceso de congelación-descongelación tiene un efecto suave sobre los parámetros de motilidad, mientras que se describen efectos adversos sobre el plasmalema, lo que da lugar a pérdida de calidad espermática. El uso de diluyentes basados en TRIS-glucosa muestra que el espermatozoide de gato congelado-descongelado alcanza resultados aceptables en términos de viabilidad celular y motilidad, pero pobres resultados en cuanto a integridad del acrosoma (Siemieniuch and Dubiel, 2007). Se ha demostrado que la congelación daña las membranas del espermatozoide felino y su estatus acrosomal, mientras la refrigeración no afecta significativamente la morfología espermática (Axner et al. 2004). De acuerdo con Axner et al (2004), no hubo una disminución significativa de la motilidad inmediatamente después de la descongelación. Algunas muestras presentaron incluso mayor motilidad a la descongelación, lo que hemos achacado a posibles cambios de pseudo-capacitación o "capacitation-like". Los productos procedentes de las especies reactivas del oxígeno (ROS) incrementan durante la incubación post-descongelación y pueden inducir la capacitación prematura de los espermatozoides, la reacción acrosómica o el daño del mismo (De Laraminde et al. 1997). El plasma seminal contiene muchos componentes con actividad antioxidante no-oxidativa (como ácido ascórbico, α -tocoferol, taurina y albúmina) que pueden participar en la protección de los espermatozoides frente a ROS (Bustamante Filho et al. 2009). En nuestro estudio, sólo los diluyentes a base de TRIS-yema de huevo preparados específicamente para gatos fueron suplementados con taurina, un antioxidante que protege la membrana espermática frente a la peroxidación lipídica (Buff et al. 2001). Se ha sugerido que la taurina puede mejorar la fluidez e integridad de la membrana, así como la motilidad espermática (Luvoni et al. 2002). Sin embargo, se describe que la taurina no mejora la integridad del acrosoma en espermatozoides de gato congelados-descongelados (Luvoni et al. 2002). Aunque las muestras diluidas en medios con taurina mostraron mejores resultados en muchos de los parámetros analizados, no se puede afirmar que esta mejora sea debida a su efecto antioxidante, y otros estudios deben ser diseñados para explicar dicha acción. Tanto los diluyentes como el tiempo de incubación tras la descongelación afectaron significativamente a la integridad del ADN espermático. Algunos investigadores han demostrado que la fragmentación del ADN se reduce gracias a la acción de los antioxidantes (Lopes et al. 1998), y que la integridad del ADN después de 6h post-descongelación podría mejorarse tras la suplementación con DL-cisteína (Thuwanut et al. 2008). Las muestras de nuestro estudio que fueron suplementadas con taurina también presentaron mejora en la integridad del ADN. Así pues, el daño del ADN fue significativamente menor en muestras diluidas en medios a base de TRIS-yema de huevo diseñados para gatos, sugiriendo que los componentes de dichos diluyentes protegen el ADN del espermatozoide felino. Aunque el proceso de refrigeración utilizado en nuestro estudio era el estándar para espermatozoide felino, los resultados

indican que dicho paso debe ser mejorado, ya que observamos un marcado deterioro de la calidad espermática. En este sentido, se ha sugerido que el uso de centrifugación en gradientes de densidad podría ser una de las formas de mejorar la calidad del esperma antes de su criopreservación (Filliers et al. 2008; Chatdarong et al. 2010). Triladyl demostró ser un buen diluyente comercial para congelación de esperma de gato. Sin embargo, al contener glicerol, es posible que su efecto durante el proceso de equilibrado tenga efectos negativos sobre la calidad espermática. Aunque diluyentes preparados específicamente para conservación de esperma de gato ofrecen mejores resultados globales, la dificultad para prepararlo y utilizarlo pueden limitar su uso práctico. Se deben realizar más estudios que evalúen el éxito fecundante de este esperma.

Otro de los problemas con los que nos encontramos al evaluar la morfología del esperma de gato es la gran variación que existe en los trabajos científicos publicados. Se describe que hay gran variabilidad entre individuos al estudiar esperma felino epididimario. El artículo 4 de esta Tesis Doctoral evaluó el efecto de las tinciones sobre la morfología espermática. Otro de los problemas con los que nos encontramos al evaluar la morfología del esperma de gato es la gran variación que existe en los trabajos científicos publicados. Se describe que hay gran variabilidad entre individuos al estudiar esperma felino epididimario. Tal como describen Axner and Forsberg (2007), el porcentaje medio de espermatozoides normales en gatos domésticos puede ser menor del 60%, mientras que Wildt et al (1983) y Howard et al (1990) obtuvieron valores superiores del 60%. Además, hay que tener en cuenta las diferencias entre laboratorios como consecuencia del uso de diferentes métodos de fijación, tinción y clasificación morfológica (Axner et al, 1997). Se ha descrito una reducción en el número de gotas citoplasmáticas proximales y espermatozoides con cola enrollada, y un mayor porcentaje de piezas intermedias y colas normales cuando se usa el método de centrifugación de una capa de coloides (Chatdarong et al., 2010). Dichos investigadores observaron que no había diferencias en el número de anomalías de la cabeza espermática en muestras de esperma congelado-descongelado usando diferentes métodos de selección de esperma, aunque sí hubo un incremento en piezas medias normales y colas y una disminución de gotas citoplasmáticas proximales cuando usaron métodos diferentes al método de lavado simple, concretamente la centrifugación en una capa de coloides. El artículo 4 de esta Tesis compara la capacidad para distinguir morfoanomalías en espermatozoides epididimarios felinos usando dos técnicas de tinción. La interpretación de los resultados es muy importante a nivel laboratorial para diagnosticar subfertilidad. En gato doméstico, la valoración morfológica del semen puede reflejar el potencial de fertilidad del esperma obtenido (Howard, 1992), y también puede ser útil a la hora de aceptar o rechazar una muestra destinada a la congelación. Sin embargo, pueden existir grandes variaciones dependiendo del sistema de clasificación, técnica de extensión y tinción de la muestra y del nivel de experiencia de los técnicos de laboratorio. En este sentido, Axner and Forsberg (2007) recomendaron considerar los efectos de la edad y la estación del año sobre la morfología espermática para una correcta evaluación de la muestra de semen. En la literatura existente sobre morfología espermática en felinos, se describen diferentes técnicas de tinción como 0.3% glutaraldehído

(Howard et al., 1990, Penfold et al., 2003), carbol fucsina (Axnér et al, 1998, 1999, 2004), eosina-nigrosina (Glover and Watson, 1987; Johnston et al, 2001, Tittarelli et al, 2006), Diff-Quick (Mota and Ramalho-Santos, 2006), Spermac (Baran et al, 2004 a, b), tinción de Pope (Tebet et al. 2006) y Fast Green FCF Rosa de Bengala (Villaverde et al, 2006), y también se han observado diferencias en preparaciones húmedas (Zambelli, 1993) o fijadas con formol (Axnér, 1999). Se describen variaciones en los valores medios referidos a morfología espermática, como consecuencia de la preparación de la extensión en diferentes especies como perro (Root-Kustritz et al, 1998), hombre (Meschede et al., 1993), gallo (Bilgili et al, 1985) o toro (Sprecher and Coe, 1996). En esta Tesis, también detectamos diferencias morfológicas entre los métodos usados para evaluar el esperma epididimario felino. Con la tinción Diff-Quick se identificó un mayor número de espermatozoides normales que cuando se usó la tinción eosina-nigrosina. En el gato doméstico es frecuente encontrar machos con altas proporciones de espermatozoides anormales (>60%/eyaculado) y son definidos como teratospérmicos. Y los espermatozoides normales obtenidos en estos gatos teratospérmicos suelen sufrir capacitación *in vitro*, tener comprometida su capacidad de llevar a cabo la fosforilación en tirosina y poseen una capacidad reducida de reacción acrosomal (Penfold et al, 2003). A la hora de realizar la evaluación morfológica del esperma felino también nos encontramos con una gran cantidad de sistemas de clasificación. En los artículos científicos puede encontrarse una clasificación de anomalías primarias, secundarias y terciarias según ocurran en el testículo, epidídimo o vasos deferentes, o cuando se produzcan por un mal manejo del semen tras la recogida (Platz and Seager, 1978; Zambelli and Cunto, 2005). Otros autores prefieren clasificar las anomalías morfológicas como primarias y secundarias, según un origen espermatogénico o epididimario (Axnér, 1998). Y finalmente, existe una clasificación basada en la parte del espermatozoide que está afectada, como la cabeza, pieza intermedia o la cola (Axnér et al, 1998). Se ha demostrado que la técnica de tinción o de preparación pueden alterar la morfología de los espermatozoides eyaculados caninos, mostrando un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en muestras teñidas con Diff-Quick que en las muestras teñidas con eosina-nigrosina (Root Kustritz et al, 1998). En nuestro estudio observamos similares en esperma epididimario felino. Observamos menos espermatozoides macrocefálicos cuando se empleó la tinción de eosina-nigrosina. Esto puede deberse a que al existir muchos espermatozoides teratospérmicos (Pukazhenthhi et al. 1999, 2000) y poseer una membrana alterada presentan mayor sensibilidad al estrés osmótico, favoreciendo la rotura del espermatozoide. En este sentido, puede sugerirse que una tinción húmeda como eosina-nigrosina puede afectar a las membranas espermáticas, haciendo desaparecer los espermatozoides macrocefálicos. En nuestro estudio, se detectaron menos gotas citoplasmáticas tras realizar utilizar la tinción Diff-Quick. Algo similar ha sido descrito tras el uso de la tinción Spermac, atribuyéndose la disminución de gotas citoplasmáticas al efecto del alcohol durante la fijación (Schäfer and Holzmann 2000). Es posible ocurra lo mismo en la tinción Diff-Quick, en la que el primer paso tiene por objetivo fijar la muestra. En algunos casos, la presencia de gotas citoplasmáticas distales son consideradas normales en el esperma epididimario felino (Tebet et al. 2006). Meschede et al (1993) y Oral et al. (2002) describieron

que el porcentaje de defectos en la cabeza, pieza intermedia y cola en espermatozoides humano era muy diferente al comparar 3 técnicas de tinción y preparación espermática (Papanicolaou, Shorr y tinción húmeda). Los resultados obtenidos en el artículo 4 de esta Tesis sugieren que las técnicas de tinción pueden alterar la morfología de los espermatozoides felinos, sobre todo en espermatozoides epididimarios el cual presenta más gotas citoplasmáticas que el espermatozoides eyaculado. En este sentido, una tinción húmeda puede ser mejor que una tinción secada al aire para monitorear los cambios en los espermioigramas anormales. Por otra parte, no se observó que la centrifugación o la refrigeración afectaran a la morfología del espermatozoides epididimario del gato.

Otro de los factores que pensamos que podría influir en la calidad del espermatozoides de gato es el momento del año en que se recogió la muestra. Basándonos en el hecho fisiológico de que un aumento de la secreción de melatonina durante el fotoperíodo decreciente inhibe la actividad reproductora y viceversa, comparamos la calidad del espermatozoides y la histología testicular de las muestras recogidas durante los meses de fotoperíodo decreciente (desde el 21 de junio hasta el 20 de diciembre) con las muestras recogidas durante los meses de fotoperíodo ascendente (desde el 21 de diciembre hasta el 20 de junio) en nuestra latitud. Los resultados derivados del artículo 5 de esta Tesis demuestran que el fotoperíodo (o estacionalidad) afectan ligeramente a los parámetros testiculares y espermáticos, al apreciarse un aumento significativo del volumen testicular cuando el fotoperíodo era ascendente. Se detectaron diferencias significativas en el número de túbulos seminíferos que contenían espermatozoides y en la motilidad progresiva espermática tras la recogida. Se observó que con el aumento de las horas de luz diaria, aumentaba la motilidad progresiva. La síntesis y secreción de melatonina a nivel de la glándula pineal está favorecida por la exposición a la luz y esto puede ser responsable del incremento de la motilidad espermática y la presencia de espermatozoides en los túbulos seminíferos del testículo. La elevada motilidad progresiva en gatos está correlacionada positivamente con la capacidad de fertilización *in vitro* (Zambelli et al, 2006). Por tanto, puede ser interesante determinar cuándo los gatos muestran mejor calidad espermática, con vistas a optimizar la fecundación (*in vitro* o *in vivo*) o para recoger mejores muestras para criopreservación. La estación reproductiva en las gatas coincide con el aumento del fotoperíodo (Robinson and Cox, 1970), cuando se produce una regulación negativa de la melatonina. Y como ocurre en otras especies estacionales, el macho debe estar preparado para una intensificación de su actividad reproductiva. Diferentes autores han descrito una variación estacional en la motilidad espermática de los gatos a lo largo del año. En consonancia con nuestros resultados, Blottner and Jewgenow (2007) describieron una mayor motilidad progresiva en gato durante la primavera. Por el contrario, Spindler and Wildt (1999) no detectaron diferencias entre estaciones, aunque sus resultados mostraron valores de motilidad superiores en primavera e inferiores en invierno. La mejora del porcentaje de motilidad estuvo asociado con un menor porcentaje de defectos morfológicos primarios ($r=-0.339$; $p<0.05$), lo cual ha sido corroborado en otros estudios (Axner and Forsberg, 2007; Blottner and Jewgenow, 2007). Por el contrario, Spindler and Wildt (1999) no observaron esta asociación. La evaluación de la calidad espermática en nuestro estudio mostró que no existe una

influencia estacional en el estatus acrosomal, al igual que Spindler and Wildt (1999), ni en cuanto a la morfología. Esta última observación se contrapone a lo observado por Axner y Linde-Forsberg (2007), quienes indicaban que desde Febrero a Julio hay mayor porcentaje de espermatozoides normales, y concluyendo que la estacionalidad afecta a la morfología espermática en el gato. Esto difiere de nuestros resultados, ya que observamos que tanto la morfología normal como los defectos primarios eran constantes a lo largo del año. El peso combinado de epidídimo-testículo fue de 2.12 g. No encontramos datos similares en la literatura consultada, ya que normalmente los testículos son pesados de forma independiente. En este sentido, se demuestra estadísticamente que no es necesaria la omisión del peso del epidídimo cuando se determina el peso de la “gónada” (Adkins et al, 1982). El epidídimo depende de la producción de andrógenos para su maduración funcional y su peso tiene valor como indicador de la función testicular. En vista a esta relación, las implicaciones negativas derivadas de incluir el peso del epidídimo en las determinaciones rutinarias de peso de gónadas masculinas serían mínimas; a pesar de todo, esta práctica dependerá del objetivo de estudio (Adkins et al, 1982). El peso conjunto de epidídimo y testículo mostraron una tendencia a ser más pesados durante el período de días largos, mientras que otros autores describen un incremento significativo del peso testicular en dicha estación (1.46g en primavera frente a 1.29g en otoño/invierno; $P < 0.031$) (Blottner and Jewgenow, 2007). Siempre deben tenerse en cuenta las mediciones testiculares y como describen recientemente Mota et al (2012), el peso testicular podría usarse para predecir el éxito de trasplantes heterólogos (o xenotrasplantes) de tejido testicular, lo que remarca su importancia en la evaluación del macho. De modo similar, se ha afirmado que el volumen testicular es importante para evaluar la función testicular, ya que representa la calidad de la espermatogénesis (Dohle et al, 2005). En el presente artículo detectamos diferencias estacionales del volumen testicular. Stornelli et al (2007) afirman que las células testiculares sufren cambios estacionales en su morfología, lo cual podría estar asociado con una producción espermática estacional; sin embargo, los autores no evaluaron esta idea. El presente estudio confirma parcialmente la teoría de Stornelli et al (2007), ya que algunas características histológicas testiculares (túbulos seminíferos conteniendo espermatozoides) y los valores de calidad espermática (motilidad progresiva) sufren variación a lo largo del año. Por el contrario, Spindler and Wildt (1999) afirman que no existe un efecto estacional sobre la cantidad ni sobre la calidad del esperma epididimario en gatos, y que la espermatogénesis se mantiene durante todo el año en gatos con acceso al exterior. Algunos autores sugieren que esto podría ser una ventaja genética para los machos que son reproductivamente activos todo el año, o al menos que permanecen activos también fuera de la estación reproductiva normal de la hembra. Durante nuestro estudio, observamos los espermatozoides en los túbulos seminíferos durante la estación reproductora y no reproductora, de acuerdo con Kirkpatrick (1985), y suporta la idea de Spindler and Wildt (1999) de que la espermatogénesis se mantiene en el tiempo. La espermatogénesis se vio incrementada durante el fotoperíodo ascendente, aunque las diferencias observadas no fueron significativas, al contrario que en otros estudios (Blottner and Jewgenow, 2007; Stornelli et al., 2009). Y se observó relación entre el incremento de las células de Leydig y la mejora de la espermatogénesis, aunque hubo conexión con la

cantidad de liposomas observados. La fluctuación estacional de la concentración de testosterona fue sugerida por Johnston et al (1984) y corroborada por Kirkpatrick (1985). Las marcadas fluctuaciones en la concentración de testosterona sugirieron que una única muestra no es suficiente para una evaluación de la función androgénica del testículo en el gato. Blottner y Jewgenow (2007) describieron que la testosterona testicular tiene una variación estacional y, del mismo modo, Tsutsui et al (2009) concluyeron que fuera de la estación reproductiva se produce un declive en su producción. Es interesante la observación de Kirkpatrick (1985) sobre que la estimulación sexual no produjo un efecto sobre la concentración de testosterona en los gatos. En nuestro estudio, los gatos castrados a lo largo del año no mostraron diferencias estacionales en la concentración de testosterona, pero debería considerarse que el diseño experimental no pretendía monitorizar la variación hormonal, ya que sólo se disponía de una única muestra por individuo. El presente estudio apoya la idea de que el gato doméstico mantiene una actividad sexual dentro y fuera de la estación reproductiva, aunque ciertos factores pueden modificar la producción espermática y su calidad. Hallazgos similares se han descrito en otras especies estacionales como el macho cabrío (Arrebola et al, 2010) o el caballo (Janett et al, 2003). En conclusión, la actividad testicular en el gato doméstico localizado en el área mediterránea no mostró un patrón estacional, sugiriendo una actividad espermatogénica constante a lo largo del año. Sin embargo, la calidad espermática, y en particular la motilidad progresiva (considerada como un parámetro funcional), varió de acuerdo con el fotoperíodo. Los valores más altos fueron observados durante la estación reproductiva, lo cual podría considerarse como una sincronización del macho con la receptividad sexual de la hembra. La ausencia de una marcada estacionalidad en esta especie favorece también el mantenimiento de la actividad sexual del macho en cualquier momento. Estos hallazgos podrían ser interesantes a la hora de elegir el mejor momento para la recogida de semen y para obtener los mejores resultados en la congelación-descongelación de esperma, ya que la mejor motilidad espermática aparece durante los días largos.

Ante los mediocres resultados que se observan en la congelación de esperma de gato planteamos el estudio de nuevas técnicas de criopreservación espermática. El incremento de trabajo concernientes a vitrificación espermática, fundamentalmente en humano, perro y peces, nos hizo plantearnos la implementación de dicha técnica en felinos y si podría ser factible desde un punto de vista teórico. Así en el artículo 6 de esta Tesis Doctoral se investigó cómo diferentes concentraciones de sucrosa podían afectar al esperma vitrificado. La clave para evitar la formación de cristales de hielo durante la vitrificación es la rápida velocidad de enfriamiento, lo cual omite la fase de solidificación y transforma los fluidos en un sólido amorfo parecido al cristal (llamado estado vítreo) (Dinnyes et al, 2007). Mientras que este procedimiento ha demostrado buenos resultados en la criopreservación de gametos femeninos y embriones, se han realizado pocos estudios de vitrificación para preservar gametos masculinos. Los mejores resultados descritos en la literatura corresponden a esperma humano (Isachenko et al., 2008; Satirapod et al., 2012), incluso cuando no se le añadieron crioprotectores (Saki et al., 2009), mientras que sólo se han llevado a cabo algunos intentos de vitrificación en animales (revisión de

Cuevas-Urbe 2011). Se ha sugerido que la congelación lenta quizás no sea apropiada para el espermatozoide humano recogido del epidídimo y testículo, ya que tiene una pobre concentración y motilidad *in situ* (Endo et al., 2011), y que quizás la vitrificación pueda mejorar los resultados. Ya que la concentración de espermatozoides epididimarios también es reducida, en el artículo 6 de la presente Tesis se evaluó la vitrificación como técnica de criopreservación espermática. La forma y el tamaño del espermatozoide está relacionado con su capacidad para ser criopreservado, siendo los gametos con mayor tamaño de su cabeza los más sensibles al daño causado por frío (Watson and Plummer, 1985). El caballo, el perro y el gato son los mamíferos domésticos con un menor tamaño en la cabeza de sus espermatozoides (Garner 2006), pero mayores que el espermatozoide humano, y poseen alta estabilidad frente al frío. Recientemente, se ha descrito que la vitrificación es capaz de mantener algunos de las características del espermatozoide canino cuando se utiliza como crioprotector la sucrosa (no permeable), la cuál consigue reducir los daños durante la congelación (Sánchez et al., 2011). Los buenos resultados obtenidos tras la vitrificación de esperma canino, el pequeño tamaño de la cabeza del espermatozoide de gato y el pequeño volumen de esperma recogido en gatos (normalmente desde epidídimo) sugiere que la vitrificación podría ser un procedimiento alternativo a la criopreservación de los espermatozoides felinos. La sucrosa, junto a la albúmina sérica bovina (BSA) fue elegida en este estudio para reducir el choque por enfriamiento en espermatozoides de gato durante la vitrificación. Otros crioprotectores permeables y no permeables (como el etilenglicol, acetamida, dimetil sulfóxido, trealosa, propanodiol, alcohol polivinílico, glicerol, metanol, butanodiol, polietilenglicol, X-1000TM y Z-1000TM) han sido comparados para estandarizar la vitrificación de esperma de peces (Cuevas-Urbe 2011, Cuevas-Urbe et al., 2011). En estudios preliminares, probamos en nuestro laboratorio la combinación de crioprotectores permeables (DMSO y etilenglicol) sobre esperma de gato, pero fueron descartados ya que se obtenían espermatozoides no móviles (resultados no publicados). También se ha sugerido que la composición ultraestructural de las células es otro importante factor relacionado con la supervivencia espermática tras la criopreservación. La alta concentración de azúcares, proteínas y otros componentes dentro de la célula espermática podrían actuar como crioprotectores naturales, ya que hacen muy viscosa y compartimentalizada a la matriz intracelular del espermatozoide (Isachenko et al., 2003). Una revisión reciente (Morris et al., 2012) pone en entredicho la formación de cristales de hielo durante la congelación y sugiere que el desequilibrio osmótico durante la congelación-descongelación es la razón principal del daño al espermatozoide. Estos autores consideran que la vitrificación intracelular se produce siempre durante el proceso de congelación y proponen que la vitrificación podría mejorar la criopreservación debido a que consigue la vitrificación del medio extracelular y minimiza el daño celular durante el calentamiento. Éste es el primer estudio sobre vitrificación llevado a cabo en esperma de gato, en el cuál se han obtenido resultados esperanzadores al observar que la motilidad podía ligeramente mantenerse. Cuando se vitrificó sin crioprotectores, las muestras perdieron toda la motilidad, en contraste con lo descrito por Isachenko et al. (2004b) que conseguían alrededor de un 50% de motilidad en esperma humano. Sin embargo, la sucrosa demostró propiedades

crioprotectoras, aunque en menor medida que lo descrito en perro (Sánchez et al., 2011) y humano (Isachenko et al., 2008). Los mejores porcentajes de motilidad tras la vitrificación en nuestro estudio se obtuvieron con una concentración de sucrosa de 0.4M más BSA 1% (12.9%). Los felinos domésticos y salvajes tienen un esperma con un alto porcentaje de anomalías morfológicas (Axner et al., 1999) y las muestras epididimarias también contienen un alto porcentaje de espermatozoides defectuosos (alrededor del 36-54%) en comparación con las muestras recogidas mediante electroeyaculación (Goodrowe and Hay, 1993; Lengwinat and Blottner, 1994). En nuestro estudio, la media de espermatozoides con morfología normal fue de $76.8 \pm 5.0\%$ en esperma epididimario fresco. Tras la vitrificación, la morfología espermática no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a las muestras frescas o entre diferentes concentraciones de sucrosa, sugiriendo que este método de criopreservación no afecta negativamente a la morfología espermática en el gato. La integridad del acrosoma tiene gran importancia sobre la tasa de fertilidad y los procesos de refrigeración (Pukazhenthil et al., 1999) o de congelación-descongelación (Goodrowe and Hay, 1993) dañan fácilmente al espermatozoide felino. Se ha sugerido que el espermatozoide epididimario tiene una membrana plasmática más delicada y menos resistente al proceso de congelación-descongelación en comparación con los espermatozoides obtenidos mediante electroeyaculación (Zambelli et al., 2010). El daño espermático tras la congelación lenta se asocia a la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), estrés osmótico relacionado con los crioprotectores y enfriamiento, o a la formación de cristales de hielo (Morris et al., 2012). En el presente estudio, el porcentaje de acrosomas intactos tras la vitrificación fue similar a los valores obtenidos en esperma fresco y el medio de vitrificación no afectó a la membrana acrosomal. Los datos aquí aportados están de acuerdo con los estudios llevados a cabo en perro (Sánchez et al., 2011). La especial sensibilidad de la membrana espermática a las temperaturas de refrigeración y descongelación en gato se asocian a una reducción del acrosoma intacto durante el proceso de congelación-descongelación. La ausencia de este rango de temperatura crítica durante la vitrificación podría explicar que la estructura del acrosoma no se viera afectada significativamente en este estudio. En este sentido, se ha afirmado que se produce una reducción en el daño estructural en la membrana y en los orgánulos celulares durante la vitrificación, ya que las células son “congeladas” instantáneamente (Sánchez et al., 2011). En resumen, la vitrificación espermática es un método más barato y rápido comparado con la congelación, y ofrece resultados esperanzadores para la preservación de esperma epididimario de gato. El uso de sucrosa asociada a BSA elimina el proceso de lavado espermático para eliminar los crioprotectores tras la criopreservación. Además, la descongelación es un proceso muy sencillo en el que hay una muy pequeña pérdida de espermatozoides (Hossain and Osuamkpe, 2007). Los mejores resultados de motilidad se alcanzaron usando sucrosa 0.40M y la vitrificación no afectó negativamente ni al acrosoma ni a la morfología del espermatozoide de gato.

Aunque los valores de esperma vitrificado-descongelado en gato son demasiado bajos para su uso práctico en inseminación artificial, esta es una posible alternativa para la criopreservación de espermatozoides destinados a usarse en inyección

intracitoplasmática o producción de embriones *in vitro*. De todas formas, son necesarios más estudios para evaluar otros crioprotectores, diluyentes o procesado en al vitrificación. Este estudio abre una puerta a una nueva técnica de conservación celular, que se muestra más rápida y económica que la congelación convencional.

8. CONCLUSIONES

- Los procedimientos anestésicos utilizados en gatos previos a la castración afectan sobre la motilidad del esperma epididimario, mientras que otras características como la integridad del acrosoma, vitalidad espermática e integridad funcional de la membrana se vieron afectadas en muestras congeladas-descongeladas.
- El mantenimiento de muestras genitales (epidídimos y testículos) durante 12 horas a 4°C no afectó a la calidad espermática cuando dichas muestras eran sometidas a congelación-descongelación, aunque a las 6 horas se apreció una más rápida pérdida de motilidad que en muestras congeladas inmediatamente tras la castración.
- El método de tinción utilizado influye sobre la valoración de la morfología espermática en muestras epididimarias. Sin embargo, no se observaron variaciones en la morfología espermática asociadas a la centrifugación o refrigeración de la muestra.
- Triladyl®, un diluyente comercial diseñado para rumiantes, puede utilizarse con cierta garantía para la criopreservación de esperma epididimario en gato, aunque los diluyentes específicamente diseñados para esta especie ofrecieron mejores resultados. El tipo de monosacárido (fructosa o glucosa) suplementado a dichos diluyentes no modificó la calidad espermática.
- La actividad sexual de gatos machos en el área Mediterránea no mostró un patrón estacional, aunque la motilidad progresiva es mayor durante la época reproductiva, es decir, durante el fotoperíodo ascendente.
- La vitrificación es una nueva alternativa para la criopreservación espermática en gato, demostrándose que el diluyente basado en PBS-BSA 1%-Sacarosa 0.4M ofrece resultados aceptables.

APORTACIONES A LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMA DE GATO DOMÉSTICO: INFLUENCIA DE LAS SOLUCIONES DILUYOCONSERVADORAS

Todos los felinos salvajes del mundo se encuentran en serio peligro de desaparición, por lo que resulta necesario establecer estrategias de conservación , tanto ex-situ como in-situ. Y en este sentido, las técnicas de reproducción asistida son absolutamente indispensables para establecer bancos de embriones, de esperma o de óvulos, así como mejora de los protocolos de inseminación artificial. Estudios en gatos domésticos permiten adquirir el conocimiento básico sobre fisiología reproductiva que en el futuro pueda ayudar a mantener las poblaciones de otros felinos salvajes. En nuestro caso, se llevaron a cabo estudios sobre criopreservación espermática, analizando si algunos diluyentes comerciales pueden utilizarse para preservar esperma felino, se estudió cómo podían afectar las diferentes sustancias anestésicas empleadas en castración sobre la calidad espermática, qué efecto podía ejercer la refrigeración sobre la congelabilidad espermática, y se realizaron las primeras experiencias sobre vitrificación espermática en gato. Además, dado que las hembras presentan una marcada estacionalidad, se estudió el efecto de la estación sobre la calidad seminal y la histología testicular. Esta Tesis Doctoral ofrece resultados interesantes y abre una nueva puerta hacia nuevas estrategias de conservación espermática, que deberán seguir siendo exploradas.

