

CAPÍTULO 17

Criopreservación de espermatozoides felinos

María Candela Bonaura

Introducción

La criopreservación de espermatozoides tanto seminales como epididimales y su posterior utilización, mediante IA (inseminación artificial) u otras biotecnologías de generaciones posteriores como fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permite gracias al uso de material genético, conservar la biodiversidad de las poblaciones y evitar la extinción de algunas especies amenazadas. Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Watson, 1995). Los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales felinos o de eyaculados felinos pueden ser de suma utilidad como modelo experimental para ser utilizado en félidos silvestres en vías de extinción lo que permitirá aumentar sus posibilidades de preservación (Pukazhenthil y col., 2006; Diaz y Ojeda, 2000). Los espermatozoides eyaculados de gato doméstico (Platz y col., 1978) y tigre (Donoghue y col., 1990; Donoghue y col., 1993) han sido eficazmente congelados-descongelados y utilizados mediante IA y fertilización *in vitro* con buenos resultados (Hay y Goodrowe, 1993).

La inseminación artificial (IA) con espermatozoides criopreservados puede ser útil cuando la hembra y el macho se encuentran en lugares distantes o cuando el macho ya no está disponible para el servicio natural. Así mismo esta biotecnología es de gran utilidad en felinos silvestres en vía de extinción (Pushett y col., 2000; Howard, 1999).

Los espermatozoides felinos pueden ser preservados, luego de su recolección, mediante la adición al mismo de un diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación). Luego de la primera comunicación de nacimientos logrados mediante IA con semen felino congelado (Platz y col., 1978), se han realizado variados estudios sobre congelación de semen e IA utilizando semen criopreservado (Platz y col., 1978 Axner y col., 2004; Hermansson y Axner, 2007; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Andersen, 1980; Zambelli y col., 2002). El interés por la IA y la criopreservación de semen en felinos ha ido aumentando y ha impulsado el desarrollo e implementación de estas biotecnologías reproductivas. Sin embargo los estudios realizados en este área son escasos y de limitado desarrollo en comparación con la evolución de la criopreservación de semen e IA en otras especies domésticas.

Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación

Los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular así como pérdida de la motilidad espermática, provocando disminución de la fertilidad al descongelado (Hammerstedt y col., 1990; Watson, 1995). Obtener un alto porcentaje de espermatozoides fértiles luego del proceso de congelación-descongelación traerá como resultado un mayor porcentaje de preñez y camadas más numerosas. Este hecho se encuentra íntimamente relacionado con la conservación de la integridad estructural y fisiológica del espermatozoide al descongelado (Held, 1997).

Algunos cambios ocurridos en las membranas que rodean la cabeza del espermatozoide durante la congelación-descongelación son similares a los producidos durante los procesos de capacitación y reducen la longevidad espermática (Paulens, 1993). Las modificaciones térmicas que se producen durante el proceso de criopreservación provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los espermatozoides (Watson, 1995). Los cambios más evidentes son la pérdida de la motilidad espermática y la pérdida de la integridad acrosómica (Paulens, 1993). Otros factores que modifican la integridad de las membranas (IM) de los espermatozoides son los relacionados con las características físico-químicas de los DIL utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en la célula espermática (Stornelli y col., 2005). Entre los factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, se encuentran también el estrés térmico, relacionado con los cambios de temperatura (shock de

frío), los efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el medio extra e intra celular (Gao y col., 1993; Gao y col., 1995; Watson, 1976; Watson, 1981; Watson y Duncan, 1988).

Estrés térmico: shock de frío

El enfriamiento realizado de manera rápida o lenta induce en ciertas células un estrés letal, relacionado con un cambio de fase lipídica y alteración de la función de la membrana, por lo que debe realizarse con sumo cuidado. (Watson, 1981; Watson y Duncan, 1988).

Si bien los cambios de fase ocurren generalmente entre los 5°C y 15 °C (Dobrins y col., 1993), el estrés puede continuar por debajo de 0°C. Para disminuir el estrés celular por shock de frío pueden incluirse en el diluyente ciertas sustancias como son la yema de huevo, debido a que los fosfolípidos (Quinn y col., 1980) y las lipoproteínas de baja densidad (Foulkes, 1977) ejercen un efecto protector actuando sobre las membranas estabilizándolas (Watson, 1976).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, producen un estrés sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolalidad producida posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken y col., 1983). La incorporación del glicerol en etapas puede reducir el mencionado estrés (Gao y col., 1993). Se han realizado diferentes trabajos con la incorporación de distintos componentes con el fin de reemplazar en su totalidad o en parte el glicerol. Los componentes utilizados han sido disacáridos, amidas o detergentes; sin obtener un crioprotector que pueda reemplazar en su totalidad al glicerol o reducir su proporción hasta el momento en el gato doméstico (Bonaure y col., 2011; Bonaure y col., 2012; Bonaure y col., 2013 a, b, c).

Formación de hielo en el medio extra e intra celular

La formación de cristales de hielo genera un estrés celular relacionado al aumento en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson, 1995). El tiempo de exposición de las células en este medio debería no ser prolongado para lograr una mayor sobrevivencia, por lo que el

proceso de enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, lo cual es letal para la célula (Savignone y col., 2007).

Las diferentes poblaciones espermáticas existentes entre especies y dentro de un mismo eyaculado se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (Hammerstedt y col., 1990).

Protocolos de congelación

Existe una gran variedad de protocolos de congelación los cuales pueden variar entre sí en las tasas de enfriado, congelado-descongelado, en los pasos de dilución realizados, composición del diluyente, momento del empaquetamiento, etc. (Zambelli y col., 2002; Siemieniuch y Dubiel, 2007). Por una cuestión práctica se enumerará a continuación un protocolo de congelación.

Al material seminal (espermatozoides de eyaculado o espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo) a congelar se le realizan pruebas de contrastación microscópicas *in vitro* (como motilidad y vigor, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con integridad de membranas plasmática y acrosomal) para determinar la calidad seminal de la muestra. Para realizar la congelación de los espermatozoides felinos se utiliza un DIL el cual se mezcla con un volumen calculado para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (Luvoni, 2008), los espermatozoides diluidos se envasan (empaquetado) en pajuelas de 0,25 ml y se congelan de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (Andersen, 1980). La descongelación se realiza a 37 °C durante 15 segundos (Chatdarong y col., 2008). Luego de la congelación y descongelación los espermatozoides deben—ser sometidos a las mismas pruebas de contrastación seminal *in vitro* que se realizaron con el semen fresco para determinar la viabilidad espermática al descongelado.

Diluyentes utilizados para la criopreservación espermática en el gato doméstico

Un DIL que permita obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación,

consiguiendo altas tasas de fertilidad *in vivo* precisa contener azúcares como fuente de energía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH, antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación (Concannon y Battista, 1989).

En la última década, se han estudiado diferentes DIL para la criopreservación de semen felino. Los más utilizados son los que contienen Tris Base (TRIS), con el agregado de distintas sustancias como por ejemplo crioprotectores (glicerol, disacáridos), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), detergentes del grupo alquil-iónico que actúan sobre la yema de huevo, (dodecil sulfato de sodio [SDS]) y azúcares energéticos permeables, capaces de atravesar la membrana plasmática (glucosa) (Axner y col., 2004; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Hermansson y Axner, 2007; Chatdarong y col., 2008).

Agregado de disacáridos al DIL

Los azúcares no permeables (trealosa [TREA], lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (Aisen y col., 2002). La TREA es un disacárido que posee además una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001; Bakas y Disalvo, 1991; Chen y col., 2000) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación.

La acción protectora de disacáridos como la trealosa fue observada en especies como el canino y el ovino, sin embargo la acción protectora de este disacárido agregado al diluyente varía según la especie estudiada. En el ovino se logran buenos resultados con el agregado de altas concentraciones de trealosa lo cual causa hipertonía del medio (Crowe y col., 2001; Aisen y col., 2000 ; Molinia y col., 1994). En caninos las concentraciones usadas en ovinos resultan excesivas y producen daños a nivel de la cola espermática afectando la motilidad seminal (Stornelli, 2004). En esta especie, la adición de trealosa en concentraciones que no modifiquen la osmolalidad del diluyente tris base permite ver la acción estabilizadora del disacarido sobre la membrana plasmática. En el gato domestico no se observó efecto protector de la trealosa sobre el semen felino congelado descongelado. Es posible que el semen felino necesite un diluyente con concentraciones de trealosa mayores a las evaluadas sin llegar a concentraciones que produzcan una osmolalidad que afecte la viabilidad

espermática, para que pueda observarse la acción protectora del disacárido (Bonaure y col., 2011; Bonaure y col., 2013).

Agregado de amidas al DIL

Distintos estudios muestran que la adición al DIL de amidas en diferentes concentraciones, en reemplazo de parte del glicerol, permite mejorar parámetros de contrastación seminal *in vitro*, al disminuir los efectos tóxicos del glicerol sobre la célula espermática. Este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (Gomes y col., 2002), no así en caninos (Savignone y col., 2007). Los hallazgos en felinos concuerdan con lo observado en caninos (Dalimata y Graham, 1997; Savignone y col., 2007). Lo observado podría deberse a las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana espermática en las diferentes especies (Lopes y col., 2009). Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (Holt, 2000; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Rota y col., 2006) es posible que los espermatozoides felinos requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de glicerol por amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de DMF al descongelado (Bonaure y col., 2014).

Agregado de detergentes al diluyente

Los detergentes son capaces de solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. Los del grupo alquil-iónico, al cual pertenece el SDS desnaturalizan la estructura nativa de las proteínas de membrana y las disocian en sus cadenas polipeptídicas. Si este detergente se agrega al DIL en pequeñas cantidades, posee un efecto benéfico sobre la motilidad espermática e integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (Pursel y col., 1978), gracias a su acción sobre la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo la cual ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (Watson, 1976). Compuestos que contengan SDS solo o como un componente del Equex STM paste u Orvus han sido incluidos en los DIL usados para la congelación de semen canino y felino (Pursel y col., 1978; Axner y col., 2004). Sin embargo la adición de altos porcentajes de estas sustancias afecta la estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal (Stornelli, 2004). Los resultados observados en felinos permiten arribar a la conclusión de que, un diluyente tris base que posea en su composición el agregado de SDS ejerce un efecto protector mayor que sobre los espermatozoides congelados-descongelados que un DIL tris base sin el agregado de SDS (Bonaure y col., 2012).

Si bien se ha avanzado en el conocimiento y uso de la criopreservación espermática en el gato domestico queda aún un largo camino por recorrer y poder estandarizar los protocolos de criopreservación y permitir el uso corriente de esta biotecnología en felinos.

Bibliografía

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. (2000). "Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents". *Theriogenology*; 53:(1053-61).
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. (2002). "Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration". *Theriogenology*; 57 (1801-8).
- Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. (1983). "The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test". *J Androl.*;6 (180-93).
- Andersen, K. (1980). "Artificial insemination and storage of canine semen". En: Morrow DA (ed). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. (PA. 661-665). W.B. Saunders, Philadelphia.
- Axner F, Hermansson U, Linde Fosberg C. (2004). "The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post thaw survival of cat epididymal spermatozoa". *Anim Reprod Sci.* 84 (179-191).
- Bakas LS, Disalvo EA. (1991). "Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose". *Cryobiology*; 28 (347-53).
- Bonaura M.C; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli CM, Stornelli, M.A. (2012). "Efecto de la adición de Dimetilformamida a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos pos descongelados". *Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires. Resolución (CD) N: 1637/120.
- Bonaura MC, Jurado S, Nuñez Favre R, García Mitacek, Sarmiento P, Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *12th Inter-American Microscopy Congress*. Cartagena de Indias: Colombia.
- Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. (2012). "Efecto de la adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales post descongelación". *XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*.
- Bonaura MC., Nuñez Favre R., Mansilla Hermann D., Tittarelli C., Stornelli MA. (2011). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos". *Jornada de Jóvenes Investigadores*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires.
- Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *Comité*

Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía (ASOCM). Colombia: Cartagena.

- Bonaura, M.C.; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. (2013). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales al descongelado en el Gato doméstico (*Felis catus*)". *XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de Rosario.
- Chatdarong Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axner E. (2008). "Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa". *Anim Reprod Sci*.
- Chen T, Fowler A, Torner M. (2000). "Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture". *Cryobiology*; 40 (277-82).
- Concannon PW, Battista M. 1989). "Canine semen freezing and artificial insemination". In: Kirk RW editor. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal practice*. (p. 1247-59). Philadelphia PA: WB Saunders.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. (1989). "Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules". *Proceedings of the 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents*. California, USA; (p. 219-29).
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. (2001). "The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State". *Cryobiology*; 43 (89-105).
- Dalimata AM, Graham JK. (1997). "Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose". *Theriogenology*; 49 (831-41).
- Diaz GB, Ojeda RA. (2000). *Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina*. (p 106). SAREM. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos).
- Donoghue, A. M.; Johnston, L. A.; Seal, U. S.; Armstrong, D. L.; Tilson, R. L.; Wolf, P.; Petrini, L. G.; Simmons, T.; Groos, T. & Wildt, D. E. (1990). "In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*)". *Biology of Reproduction*, 43, (p. 733-44).
- Donoghue, A. M.; Johnston, L. A.; Armstrong, D. L.; Simmons, L. G. & Wildt, D. E. (1993). "Birth of a siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination". *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24 (p. 185-89).
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. (1993). "Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes a demonstration using sperm as a model". *J Exp Zool* 265 (432-437).
- Foulkes JA. (1977). "The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa". *J. Reprod. Fert.*; 49 (277- 284).

- Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. (1993). "Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis". *Biol. Reprod.*; 49 (112-23).
- Gao GY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, et al. (1995). "Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol". *Hum. Reprod.*; 10 (1109-22).
- Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. (2002). "Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed". *Theriogenology*; 58 (277-9).
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. (1990). "Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive". *J. Androl.*; 11 (73-88).
- Hay MA and Goodrowe KL. (1993). "Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat". *J Reprod Fert, Suppl*; 47 (297-305).
- Held JP. (1997). "Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of the Canine". *Theriogenology*; (p. 49-59).
- Hermansson U, Axnér E. (2007), "Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 degrees C". *Theriogenology*; 67 (1239-48).
- Holt WV. (2000). "Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences". *Theriogenology*; 53 (47-58).
- Howard JG. (1999). "Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores". In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and wild animal medicine IV*. (p. 449-57). Philadelphia, PA: WB Saunders Co.
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. (2009). "Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen". *Theriogenology*; 72 (650-654).
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. (2009). "Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen". *Theriogenology*; 72 (650-654).
- Luvoni CG. (2008). "Gamete cryopreservation in the domestic cat". *Theriogenology*; 66 (101-111).
- Molinia FC, Evans G, Caseres PI, Maxwell WMC. (1994). "Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris base diluents on motility, acrosome integrity, and fertility of pellets frozen ram spermatozoa". *Anim. Reprod. Sci.*; 36 (113-22).
- Paulens H. (1993). "The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock". *Norw. J. Vet. Med.*; 105 (1135-42).
- Peña A, Linde-Forsberg C. (2000). "Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa". *Theriogenology*; 54 (859-875).
- Platz CC, Wildt DE, Seager SW. (1978). "Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa". *J Reprod Fertil*; 52 (279-82).

- Pukazhenthi B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelikaan K, et al. (2004) "Challenges in cryopreservation of Clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa". *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*; (P.134-135).
- Pursel VG, Shulman LL, Jonshon LA. (1978). "Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed board sperm". *J. Anim. Sci.*; 47 (198-202).
- Pushett DA, Lacham-Kapln O, Gunn IM, Trounson AO. (2000). "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro-matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species". *Theriogenology*; 53 (400).
- Quinn PJ, Chow PJW, White IG. (1980). "Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site". *J. Reprod. Fert.*; 60 (403-407).
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. (2006). "Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation". *Theriogenology*; 65 (848–1858).
- Savignone CA, Gimenez F, Nuñez Favre, R, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. (2007). "Comparison of different concentrations of dimethyl formamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa". *17th Brazilian Congress of Animal Reproduction Curitiba. Anales del congreso* (pp175).
- Siemieniuch M, Dubiel A. (2007). "Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable Temperatures". *Anim Reprod Sci.*; 99 (135-44).
- Stornelli MA. (2004). "Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado". [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. (2005). "Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal". *Analecta veterinaria*. 25 (28-35).
- Watson PF, Duncan G. (1988). "Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". *Cryobiology*; 25 (131-42).
- Watson PF. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *Reprod. Fertil. Dev.*; 7 (781-91).
- Watson PF. (1981). "The effects of cold shock on sperm cell membrane". (p.189-417). In: Morris GJ, Clarke A, editores. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Orlando. Fla.: Academic Press.
- Watson PF. (1976). "The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing". *J. Thermal Biol.*; 1 (137-41).
- Zambelli D, Canepprle B, Castagnetti C, Belluzzi S. (2002). "Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates". *Reprod Domest Anim.*, 37 (310-313).