

LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN DE SEMEN CANINO

S Jurado¹, P Sarmiento², A Stornelli³

¹Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ²Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido. Facultad Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. ³Instituto de Teriogenología y Laboratorio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: *La evaluación de semen canino puede brindar información importante relacionada con la capacidad fecundante del semen fresco o congelado. El estudio de la morfología espermática en el microscopio óptico provee información limitada sobre la estructura del espermatozoide. Sin embargo, el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión pueden revelar más detalles de la estructura espermática. Es así que muchos espermatozoides considerados morfológicamente normales al microscopio óptico pueden presentar diferentes defectos al ser observados con un microscopio electrónico. El objetivo de este estudio fue describir defectos espermáticos observados en el semen canino fresco y los daños presentes en el semen canino luego del proceso de congelación. Se colectó la fracción espermática del semen de 8 caninos Ovejero Alemán. La misma fue diluida hasta una concentración espermática final de 100×10^6 /ml y envasada en pajuelas de 0,5 ml y congelada sobre vapores de nitrógeno líquido. Una alícuota de cada fracción espermática fue preparada inmediatamente después de la colección y la otra luego de la descongelación. Las mismas fueron observadas con microscopio electrónico de barrido y microscopio electrónico de transmisión. Se describieron las anomalías observadas en el semen fresco y los daños espermáticos ocurridos en el semen congelado.*

Palabras clave: semen- canino- ultraestructura- microscopía electrónica.

ELECTRON MICROSCOPY AS A TOOL FOR CANINE SEMEN EVALUATION

Abstract. *Canine semen evaluation can give important information related to the fresh or frozen-thawed semen fertilizing ability. However routine test can not predict accurately semen fertilizing ability. Assessment of sperm morphology at the light microscopy level can provide only limited information on the structure of the spermatozoa. Transmission electron microscope and scanning electron microscope can reveal more details of sperm structure. Many spermatozoa considered morphologically normal at light microscopic level could have many defects when observed with an electron microscope. The aims this study was described morphological defects in canine fresh semen and damage observed in frozen-thawed semen. The sperm fraction was collected from 8 dogs, each was diluted in a two step dilution to a final sperm concentration of 100×10^6 /ml and were packed in 0.5 ml straws. The straws were frozen in a Styrofoam box 4 cm above liquid nitrogen. One sample was prepared immediately after collection and the other samples were taken after freezing-thawing. Samples were observed with a transmission electron microscope and scanning electron microscope. Morphological defects and sperm damage were described in fresh and frozen-thawed semen.*

Key words: semen- canine- ultrastructure- electron microscopy

Fecha de recepción: 20/06/07

Fecha de aprobación: 03/11/07

Dirección para correspondencia: Susana Jurado, Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900ABW) La Plata Telefax: 54-221-4211276 **E-mail:** sjurado@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La evaluación seminal rutinaria es un estudio que brinda información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides presentes en el eyaculado y es imprescindible para determinar tanto la producción espermática como la funcionalidad de las glándulas sexuales accesorias (1). Este método también permite evaluar la calidad de semen criopreservado al descongelado (2).

Los indicadores utilizados en el análisis del eyaculado son: volumen, color, aspecto, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y tipo de morfoanomalía. Además, se evalúan las características fisicoquímicas del semen (pH, osmolalidad y viscosidad), la bioquímica seminal (fructuosa, ácido cítrico, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina), se realizan estudios inmunológicos (3) y microbiológicos (4, 5). También se investiga la presencia de células no espermáticas en el eyaculado (6).

A pesar de su utilidad, la evaluación de semen mediante pruebas de contrastación rutinarias no ofrece una información completa de la capacidad fecundante de un eyaculado o del semen criopreservado (7). Es necesario realizar otras pruebas (prueba de sobrevida espermática, capacitación espermática espontánea e inducida, pruebas de estrés oxidativo, prueba hiposmótica, etc.) que contribuyan a evaluar la capacidad fecundante del semen (8). De esta manera se puede obtener información adicional al espermograma básico y estimar con más certeza la capacidad fecundante del eyaculado, gracias a la combinación de las diferentes pruebas (9). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente cual será la capacidad fecundante del eyaculado en el momento que éste sea depositado en el aparato genital femenino.

La motilidad y el número de los espermatozoides son dos de los tres pilares que sostienen la estructura diagnóstica del análisis del eyaculado. La morfología constituye el tercer pilar. La evaluación morfológica de semen comprende la diferenciación cuali y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales, y la distinción de otras células no espermáticas. Entre éstas se incluyen las células epiteliales procedentes del tracto reproductivo, células de la línea seminal y leucocitos (colectivamente denominadas "células redondas") (6).

A pesar de su importancia, el rol de la morfología espermática en el estudio de la fertilidad del semen ha sido muy controversial. Sin embargo para la mayoría de los investigadores no hay dudas de su importancia en el diagnóstico

de la fertilidad en los animales y en el hombre (10, 11, 12). Es así que la morfología según criterio estricto (13) es un excelente indicador de funcionalidad/disfuncionalidad espermática global o parcial (14). Sin bien el impacto de las morfoanomalías sobre la fertilidad ha sido bien estudiado en bovinos, está poco estudiado en los animales de compañía.

Aunque la morfología espermática puede evaluarse con un microscopio de contraste de fase en las especies de producción, el principal método para diferenciar entre células normales y anormales en caninos y felinos es el uso de extendidos de semen teñido con coloraciones especiales como Spermac® (2, 15). El estudio morfológico permite detectar anomalías de la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas. No obstante, este método está basado en criterios subjetivos, los cuales producen una gran variabilidad dentro y entre los laboratorios (16). El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad y morfología espermática (17). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una calibración exacta (18).

La evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy valiosa porque provee información detallada a cerca de la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Esta información posibilita estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud que otras pruebas de análisis de semen *in vitro*. Los detalles ultraestructurales de cualquier alteración morfológica del semen o el grado de daño de membrana son mejor evaluados usando este tipo de microscopios de alta resolución (19, 20).

El microscopio electrónico de barrido permite examinar el espermatozoide completo a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que el microscopio óptico. Además, el secado por punto crítico empleado en este tipo de microscopía evita las deformaciones de las células espermáticas apreciándose mejor las estructuras superficiales (21, 22). Por otro lado, el microscopio electrónico de transmisión es una herramienta utilizada, principalmente, con finalidad diagnóstica ya que permite realizar la evaluación de las estructuras intracelulares e identificar numerosos defectos estructurales, tanto de la cabeza como de la cola, que interfieren en el proceso de la fecundación. Por lo tanto, la implementación de estudios ultraestructurales podría ser de gran utilidad en la clínica andrológica, sin embargo, no son aprovechados en su totalidad. Así mismo la ultramicroscopía podría ser sumamente beneficiosa en el área de la investigación.

Preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido un punto crítico desde el momento en que se implementaron las técnicas de criopreservación de semen para la realización de inseminación artificial (23). Para establecer el grado de injuria asociado al proceso de congelado y descongelado del semen es necesario realizar una serie de estudios, de los cuales el examen morfológico estructural y ultraestructural es de vital importancia (24, 25).

El uso de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión es sumamente útil en el diagnóstico de una alteración patológica del flagelo espermático conocida como disquinesia ciliar primaria o síndrome de Kartagener. Este síndrome está caracterizado por la disfunción parcial o total del flagelo por ausencia de uno o los dos brazos de dineína de los microtúbulos que constituyen el axonema, y se asocia a sinusitis, bronquiectasia y a esterilidad masculina (26). La falla en la concepción se debe a una astenozoospermia total, asociada a la disquinesia ciliar primaria, alteración observable únicamente mediante microscopía electrónica (27).

La evaluación morfológica de semen fresco mediante microscopía electrónica contribuye a valorar la funcionalidad testicular en relación al desarrollo seminal y el proceso de maduración epididimal. Se deben analizar los espermatozoides normales, los espermatozoides con anomalías primarias y los espermatozoides con anomalías secundarias. Las anomalías primarias incluyen defectos de formación del espermatozoide en el testículo, como por ejemplo, macrocefalia, microcefalia, bicefalia, acrosomas anormales o inexistentes, ausencia de porción intermedia, cola enroscada, o biflagelados; mientras que las anomalías secundarias incluyen defectos espermáticos relacionados con el manejo de la muestra o con la maduración espermática, tales como porciones intermedias dobladas, colas dobladas, o presencia de gotas citoplasmática distal (6). Por otra parte, la evaluación ultramicroscópica del semen criopreservado permite determinar el grado y localización de injuria celular causado por la criopreservación (28).

El objetivo de este trabajo fue utilizar la microscopía electrónica de transmisión y de barrido como parte de la evaluación morfológica del semen fresco y congelado-descongelado en caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE SEMEN

Se utilizaron 8 caninos, ovejero alemán, de entre 2 y 5 años, en actividad sexual y con buena calidad seminal. Los animales fueron alojados en caniles con un régimen de luz natural y alimentados con alimento balanceado de calidad

Premium. Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: 1) Concentración espermática total: $\geq 200 \times 10^6$, 2) Motilidad progresiva individual: $\geq 70 \%$, 3) Porcentaje de espermatozoides vivos: $\geq 80 \%$, 4) Porcentaje de malformaciones espermáticas primarias y secundarias: $<20 \%$, 5) Fosfatasa alcalina: ≥ 4000 U/L (6, 29, 30, 31, 32).

Se recolectó semen una vez por semana durante tres semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en dos alícuotas, una de ellas fue procesada inmediatamente luego de la recolección para microscopía electrónica de barrido y transmisión. La otra alícuota de semen fue diluida con Tris base yema de huevo con el agregado de 5% de glicerol alcanzando una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. El semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,5 ml, congelado sobre vapores de nitrógeno líquido y almacenado hasta su evaluación (33).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Semen fresco:

La fracción espermática se diluyó en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) y se fijó con glutaraldehído al 1 % durante 2 horas. La dilución se filtró a través de un filtro Millipore (5μ de diámetro) y los filtros se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (10 % a 100 %). Posteriormente, los espermatozoides depositados sobre los filtros fueron transferidos a acetato de amilo y sometidos al secado por punto crítico (Balzer CP 30) y finalmente se metalizaron con oro-paladio (Jeol Fine Coat 1100). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6360 LV.

Semen criopreservado

Las pajuelas de semen criopreservado fueron descongeladas a 37°C durante 1 minuto (34) y posteriormente procesadas como se describió en semen fresco.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Semen fresco:

El semen fresco se fijó en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 horas a 4°C . La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora a 4°C y posteriormente, el semen se deshidrató en una serie creciente de alcoholes y se incluyó en resina Epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados y fotografiados en

un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II

Semen criopreservado

Las pajuelas de semen criopreservado fueron descongeladas a 37 °C durante 1 minuto (34) y posteriormente procesadas como se describió en semen fresco.

CRITERIOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE SEMEN

En cada una de las muestras analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido se estudiaron 100 espermatozoides. En las muestras de semen fresco se clasificaron los espermatozoides en células normales y células con morfoanomalías, clasificándolas según el tipo de anomalía. En las muestras de semen congelado-descongelado se clasificaron los espermatozoides en células normales y células dañadas, clasificándolas según el tipo y localización del daño observado.

RESULTADOS

Se observó que los espermatozoides caninos poseen los mismos componentes que otros espermatozoides eucariotas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En el semen fresco la mayoría de los espermatozoides mostraron una cabeza oval normal con una membrana homogénea e intacta. También el cuello y las diferentes partes de la cola fueron morfológicamente normales. Se observaron algunas alteraciones tales como gota citoplasmática distal (Figura 1) y cola enrollada. En las muestras congeladas-descongeladas, los espermatozoides mostraron daño acrosomal, cuellos rotos y colas desprendidas (Figura 2). También se observaron muchos espermatozoides con acrosomas intactos pero con colas rotas. Por otro lado, si bien se vieron muchas células intactas algunos espermatozoides exhibieron daño acrosomal y colas intactas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

En el semen fresco los espermatozoides normales estuvieron compuestos por una cabeza y una cola. En la cabeza se observaron tres áreas claramente distintivas: 1) el acrosoma, cubriendo a modo de capucha más de la mitad del núcleo, 2) la región ecuatorial justo detrás del acrosoma y 3) la región pos-ecuatorial. En la cola se distinguieron las tres porciones: la pieza intermedia, la pieza principal y pieza terminal. La pieza intermedia estuvo conectada con la región pos-ecuatorial

de la cabeza por el cuello. Las mitocondrias, estuvieron contenidas en la pieza intermedia ordenadas en forma helicoidal en torno al axonema. Además, en la pieza principal se observó la vaina de refuerzo y en la pieza terminal se detectó la porción final del axonema. El axonema se observó a lo largo de todo el flagelo y estuvo formado por 9 pares de microtúbulos organizados en forma radial alrededor de 2 filamentos centrales.

En el semen fresco se identificaron espermatozoides con defectos acrosomales (lipping), macrocefalia y defecto de Dag (Figura 3). La pieza media mostró alteraciones tales como la pérdida del axonema y presencia de gotas citoplasmáticas. Las típicas desviaciones de la cola fueron fracturas o enrollamiento, combinación de una sección proximal y distal de la cola rodeada por una membrana común, colas dobles o triples. En algunos espermatozoides con flagelos morfológicamente normales observados en el microscopio óptico, fue posible identificar mediante el MET deficiencia, ausencia o alteraciones en los brazos de dineína, alteraciones en los microtúbulos, transposición de dobletes periféricos a posición central, presencia de dobletes o microtúbulos supernumerarios y ausencia de dobletes o microtúbulos.

En las muestras de semen sujetas a la congelación/descongelación algunos espermatozoides exhibieron pérdida o daño de la membrana plasmática sobre la región de la cabeza. En cortes sagitales a través de la cabeza, se observó que el plasmolema estaba desprendido en la región del acrosoma. En la mayoría de los casos la membrana plasmática permaneció intacta (Figura 4). La formación de grandes espacios entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa fue una alteración típica en los espermatozoides congelados/descongelados. Raramente se observaron quistes y desintegración del plasmolema sobre el acrosoma. También se observó la presencia de espacios entre la membrana acrosomal interna y el núcleo. Las alteraciones más comunes vistas en espermatozoides caninos congelados/descongelados fueron debidas al proceso de reacción acrosómica falsa. Como consecuencia de la reacción acrosómica falsa se observaron espermatozoides con vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, tumefacción del acrosoma con formación de espacios irregulares entre la membrana acrosomal interna y externa y entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. A nivel del flagelo, la membrana plasmática también sufrió alteraciones. En general, la membrana plasmática de la pieza media permaneció más intacta que la pieza principal y terminal después de la congelación-descongelación.

Cuando se compararon los porcentajes de células dañadas en el semen fresco versus

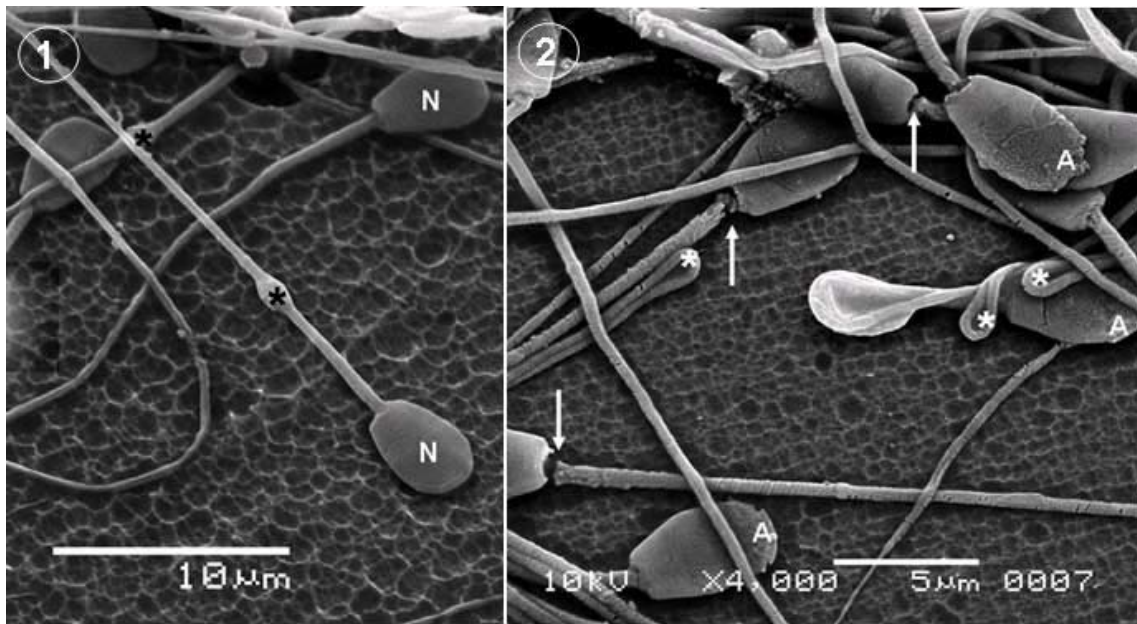


Figura 1- Semen fresco (MEB). Células espermáticas de perro. Se observan gotas citoplasmáticas (asteriscos). N: núcleo (Barra: 10 μm). **Figura 2- Semen congelado-descongelado (MEB).** Se observan colas desprendidas (flechas) y colas plegadas (asteriscos). Además se distingue daño acrosómico (A). (X 4000).

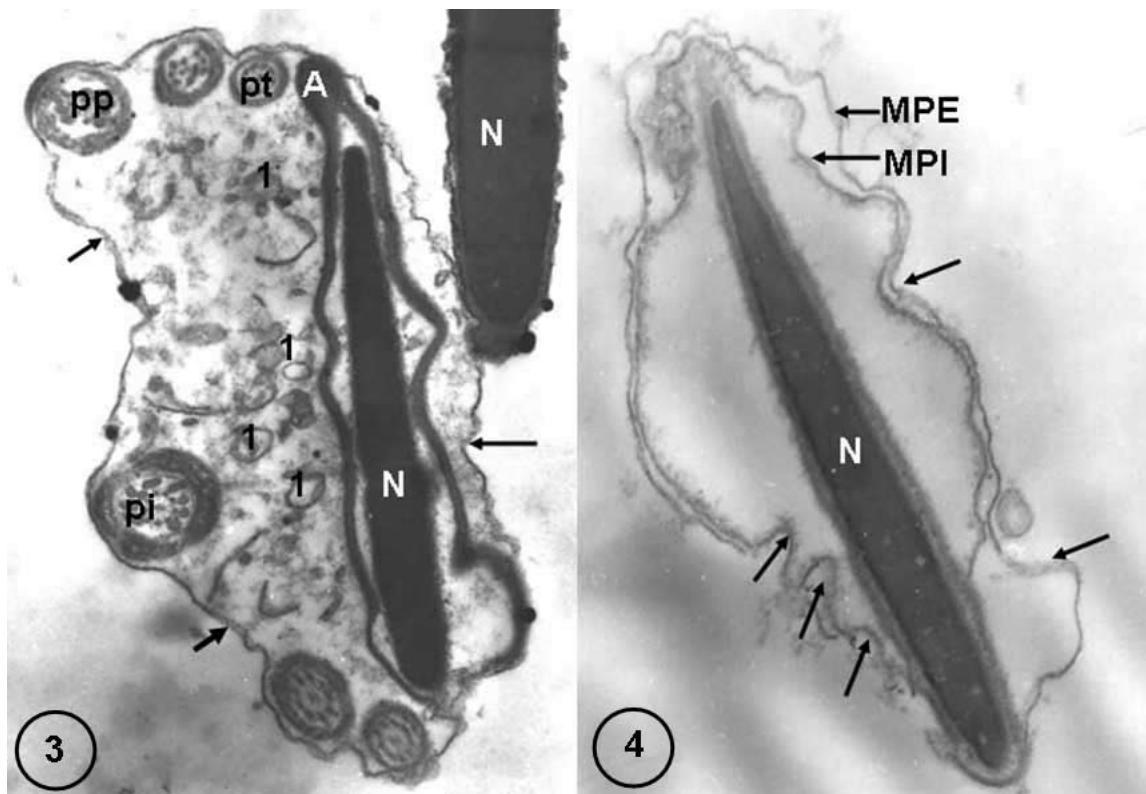


Figura 3 – Semen fresco (MET). Defecto de Dag: caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta (flechas). Se observa el acrosoma (A) desprendido y material membranoso (1) en el citoplasma. Se distinguen cortes transversales de la pieza intermedia (pi), pieza principal (pp) y pieza terminal (pt) con diferente grado de distorsión de la arquitectura normal del axonema. N: núcleo. (X 30000). **Figura 4- Semen congelado-descongelado (MET).** Espermatozoide con membrana plasmática intacta pero muy hinchada y con presencia de pliegues (flechas). MPE: membrana plasmática externa, MPI: membrana plasmática interna, N: núcleo (X 40000)

el porcentaje de espermatozoides dañados en el semen descongelado se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), siendo mayor el porcentaje de células intactas en el semen fresco.

DISCUSIÓN

La ultramicroscopía ha permitido identificar diversas morfoanomalías espermáticas en semen canino. En nuestro estudio, las anomalías espermáticas observadas en el semen fresco mediante MET y MEB concuerdan con los hallazgos comunicados por Holt (32).

Las pruebas rutinarias de contrastación *in vitro*, si bien pueden estimar si los espermatozoides cuentan con diferentes atributos necesarios para llevar a cabo la fecundación, no pueden predecir exactamente la capacidad fecundante de los mismos *in vivo*. Sin embargo, la información obtenida en cada una de esas pruebas y la asociación de los resultados mejora el valor predictivo de la fertilidad potencial de un semen determinado (8, 35, 36). Es así que los datos obtenidos mediante microscopía electrónica podrían, no solo contribuir a establecer una mejor estimación de la capacidad fecundante del semen fresco y/o criopreservado analizado, sino también determinar el tipo y localización del daño ocurrido durante los procesos de criopreservación.

La morfología del flagelo espermático es un parámetro muy importante para diagnosticar trastornos de fertilidad. Los estudios ultraestructurales de las colas de espermatozoides de pacientes con disquinesia ciliar, revelaron que los flagelos poseen una desorganización completa de los microtúbulos con patrón no reconocible. También fue posible observar la ausencia total del axonema mediante microscopía electrónica de transmisión (37). En nuestro estudio, en el semen fresco de los perros analizados fue posible observar la ausencia total del axonema en algunos espermatozoides. Los perros estudiados eran fértiles y producían camadas normales en viabilidad y número de cachorros, probablemente relacionado con el escaso número de espermatozoides que presentaron la alteración descrita en el axonema.

Los espermatozoides están sometidos a diferentes tipos de estrés, durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, pudiendo producir alteraciones celulares observables sobre la ultraestructura del espermatozoide. Los efectos deletéreos pueden observarse en forma inmediata al matar al espermatozoide o incapacitarlo para la fecundación por daño del acrosoma o de la membrana plasmática. Así mismo los procesos de congelación y descongelación podrían reducir la longevidad de la célula espermática por alteración de la estructura de la membrana plasmática (38), lo cual explicaría por qué la tasa de concepción obtenida con la

inseminación intrauterina es mejor que la obtenida por inseminación intravaginal al usar semen congelado/descongelado (39). Las alteraciones observadas en los espermatozoides congelados-descongelados, en nuestro trabajo, se corresponden con los comunicados previamente por otros autores (20; 39). Así mismo las diferencias observadas entre el porcentaje de espermatozoides dañados en el semen descongelado en comparación con el fresco se relacionarían con los diferentes tipos de estrés sufrido por las células durante la congelación/descongelación en concordancia con lo comunicado por Watson (40).

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solamente ayuda a preservar la integridad celular, sino que también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación. En el caso del semen criopreservado, se considera que la membrana plasmática es el sitio en el cual se inicia la injuria inducida por la congelación (41). Nuestras observaciones nos permitieron confirmar que los procesos de congelación/descongelación producen alteraciones importantes en la membrana plasmática y acrosómica así como en la distribución del contenido acrosomal. Los efectos deletéreos observados en las membranas de las cabezas de los espermatozoides posteriores a la dilución, congelación y descongelación podrían explicar por qué, generalmente, la fertilidad del semen congelado/descongelado es más baja que la del semen fresco (42).

Los daños que observamos mediante el MET en el semen congelado/descongelado se corresponden con los comunicados por Ström Host y col (43) quienes describieron que el principal tipo de daño que afecta al acrosoma durante la congelación/descongelación fue la alteración acrosómica, identificada mediante microscopía de luz como una distribución irregular del contenido acrosómico e hinchamiento. En nuestro estudio observamos alteraciones ultraestructurales en el semen criopreservado, tales como vesiculación de la membrana acrosomal externa, hinchamiento y pérdida de la homogeneidad y densidad del contenido acrosómico. La detección de estos cambios en el semen criopreservado no afectaría necesariamente la capacidad del espermatozoide para fecundar un oocito, pero podrían acortar la sobrevivencia de la célula espermática. En coincidencia con otros investigadores (20, 44) nuestros hallazgos de alteración morfológica en las membranas espermáticas indicarían que la criopreservación de semen induce la reacción acrosómica en una parte de la población de espermatozoides del semen criopreservado, acortando la sobrevivencia espermática y/o disminuyendo la capacidad fecundante tal como fue sugerido por Jones y Steward (45).

Barthelemy y col (46) establecieron que el efecto más llamativo durante la criopreservación de semen fue una declinación en el porcentaje de espermatozoides intactos a nivel del acrosoma. En nuestro estudio pudimos observar un porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto significativamente superior en el semen fresco. El MET permitió detectar daños acrosómicos de diferente tipo y magnitud.

Concluimos que la microscopía electrónica es un método que permite evaluar las características morfológicas ultraestructurales de semen fresco y semen congelado/descongelado de perro y que puede aplicarse en otras especies animales y el hombre. La evaluación morfológica de semen es un importante componente de la valoración de la calidad seminal del macho canino porque la integridad espermática se correlaciona con la capacidad fecundante del eyaculado. Por otra parte la identificación precisa de los defectos espermáticos y su correlación con la fertilidad tiene implicancias directas en los programas reproductivos en animales de pedegree.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo se contó con la colaboración del Ht. Silvio Igal del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

BIBLIOGRAFÍA

1. Padrón Durán RS, Fernández López GM, Gallardo Ríos M. Interpretación del análisis seminal. *Rev Cubana Endocrinol* 1998; 9 (1): 81-90
2. Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación, criopreservación de semen e inseminación artificial en el gato doméstico. *Asociación Argentina de Medicina Felina, Anuario* 2002; p: 87-90
3. ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis. Ed. Oxford University Press, 2002; p. 1-24
4. Levy R, Grattard F, Maubon I, Ros A, Pozzetto B. Bacterial risk and sperm cryopreservation. *Andrologia*, 2004; 36 (5): 282-285
5. Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2004; 83 (7): 656-660
6. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1991; 21 (3): 545-551
7. Dunphy BC, M Neal L, Cooke ID. The clinical value of conventional semen analysis. *Fertil Steril*, 1989; 51 (2): 324-329
8. Montes JM, Cantú L, Cánepa ME, Alciaturi J, Machado MJ, Brüné MN. ¿Es posible obtener del estudio de semen mejores predictores de fertilidad?. *Reproducción Humana*, 2004; 4: 15-24
9. Ludwig G, Frick J. *Spermatology: Atlas and Manual*.

Ed: Springer-Verlag, 1989; p: 3-41

10. Schirren C, Eckhardt U, Jachczik R, Carstensen CA. Morphological differentiation of human spermatozoa with Testsimplets slides. *Andrologia*, 1977; 9 (2): 191-192
11. Swerdloff RS, Overstreet JW, Sokol RZ, Rajfer J. UCLA conference. Infertility in the male. *Ann Intern Med*, 1985; 103: 906-919
12. Pinatel MC. Semen evaluation: technique of study. *Ann Biol Clin*, 1985; 43(1): 49-53
13. Kruger TF, Acosta AA, Simmon KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1988; 49 (1): 112-117
14. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF. The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 1992; 7 (2): 242-7
15. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, de la Sota RL. Inseminación con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*, 2001, 21 (1): 58-66
16. Zaini A, Jennings MG, Baker HW. Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men?. *Int J Androl*, 1985; 8 (6): 427-435
17. Irvine S. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod*, 1995; 10 (Suppl 1): 53-59
18. Vestergren J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 2002; 57: 149-179
19. Oettlé EE, Soley JT. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study. *Vet Med Rev*, 1988; 59: 28-70
20. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1993; Suppl 47: 279-285
21. Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. *Fertil Steril*, 1982; 38 (2): 227-232
22. Sterzik K, De Santo M, Uhlich S, Gagsteiger F, Strehler E. Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. *Hum Reprod*, 1998; 13 (9): 2506-2511
23. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temp. *Nature* 164, 1949: p: 666
24. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 1990; 11: 73-88
25. Parks J, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 1992; 38: 209-222
26. Ceccaldi PF, Carre-Pigeon F, Youinou Y, Delepine

S. Jurado y col.

- B, Bryckaert PE, Harika G, Quereux C, Gaillard D. Kartagener's syndrome and infertility: observation, diagnosis and treatment. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2004; 33 (3): 192-194
27. Afzelius BA, Eliasson R, Johnse O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Bio*, 1975; 66 (2): 225-232
28. Peña Martinez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 2004; 82-83: 209-224
29. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil*, 1972; 29 (3): 443-445
30. Pursel VG, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1974; 1(2): 63-68
31. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993; 47: 325-327
32. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J Exp Zool*, 1998; 246 (3): 305-314
33. Stornelli MA, Savignone C, Stornelli MC, Tittarelli CM, Jurado SB, Giménez F, de la Sota RL. Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste. *Theriogenology*, 2006; 66: 664-665
34. Morton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 1989; 39: 311-316
35. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 1991; 164 (2): 542-551
36. Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*, 1999;1 (3): 18-31
37. Lungarella G, Fonzi L, Burrini AG. Ultrastructural abnormalities in respiratory cilia and sperm tails in a patient with Kartagener's syndrome. *Ultrastruct Pathol*, 1982; 3 (4): 319-323
38. Burgess CM, Bredt JC, Plummer JM, England GC. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cyopreservation. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001; 57: 357-363
39. Ström Host B, Rota A, Andersen-Berg K, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing. Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim*, 1998; 33: 77-82
40. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 2000; 60-61: 481-492
41. Morris G J. Effects of low temperature on biological membranes. Ed: Academic press (London), 1981; p: 241-262
42. Mahadevan MM, Trouson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertile Steril*, 1984; 41 (2): 287-293
43. Ström Host B, Rota A, Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 1997; 48: 247-256
44. Alvarenga MA, Landim Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, 2000; 32 (6): 541-545
45. Jones RC, Stewart DL. The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Repro Fertil*, 1979; 56 (1): 233-238
46. Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl*, 1984; 25 (1): 29-40