

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA
DEL SEMEN FELINO**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: MV. María Florencia Garcia

Director: MV, Dra. Cs Vet, María Alejandra Stornelli.

Codirector: MV, Dra. Cs Vet, Romina Nuñez Favre

Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Nacional de La Plata

Miembros del Jurado: MV, Dra. Cs Vet, Denise López, Universidad Estatal
Paulista, San Pablo, Brasil

MV, Dr. Cs Vet, Enrique Cabodevila, Facultad de
Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del
Centro de la Provincia de Buenos Aires.

MV, Dr. Cs Vet, Pedro Zeinsteger, Facultad de
Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La
Plata

La Plata, Buenos Aires, 23 marzo 2022

A mi esposo Mati y mi pequeño Bauti por su paciencia y apoyo incondicional que me brindaron día a día. Fueron mi sostén y motivación en cada momento.

A mis papas, Laura y Eduardo, y hermano Martin, quienes me acompañaron desde que comencé a transitar este hermoso camino y me inculcaron los valores mas importantes en mi vida.

Y especialmente a mis dos angeles de la guarda, la abu Coca y la tía Ñata, quienes me acompañaron y estuvieron a mi lado siempre, brindandome sus sabios consejos, cuidados y su amor eterno.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle muy especialmente a mi directora de tesis, la Dra. María Alejandra Stornelli por haber confiado en mi en todo momento. Por haberme guiado en base a su experiencia, sabiduría y recibirme en su gran equipo de trabajo. Su constante apoyo, indicaciones y sugerencias fueron indispensables en el desarrollo de la tesis. Le agradezco no solo en lo profesional sino también en lo personal, por sus consejos, charlas y ser tan comprensiva, generosa y madre.

A mi codirectora, la Dra. Romina Nuñez Favre, con quien compartí todos estos años desde el primer día que entré a la cátedra, y me aguantó siempre a su lado. Me enseñó y guió desde el inicio de mi investigación, quiero agradecerle por sus correcciones, detalles, por ayudarme a tomar cada muestra y alentarme, por ser tan paciente y ser un sostén muy importante. Gracias por ser mi guía profesional y cuidarme como una hermana mayor.

Al Dr. Luzbel de la Sota por sus aportes en cada trabajo realizado, por su amabilidad y respeto.

A las “pequeñólogas”, la Dra María Carla García Mitacek, quien me escuchó, aconsejó, y ayudó en el análisis estadístico, además de compartir experiencias de madre; la MV Florencia Coralli, por su buena onda y predisposición, con quien compartí muchas anécdotas y me acompañó estos años de pandemia; la Dra. Romina Praderio por todos los momentos lindos que compartimos en tantos años; la Dra María Cecilia Stornelli, por ser mi primer guía, por enseñarme y aconsejarme en cada paso. También quiero agradecerles a los MV. Micaela Tebes, Jagger Segura y Fernando Carrasco Sangache por brindarme una mano cuando lo necesitaba y cuidar con afecto a la colonia felina.

A todos y a cada uno de los integrantes de la Cátedra. En especial a M.V Lorena Migliorisi por compartir el lugar de trabajo, por luchar incansablemente para instalarme programas en la computadora y darme una mano en todo momento.

Al Dr. Ramiro Rearte por su compromiso y ayuda en el análisis estadístico.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología, y al Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por facilitarme sus equipos, sin los cuales no hubiera podido desarrollar completamente mis experimentos. En especial al Dr Gastón More por enseñarme y ayudarme con la interpretación de las corridas electroforéticas.

A la Dra. Susana Jurado y a Roxana Peralta por su colaboración en el procesado de las muestras de Microscopía Electrónica.

Al CONICET por haberme becado para poder dedicarme a realizar la tesis.

A los jurados por sus correcciones y sus valiosos aportes que me han dado la oportunidad de mejorar este trabajo.

A mis amigas y hermanas de la vida por estar siempre en las buenas y en las malas, por su infinita paciencia, son un regalo de la vida.

A mis suegros y familia política, que me han apoyado en cada momento y quererme como una hija mas, agradezco de tenerlos en mi vida.

A mi mamá Laura, papá Eduardo, a mi hermano Martin y mi cuñada Anto que fueron mi guía y camino para poder llegar a este punto de mi carrera, me apoyaron en cada decisión, depositando su confianza y amor.

A mi esposo Mati, mi compañero de aventuras, por su apoyo incondicional y por darme fuerzas con sus palabras de aliento y su forma romántica de expresarme su amor infinito; y a mi bebe Bauti, el pequeño terremoto que es el motor que me

ilumina día a día con sus travesuras. A mi fiel compañera Syrah que con sus miradas y saltos me expresa su inmenso amor.

Por último, quisiera agradecer a mis heroínas de cabello blanco, mi abuela y tía abuela, que con sus experiencias de vida y su sabiduría me apoyaron y ayudaron en todo momento y siguen alumbrando mi destino y guiando mis pasos desde el cielo. Son mis ejemplos a seguir.

Muchas Gracias....

ÍNDICE

	PÁGINA
LISTA DE PUBLICACIONES.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE TABLAS.....	XVIII
RESUMEN.....	XX
SUMMARY.....	XXII

CAPÍTULOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COLESTEROL, TRIACILGLICÉRIDOS Y PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL CON LA CALIDAD DE SEMEN Y LA ULTRAESTRUCTURA ESPERMÁTICA	
Introducción.....	18
Objetivos.....	23
Hipótesis.....	23
Materiales y Métodos.....	24
Diseño experimental.....	24
Animales.....	24
Toma de muestra y evaluación de semen.....	24
Examen ultramicroscópico.....	29
Evaluación bioquímica.....	30

	Análisis estadístico.....	31
	Marco bioético del uso de animales.....	32
	Resultados.....	32
	Discusión y conclusiones.....	48
III.	EVALUACIÓN PROTEICA DEL PLASMA SEMINAL MEDIANTE ELECTROFORESIS	
	Introducción.....	53
	Objetivos.....	58
	Hipótesis.....	58
	Materiales y Métodos.....	59
	Diseño experimental.....	59
	Animales.....	59
	Recolección y evaluación de semen.....	59
	Determinación del peso molecular de las proteínas del plasma seminal mediante electroforesis.....	59
	Análisis estadístico.....	63
	Marco bioético del uso de animales.....	63
	Resultados.....	63
	Discusión y conclusiones.....	66

IV. EFECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA DEL SEMEN CONGELADO

Introducción.....	70
Objetivos.....	75
Hipótesis.....	75
Materiales y Métodos.....	76
Diseño experimental.....	76
Animales.....	76
Recolección y evaluación de semen.....	76
Criopreservación seminal.....	76
Análisis estadístico.....	80
Marco bioético del uso de animales.....	81
Resultados.....	81
Discusión y conclusiones.....	84

V. EFECTO DEL PLASMA SEMINAL DEL GATO Y EL FACTOR INDUCTOR DE OVULACION PURIFICADO DE LLAMAS (β -NGF) SOBRE LA FUNCIÓN OVARICA EN GATAS DOMÉSTICAS

Introducción.....	90
Objetivos.....	92
Hipótesis.....	92
Materiales y Métodos.....	93
Diseño experimental.....	93

Animales.....	94
Citología vaginal.....	95
Análisis hormonal.....	96
Toma de muestra de semen de gato.....	97
Toma de muestra y evaluación de semen de llama	
Purificación del factor inductor de la ovulación.....	97
Análisis estadístico.....	99
Marco bioético del uso de animales.....	99
Resultados.....	99
Discusión y conclusion.....	102
CONCLUSIONES GENERALES.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110
BIOGRAFÍA	132
ANEXO 1: Técnica de electroforesis y soluciones utilizadas.....	134

LISTA DE PUBLICACIONES

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIODICAS CON REFERATO

1. Relationship between semen quality and seminal plasma cholesterol, triglycerides and proteins in the domestic cat. Journal of Feline Medicine and Surgery. Maria Florencia Garcia; Romina Nuñez Favre; Maria Cecilia Stornelli; Ramiro Rearte; Maria Carla Garcia Mitacek; Rodolfo de la Sota; María Alejandra Stornelli. Noviembre 2019. Online ISSN: 1532-2750. Impresa ISLSN: 1098-612X. 1-8. doi: 10.1177/1098612X19889072.
2. Effect of cat seminal plasma and purified llama ovulation-inducing factor (β-NGF) on ovarian function in queens. R. Nuñez Favre¹; M.F. García¹; M.H. Ratto, R. Rearte; M.C. Stornelli; R.L. de la Sota; M.A. Stornelli. Theriogenology. Abril 2021

TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS

1. Relación entre parámetros seminales y concentración de colesterol y triglicéridos en plasma seminal felino. García M. F, Nuñez Favre R, Stornelli M.C, García Mitacek M.C, Praderio R.G, Stornelli M.A.. XV Congreso y 12 Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. 29 y 30 de agosto de 2013. Libro de resúmenes pp. 44.
2. Influencia de parámetros bioquímicos del plasma seminal sobre la calidad de semen en felinos. García M F; Stornelli M C; Nuñez Favre R; Rojas Zamora C;

- Stornelli M A. II Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Santiago, Chile. 13 y 14 de noviembre de 2014. Libro de resúmenes, pp.235.
3. Teratospermia en Felinos: Estudios Microscópicos y Ultramicroscópicos. García MF, Nuñez Favre R, Jurado S, García Mitacek MC, Stornelli MA. XIV Congreso CIASEM. Sociedad Cubana de Microscopia y el Comité Organizador del CIASEM. Varadero, Cuba. 25 al 29 de septiembre de 2017.
 4. Seminal plasma protein, cholesterol and tryglicerides concentration and sperm quality in tomcat. MF. García, R Nuñez Favre, RG. Praderio MC. García Mitacek, MA. Stornelli. 21st EVSSAR Congress (European Veterinary Society for small animal reproduction). Venecia (Italia). 22 y 23 de junio de 2018.
 5. Perfil proteico del plasma seminal de gato doméstico (*Felis silvestris catus*). García, María Florencia; Nuñez Favre, Romina; Stornelli, María Cecilia; Praderio, Romina, Stornelli MA. XIX Jornadas de divulgación técnico-científicas, VI Jornada Latinoamericana, IV Jornadas de Ciencia y Tecnología, III Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias, FCV–UNR. 16 y 17 de agosto de 2018.
 6. Calidad de semen y su relación con la composición del plasma seminal. García, María Florencia; Nuñez Favre, Romina; Stornelli, María Alejandra. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideano (AUGM). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza (Argentina). 17, 18 y 19 de octubre de 2018. Calidad de Joven Investigador. Carga horaria de 30 horas.
 7. Ensayo de palatabilidad a dos comederos en gatos (*Felis silvestris catus*) bajo condiciones experimentales. García, María Florencia; Coralli, Florencia Lilian;

Núñez Favre, Romina; Praderio, Romina; Stornelli, María Cecilia. XX Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas, VII Jornada Latinoamericana, V Jornadas de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, IV Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias, FCV–UNR. Casilda, 11 y 12 de diciembre de 2019.

8. Implicancia de la morfología espermática en la evaluación seminal del gato doméstico (*felis silvestris catus*). García MF, Núñez Favre R, García Mitacek MC, Stornelli MC, Stornelli MA. VI Jornadas internacionales. Instituto de Investigación y tecnología en reproducción animal (INITRA) FCV.UBA. 25 al 27 de agosto de 2021.Modalidad Virtual
9. Efecto de las características bioquímicas del plasma seminal sobre la supervivencia espermática del semen congelado. García MF, Praderio R, Coralli FL, Stornelli MA. IX Jornada de difusión de la investigación y extensión. FCV.UNL. 11 de noviembre de 2021. Modalidad virtual.

CAPITULOS DE LIBRO

1. “Fisiología del servicio canino”. Stornelli, MA Y García MF (2016). En de la Sota, RL. y Stornelli, MA. (eds.) *Manual de Reproducción de Animales de Producción y Compañía* (pp. 77-82). Libros de Cátedra UNLP-EDULP. ISBN: 9789503413814.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	acrosomas intactos
APS	persulfato amónico
BCS	buena calidad seminal
BSP	bind sperm protein (proteína espermática aglutinante)
β -NGF	factor de crecimiento neuronal β
C	colesterol
Ca	cabeza
Ca^{2+}	calcio
CE	concentración espermática
CL	cuerpo lúteo
Co	cola
DIC	carboxifluoresceína
DIL	diluyentes
DMSO	dimetilsulfoxido
DHA	ácido docosahexaenoico
eCG	gonadotrofina coriónica equina
E ₂	estradiol
ET	número total de espermatozoides
HCl	ácido clorhídrico
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HDL	lipoproteínas de alta densidad
IA	inseminación artificial
IC	índice de congelabilidad
IM	integridad de membrana

KDa	kilodaltons
LH	hormona luteinizante
MCS	mala calidad seminal
ME	morfología espermática
MEB	microscopio electrónico de barrido
MeCS	calidad seminal media
MET	microscopio electrónico de transmisión
MI	motilidad individual
MO	microscopio óptico
OIF	factor inductor de ovulación
PI	pieza intermedia
PL	fosfolípidos
PROT	proteínas
PS	plasma seminal
P ₄	progesterona
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
PV	porcentaje de espermatozoides vivos
PVDF	membrana de fluoruro de polivinilideno
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS- PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
TAG	triacilglicéridos
TEMED	tetrametiletildiamina
V	voltios
VA	vagina artificial
VI	vigor

VOL	volumen
YP	yoduro de propideo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
2.1. Electroeyaculación en felinos.....	28
2.2. Pruebas de contrastación del material seminal in vitro.....	28
2.3. Procesamiento de la muestra. Obtención de cortes ultrafinos con el Ultramicrotomo y observación al microscopio electrónico de transmisión.....	30
2.4. Espectrofotómetro (Metrolab 1600).....	31
2.5. Variaciones en la concentración de colesterol, triacilglicéridos y proteínas totales en el plasma seminal correspondiente a eyaculados de buena calidad seminal, calidad seminal media y mala calidad seminal.....	35
2.6. Relación entre la cantidad de colesterol y triacilglicéridos del plasma seminal por millón de espermatozoides en los grupos de buena, media y mala calidad de semen.....	37
2.7. Anormalidades espermáticas al MET.....	46
3.1. Preparación de los geles para la electroforesis.....	60
3.2. Siembra de las muestras para electroforesis.....	61
3.3. Preparación de la Transferencia a membranas.....	62
3.4. Transferencia a membranas.....	62
3.5. Membrana de PVDF teñida con tinta china y siembra en diferentes calles del plasma seminal de mala y buena calidad de semen.....	64
3.6. Membrana de PVDF teñida con tinta china y siembra en diferentes calles del plasma seminal de mala y buena calidad de semen.....	65
4.1. Dilución del semen para congelar.....	78

4.2.	Descenso de temperatura.....	78
4.3.	Envasado y congelación de pajuelas.....	79
4.4.	Almacenamiento del semen.....	79
4.5.	Descongelado de pajuelas.....	80
5.1.	Imágenes microscópicas de frotis vaginales de gatas teñidas con azul de metileno.....	96
5.2.	Diferencias de la actividad del cuerpo lúteo activo entre distintos tratamientos.....	101

LISTA DE TABLAS

FIGURA	PAGINA
2.1. Parámetros seminales de los grupos de buena calidad seminal, calidad seminal media y mala calidad seminal.....	34
2.2. Correlaciones simples entre la evaluación bioquímica del plasma seminal y los parámetros seminales	36
2.3. Relación entre el número total de espermatozoides y la cantidad de colesterol y triglicéridos del plasma seminal en los grupos de buena calidad de semen y mala calidad de semen.....	37
2.4. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas observada al Microscopio Óptico en los grupos BCS, MeCS y MCS.....	39
2.5. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas observada al Microscopio Óptico.....	40
2.6. Anormalidades espermáticas observadas al microscopio óptico de los grupos de buena calidad seminal y mala calidad seminal.....	41
2.7. Porcentaje de morfologías espermáticas observada al Microscopio Electrónico de Transmisión.....	43
2.8. Anormalidades espermáticas observadas al microscopio electrónico de transmisión de los grupos de buena calidad seminal y mala calidad seminal.....	44
2.9. Porcentaje de anormalidades espermáticas encontradas al microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión según su localización en ambos grupos BCS y MCS.....	45
4.1. Parámetros seminales de los eyaculados frescos y descongelados.....	82

4.2. Correlaciones simples entre la evaluación bioquímica del plasma seminal y los índices de congelabilidad de los parámetros seminales.....	83
4.3. Índices de congelabilidad de los parámetros seminales entre los eyaculados teratospérmicos y normospérmicos.....	84
5.1. Duración del estro y concentración sérica de estradiol 48 horas después de la detección del estro por citología vaginal (día 0 de tratamiento).....	101
5.2. Duración del interestro anovulatorio y concentración sérica de progesterona en el día 1 entre los tratamientos.....	102

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL SEMEN FELINO

En el gato doméstico, no se han realizado estudios que relacionen las características bioquímicas del plasma seminal con las características morfológicas del semen felino ni con su capacidad para soportar el proceso congelación-descongelación. El objetivo del trabajo de tesis fue estudiar características morfológicas y bioquímicas del semen felino y su influencia sobre la criopreservación seminal. En el primer experimento se evaluó la relación del contenido de colesterol, triacilglicéridos y proteínas del plasma seminal con la calidad de semen y la ultraestructura espermática. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos del plasma seminal fueron más altas en las muestras provenientes de eyaculados de buena calidad seminal (BCS) comparado con los de mala calidad seminal (MCS), mientras que la concentración de proteínas totales no mostro diferencias entre los grupos. El estudio ultramicroscópico evidenció que los eyaculados de BCS presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides normales comparados con los de MCS; observándose en este último grupo, una mayor cantidad de anomalías de cabeza y pieza intermedia. En el segundo experimento se estudió la relación entre el peso molecular de las proteínas del plasma seminal y la calidad de semen, identificándose mediante electroforesis cinco bandas proteicas en todas las muestras, sin embargo, el plasma seminal de BCS presentó una banda extra de 14.4 kDa. En el tercer experimento se evaluaron las características bioquímicas del plasma seminal sobre la supervivencia espermática del semen congelado, observándose que los eyaculados de BCS con mayor concentración de colesterol y triacilgliceroles, tuvieron mejor índice de congelabilidad que los de MCS. Podemos concluir que en los felinos domésticos las características bioquímicas del plasma seminal tienen influencia sobre la calidad del semen, la cantidad

de espermatozoides sin alteraciones ultramicroscópicas y, la supervivencia espermática al congelado. Además, el peso molecular de las proteínas del plasma seminal está relacionado con la calidad seminal.

PALABRAS CLAVE: gato, plasma seminal, ultraestructura espermática, semen congelado.

SUMMARY

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF FELINE SEMEN

In domestic cats, no studies have been carried out about the effect of the biochemical composition of seminal plasma either with the morphological characteristics of feline semen or with its ability to withstand the freeze-thaw process. This study aimed to assess the morphological and biochemical characteristics of feline semen and its influence on seminal cryopreservation. In the first experiment, we studied seminal plasma protein, cholesterol, and triacylglycerol concentrations and their relationship with semen quality and sperm ultrastructure in tom cats. Seminal plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations were significantly higher in ejaculates with good semen quality than poor semen quality. However, there were no significant differences in seminal plasma protein concentration. The ultramicroscopic study showed that ejaculates with good semen quality had a higher percentage of normal sperm than ejaculates with poor semen quality. The last group showed higher head and intermediate piece abnormalities than the good semen quality group. The second experiment studied the relationship between the molecular weight of seminal plasma proteins and semen quality. Seminal plasma protein electrophoresis clearly showed five protein bands in all samples, and only the seminal plasma of the ejaculates with good semen quality presented a different band of 14.4 kDa. In the third experiment, we study the biochemical characteristics of the seminal plasma on the sperm survival of the frozen semen. The ejaculates with good semen quality and higher concentration of cholesterol and triacylglycerols had a better rate of freezability than those of poor semen quality.

In conclusion, our results demonstrate that in tom cats, the biochemical characteristics of seminal plasma influence semen quality, the number of spermatozoa

without ultramicroscopic alterations, and frozen sperm survival. In addition, the molecular weight of seminal plasma proteins is related to semen quality.

KEYWORDS: Tom cat, seminal plasma, sperm ultrastructure, frozen semen.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Se ha documentado la gran variabilidad de los eyaculados felinos, en relación con variados factores como estacionalidad reproductiva, fotorefractariedad, diferencias individuales y métodos de recolección del material seminal (Concannon y Lein, 1983; Johnstone, 1984; Dooley y Pineda, 1986; Axner y col., 1998, 1999; Axner y Linde-Forsberg, 1998; Stornelli y col. 2004a; Tittarelli y col., 2004; Tittarelli y col., 2006; Zambelli y Cunto, 2006; Reyna y col., 2006; Blottner y Jewgenow, 2007; Axner y Linde-Forsberg, 2007; Stornelli, 2007; Stornelli y col., 2009; Zambelli y col., 2010; Nuñez Favre y col., 2012a; b; 2015; Furthner y col. 2018).

Los felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) que habitan zonas templadas presentan estacionalidad reproductiva de fotoperiodo largo. Es así como, reproductivamente, las hembras fueron clasificadas como fotoperiódicas positivas, presentando ciclos estrales durante los días que poseen mayor cantidad de horas luz. Los machos, si bien presentan espermatogénesis continua, acompañan la estacionalidad reproductiva de la hembra con una mejora de la calidad seminal durante los días que poseen mayor cantidad de horas de luz (Blottner y Jewgenow, 2007; Stornelli y col., 2009; Nuñez Favre y col., 2012a).

Las variaciones estacionales en la calidad del semen, así como la gran variabilidad en las muestras seminales de los gatos domésticos, han sido documentadas en los últimos años (Johnstone, 1984; Stornelli y col. 2004a; Tittarelli y col., 2004; Reyna y col., 2006; Blottner y Jewgenow, 2007; Axner y Linde-Forsberg, 2007; Stornelli y col., 2009; Nuñez Favre y col., 2012a; 2015). Hace más de 30 años, Johnstone observó un mayor volumen

seminal en eyaculados obtenidos durante la época reproductiva de la hembra comparado con los obtenidos en contra estación (Johnstone, 1984). Más recientemente se ha comunicado que la cantidad y calidad de espermatozoides epididimales fue significativamente mayor en muestras provenientes de gatos castrados en días de mayor cantidad de horas luz (Stornelli y col., 2004a; Tittarelli y col., 2004). También se encontró una mayor concentración de espermatozoides testiculares en muestras provenientes de animales orquiectomizados en primavera en comparación con invierno (Reyna y col., 2006). En 2007, Blottner y Jewgenow comunicaron que los gatos domésticos producen semen durante todo el año, evidenciando un aumento en la producción de testosterona, en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides por testículo en muestras de gatos orquiectomizados durante la primavera comparado con los orquiectomizados en otoño-invierno. Asimismo, también se evidenció un mayor porcentaje de espermatozoides normales en eyaculados obtenidos en estaciones con mayor cantidad de horas luz comparados con aquellos obtenidos en estaciones de menor cantidad de horas luz (Axner y Linde Forsberg, 2007). Más tarde, un estudio demostró variaciones estacionales en el desarrollo de la hilera seminal en gatos adultos castrados durante diferentes épocas del año, encontrándose un mayor desarrollo de la hilera seminal durante los meses con mayor cantidad de horas luz (Stornelli y col., 2009). Esta producción espermática estacional también fue observada en muestras de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo, evidenciándose una mayor motilidad y cantidad de espermatozoides morfológicamente normales en muestras de gatos orquiectomizados en épocas del año con ascenso lumínico (Nuñez Favre y col., 2012a). En 2015, se observó mediante la recuperación espermática epididimal de animales castrados durante la temporada reproductiva, un porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales significativamente superior a los gatos castrados en contra estación (~46 vs. 36 %). El

análisis de las anomalías espermáticas reveló que esa diferencia se debió a una mayor cantidad de alteraciones localizadas en la cabeza, ya que no se observaron diferencias en las alteraciones presentes en la pieza intermedia ni en la cola (Nuñez Favre y col. 2015). Es así como las variaciones en el fotoperiodo determinan la estación reproductiva en los gatos domésticos que habitan zonas templadas. Sin embargo, la exposición prolongada a un fotoperiodo de días largos para estimular la producción espermática puede llevar a una drástica reducción de la calidad seminal por insensibilidad al estímulo lumínico constante. Este fenómeno denominado fotorrefractoriedad, puede ser revertido por un ciclo de fotoperiodo de días cortos. Es así que para mantener una buena calidad de semen durante todo el año es necesario realizar ciclos lumínicos alternos (Nuñez Favre y col. 2012b). Además de la variabilidad relacionada con la estacionalidad, en los gatos domésticos existe una alta variabilidad individual en las muestras seminales, por estos motivos aún no se han definido los parámetros seminales normales en el gato doméstico (Pineda y col., 1984; Zambelli y Cunto, 2006). Este hecho adquiere gran importancia al estimar los parámetros seminales normales para cada animal en particular, por lo que se sugieren al menos cinco evaluaciones repetidas en el tiempo para evaluar la capacidad reproductiva de un macho felino (Johnstone, 1984).

La extracción y posterior evaluación seminal resultan esenciales para evaluar la fertilidad del gato y estimar la capacidad fecundante del semen, así como también diagnosticar enfermedades reproductivas (Stornelli, 2007). En los felinos domésticos las técnicas descritas para la obtención de semen son mediante vagina artificial, electroeyaculación, cateterización uretral y recuperación espermática epididimal, siendo la electroeyaculación el método de elección desde la década del '70 (Sojka y col., 1970; Seager, 1976; Platz y col., 1978; Pineda y Dooley, 1984; Hay y Goodrowe, 1993; Axner y Linde-Forsberg, 1998; Stornelli MC y Stornelli MA, 2002 a; Zambelli y Cunto, 2006;

Tittarelli y col., 2006; Stornelli, 2007; Zambelli y col., 2010; Filliers y col., 2010). Para la obtención de semen mediante vagina artificial (VA) es necesario contar con una hembra en celo o un súcubo (por ejemplo, un muñeco de peluche). El macho necesita tomar a la hembra o súcubo por la parte dorsal del cuello para estabilizarla, posicionarla y de esta manera realizar el salto como ocurre fisiológicamente en el servicio natural. Como VA y tubo colector, suele utilizarse un pequeño tubo plástico tipo Eppendorf, en el cual se introduce el pene del macho cuando éste realiza la intromisión, para colectar el eyaculado (Zambelli y Cunto, 2006). La colecta de semen con VA requiere no solo de un entrenamiento previo del macho, sino también de la destreza del operador. El operador debe estar familiarizado con la fisiología del servicio felino y estar muy atento y colocar la VA en el momento justo en el que el animal realiza la estocada, debido a que la eyaculación en el macho ocurre muy rápido y fácilmente puede perderse la muestra. Sin embargo, a pesar del entrenamiento del gato y de la destreza del operador, algunos machos no aceptan la VA y son pocos los animales adultos que responden positivamente a este método de extracción de semen (Axnér y Linde-Fosberg, 1998). Si se realiza una adecuada sociabilización del gato y se lo entrena desde la pubertad puede aumentarse el número de animales que logran eyacular manualmente después de determinado tiempo (Stornelli MC y Stornelli MA, 2002a). Recientemente se ha documentado el tiempo de entrenamiento para lograr eyaculaciones completas y repetitivas mediante la utilización de VA en presencia de una gata en celo. Los autores realizaron el estudio en gatos de 5 a 11 meses de edad, realizando un entrenamiento rutinario de veinte minutos, tres veces por semana. Fueron necesarias entre 6 y 22 semanas para obtener eyaculados completos y repetitivos (Valiente y col., 2014). Estas razones limitan la utilización de la VA en la colección seminal para la evaluación de semen de un reproductor felino. Por lo anteriormente mencionado, la técnica de electroeyaculación es la de elección para la

extracción seminal y es la utilizada rutinariamente en esta especie por su practicidad, ya que no necesita contar con una hembra en celo ni entrenamiento previo del animal. Sin embargo, es necesario contar con un electroeyaculador, compuesto por un vástago con electrodos que transmiten el estímulo, y una fuente de poder (Concannon y Lein, 1983; Axnér y Linde-Fosberg, 1998; Stornelli, 2007). Mediante este método se obtiene un eyaculado de mayor volumen y menor concentración que la vagina artificial (Dooley y Pineda, 1986), puede realizarse en cualquier animal que posea la vía neurológica intacta y requiere un riesgo anestésico mínimo. Esta técnica permite tomar muestras seminales en felinos agresivos, tímidos o aquellos que presenten problemas que les impida realizar la monta como suele ocurrir con las afecciones bucales. Se ha demostrado en muestreos sucesivos que, ni las anestесias, ni la estimulación eléctrica repetida, causan efectos nocivos en los gatos (Pineda y col., 1984; Pineda y Dooley, 1984). Recientemente se ha demostrado que tampoco produce lesiones histológicas en la mucosa rectal presentándose como un método seguro para la toma de muestras seminales (Furthner y col. 2018). La técnica de recuperación espermática a partir de la cola del epidídimo permite recuperar espermatozoides maduros, motiles y fértiles en buena cantidad, pero tiene la desventaja de que solo puede realizarse una única vez. Es una técnica sencilla, de bajo costo y eficaz en la preservación de material genético de animales domésticos de gran valor que deben ser orquiectomizados por razones médicas o sufren muerte súbita (Axnér y col., 1998, 1999; Tittarelli y col., 2006). Es una técnica muy utilizada en especies silvestres a partir de animales que mueren por accidente, pudiendo así recuperarse material genético de ese espécimen. Una vez recuperados, los espermatozoides son evaluados y pueden ser criopreservados de la misma forma que una muestra de semen (Axnér y Linde-Fosberg, 1998; Axner y col, 1999; Axner, 2000). La toma de muestra seminal mediante cateterización uretral es la más recientemente descrita. Si bien posee la ventaja de no

necesitar equipamiento especial, el animal requiere estar anestesiado y aun no se ha demostrado que no produzca lesiones en la mucosa uretral. Para realizar esta técnica se introduce una sonda urinaria tipo Tomcat[®] en la uretra del gato, y con una serie de movimientos anterógrados y retrógrados se obtiene el eyaculado dentro de la misma. Este método permite obtener una alta concentración espermática, en un volumen muy bajo de semen (entre 5-20 μ l; Zambelli y col., 2010).

Inmediatamente después de obtenida la muestra de semen, por cualquiera de los métodos de recolección mencionados anteriormente, se realiza la evaluación de la misma. La evaluación seminal consta de pasos estandarizados que permiten la evaluación exhaustiva del semen, y de esta manera poder conocer la calidad del eyaculado. Se divide en un examen físico-químico que incluye la determinación de la concentración de partículas osmóticamente activas (osmolalidad), la determinación del pH y fosfatasa alcalina; un examen macroscópico donde se evalúa el volumen, el color y el aspecto del eyaculado y uno microscópico donde se evalúa la motilidad individual, el vigor, el número total de espermatozoides, la vitalidad, el porcentaje de acrosomas intactos, el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana y la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales. El estudio morfológico del semen es de suma importancia en la evaluación de la calidad del eyaculado felino, debido a que éste presenta una gran proporción de anormalidades, mayor que cualquier otra especie doméstica. Las anormalidades detectadas en el estudio morfológico pueden ser clasificadas según su origen en: primarias (producto de alteraciones durante la espermatogénesis), secundarias (aquellas ocurridas durante la maduración epididimal). Las morfoanomalías espermáticas también se clasifican según la ubicación de las anormalidades en anormalidades de la cabeza, de la pieza intermedia y de la cola. En relación con el alto porcentaje de anormalidades espermáticas presentes en el semen de

gatos sanos y fértiles, el gato doméstico ha sido clasificado como teratospérmico. Algunos autores han encontrado que los gatos domésticos teratospérmicos producen eyaculados con menos del 40% de espermatozoides morfológicamente normales (Howard y col. 1990; Long y col 1996; Neubauer y col, 2004; Pukazhenthí y col. 2001; 2006a; Axné y Linde Forsberg, 2007; Jewgenow y col. 2009; Erofeeva y col. 2018; Prochowska y col., 2019; Rowlison y col. 2020; Huffmeyer y col. 2021). Por otra parte, Howard y col., (1990) han demostrado que felinos con menos del 40% de espermatozoides normales, tienen bajas tasas de penetración en la zona pelúcida.

La mayoría de los estudios sobre morfología espermática en el gato han sido realizados con microscopía óptica. La utilización de microscopía electrónica permite una visión más detallada de la célula pudiendo evidenciar alteraciones ultraestructurales. Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión se pueden observar cortes ultrafinos (60-90 nm) de la célula espermática, lo que permite evaluar las estructuras intracelulares que la componen y los cambios ultraestructurales que se puedan producir en ella (Pedersen y Fawcett, 1976; Zamboni, 1987; Zamboni, 1991; Dadoune, 1988). De esta forma, con el uso del MET (microscopio electrónico de transmisión) es posible detectar alteraciones en la morfología celular imperceptibles al microscopio óptico (MO; Rodríguez Martínez, 1993). Con el uso de la microscopía electrónica podemos obtener información detallada sobre la integridad del espermatozoide pudiendo ser una herramienta sumamente importante en la detección de alteraciones estructurales que interfieren en el proceso de fecundación (Jurado y col., 2008). En el gato, se han llevado a cabo pocos estudios ultramicroscópicos mediante microscopía electrónica de transmisión, siendo los mismos descriptivos del tipo de anomalía encontrada. Algunas de las anomalías descritas en espermatozoides recuperados de la cola epididimal de gatos adultos sanos, fueron alteraciones acrosomales, defecto de “Dag”, colas dobles,

cabezas dobles, axonemas incompletos (Bonauro y col., 2013, 2014). Villaverde y col. (2013b) describieron la ocurrencia de un alto porcentaje de defectos de “Dag” en espermatozoides obtenidos mediante vagina artificial, y a partir de recuperados de la cola del epidídimo y testículo de un gato teratospérmico.

Estudios previos demostraron que los espermatozoides de gatos teratospérmicos poseen una mayor cantidad de alteraciones acrosomales detectables solo a nivel ultraestructural y que estas alteraciones comprometerían la fertilidad (Long y col., 1996). Si bien la evaluación de semen ofrece un material sumamente valioso que nos permite conocer la calidad del eyaculado de un reproductor, en los últimos años se ha propuesto que el plasma seminal puede aportar información relevante para estimar la capacidad fecundante del mismo.

El plasma seminal (PS) es el producto de secreción de las glándulas sexuales accesorias, glándulas bulbouretrales y próstata en el caso de los felinos domésticos, se secreta durante la eyaculación y brinda soporte a los espermatozoides eyaculados. Algunos autores describieron al PS como una compleja mezcla de secreciones con funciones de transporte y protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra (Töpfer-Petersen y col., 2005; Troedsson y col., 2005). Johnston y col. (2001), describieron que el PS felino está compuesto por varias proteínas incluyendo varias enzimas (fosfatasa alcalina, alanino-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa), lípidos (colesterol y triglicéridos), macroelementos (Na, K, Ca, Mg, P, Cl) y microelementos (Cu, Fe, ZN) que podrían ser beneficiosas en ciertas funciones espermáticas.

El PS participa en la maduración final del espermatozoide a través de cambios enzimáticos y modificaciones en la superficie de la membrana, sirviendo también como vehículo para los espermatozoides. El rol del PS en la funcionalidad espermática, así

como su importancia en la fertilidad han llevado a considerar la evaluación de parámetros bioquímicos como parte de las pruebas que permitan mejorar la aproximación sobre la estimación de la calidad seminal y poder fecundante del semen en animales y hombres (Beer-Ljubic y col. 2009; Chia y col., 2000; Meseguer y col, 2004). Se ha comunicado que la estructura del espermatozoide y su capacidad fecundante dependen de la composición lipídica de la membrana del espermatozoide y del plasma seminal. La fertilización del ovocito está precedida por el proceso de capacitación, en el cual ocurren modificaciones en la composición lipídica de la membrana del espermatozoide (Manjunath y col., 2006; Witte y Schäfer, 2007; Stival y col., 2016). Estos cambios implican la pérdida del colesterol de la membrana del espermatozoide y su unión a proteínas del plasma seminal y órganos del tracto reproductor femenino (Witte y Schäfer, 2007). La relación entre la cantidad de colesterol (C) y fosfolípidos (PL) de la membrana espermática determina su viscosidad, así como su permeabilidad selectiva. De esta manera, con la salida de colesterol se produce una alteración en la estructura y fluidez de la membrana, las cadenas fosfolipídicas se relajan y permiten un gran ingreso de calcio lo que culmina con la capacitación espermática (Witte y Schäfer-Somi, 2007; Stival y col., 2016). Si bien el colesterol es el principal esteroide formando parte de las membranas de los espermatozoides eyaculados, en las membranas espermáticas también se encuentran presentes su precursor (desmoterol), sus ésteres y sulfatos (Cross, 1998; Leahy y Gadella, 2015). Es así como se ha propuesto una asociación entre el metabolismo del colesterol y la fertilidad.

En un estudio realizado por Garolla y col. (2018), se observó una gran diferencia en el contenido de colesterol y sus derivados oxidados (7 β -hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol) en las membranas espermáticas al comparar hombres fértiles e infértiles. Estos autores sugieren un vínculo bioquímico estricto que relaciona la función testicular, el

estado de la membrana espermática y el potencial de fertilidad masculina. Además, otro estudio reciente informó que la cantidad total de colesterol en el plasma seminal de los hombres se asoció positivamente con la calidad del semen (de Neergaard y col., 2018). Del mismo modo, se ha registrado una asociación entre la composición de ácidos grasos del plasma seminal, la calidad del semen y la fertilidad o infertilidad en sementales y toros (Brinsko y col., 2007; Beer-Ljubic y col., 2009). El rol del colesterol en el funcionamiento del espermatozoide fue demostrado en numerosos estudios, así el colesterol ha sido agregado a los diluyentes de semen para reducir los daños durante los procesos de congelación y descongelación, y mejorar el potencial fertilizante (Longobardi y col., 2017). Estos antecedentes sugieren que el contenido de colesterol del plasma seminal podría estar relacionado con la calidad del semen en el gato doméstico. Si bien en felinos no se han realizado estudios que determinen las características lipídicas del plasma seminal, estudios en otras especies demuestran su importancia en la determinación de la capacidad reproductiva.

El plasma seminal también contiene triacilglicéridos, que son esenciales en el metabolismo de los espermatozoides, ya que su oxidación suministra a los espermatozoides los requerimientos de energía que las células necesitan (Lahnsteiner y col., 1993; Beer-Ljubic y col., 2009.). En bovinos, una alta concentración de triglicéridos en plasma seminal se asocia con semen de buena calidad (Argov y col., 2007). Asimismo, también se informó que, en esta especie, existe una relación directa entre la composición lipídica del plasma seminal, la estación del año y la calidad del semen (Beer-Ljubic y col., 2009). Así como los lípidos, algunas proteínas del plasma seminal están relacionadas con la regulación de la función espermática y la fertilidad. En bovinos, se ha identificado una familia de proteínas denominadas proteínas del plasma seminal bovino cuyo rol biológico ha sido ampliamente estudiado en dicha especie. Durante la eyaculación estas proteínas

se fijan a la superficie del espermatozoide favoreciendo la capacitación espermática (Manjunath P y Thérien, 2002). Además, se han podido identificar proteínas que pueden relacionarse directamente con la calidad seminal de ese individuo, así como con su capacidad fecundante. Es así que, cuatro proteínas asociadas a la fertilidad han sido identificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), y pueden utilizarse como predictivas de fertilidad en toros. Dos de ellas 55 kDa y 26 kDa fueron predominantes en el plasma seminal de toros de alta fertilidad, mientras que otras dos proteínas de 16 kDa fueron predominantes en plasma seminal de toros de baja fertilidad (Killian y col., 1993). En equinos, una proteína de 72 kDa se correlacionó positivamente con buena calidad seminal, mientras que tres proteínas 75 kDa, 18 kDa y 16 kDa fueron correlacionadas negativamente con la fertilidad (Brandon y col., 1999). En caninos, recientemente se han identificado con SDS-PAGE 37 bandas proteicas en el plasma seminal, de las cuales dos proteínas de 67 kDa y 58,6 kDa, han sido positivamente correlacionadas con la fertilidad. Además, una banda de 15,6 kDa fue identificada como una subunidad de arginina estearasa, y puede ser considerada como un marcador del normal funcionamiento prostático en caninos (de Souza y col., 2007).

Como se mencionó anteriormente, el plasma seminal de especies de interés productivo como bovinos y animales de deporte (equinos) ha sido ampliamente estudiado. Es así que han sido identificadas proteínas predictoras de la calidad seminal, así como también grupos de proteínas asociadas con la capacidad de resistencia espermática a la congelación (Jobim y col., 2004; 2011). Estos antecedentes sugieren que el plasma seminal felino podría contener proteínas con funciones similares, lo cual podría ser de utilidad para estimar la capacidad fecundante del semen felino.

En el gato doméstico, la caracterización bioquímica del plasma seminal aún no ha sido estudiada en detalle. Existe en la actualidad solo un trabajo que determinó el perfil

proteico del plasma seminal, la concentración de proteínas y zinc comparando dos métodos de recolección de semen (electroejaculación y catéter uretral). El mencionado trabajo describe que la concentración de Zinc y proteínas totales no varían con la técnica de recolección de semen y que la concentración de proteínas totales no se correlaciona con la calidad seminal. Además, han podido identificarse más de 30 bandas proteicas con SDS-PAGE, de las cuales 8 bandas de entre 5,5 y 200 kDa fueron encontradas en todas las muestras seminales. Una de ellas, de 66 kDa se cree podría actuar como ligando del colesterol durante la capacitación espermática (Zambelli y col., 2010). Es así que, aún no se ha descrito la relación existente entre la composición bioquímica del plasma seminal y la calidad del semen en los gatos. Sin embargo, Villaverde y col. (2014) relacionaron determinados componentes (selenio, zinc y testosterona) en suero y en plasma seminal, con la calidad de semen y la biometría testicular. Estos autores no encontraron relación alguna entre estos componentes con los parámetros seminales, habiendo observado correlaciones positivas entre la testosterona en suero y en plasma seminal con el volumen y peso testicular. También destacan correlaciones entre determinadas variables seminales, como la morfología espermática y el vigor, con las concentraciones séricas de selenio y zinc.

En algunos animales se ha descrito que el PS también posee la capacidad de inducir un pico de hormona luteinizante suficiente para provocar la ovulación y posterior formación de cuerpo lúteo (CL). El componente del plasma seminal capaz de inducir el pico de LH fue inicialmente denominado factor inductor de ovulación (OIF) y ha sido encontrado en especies con ovulación refleja o inducida por el coito como llamas, camellos, conejos y koalas. El OIF también ha sido encontrado en el PS de especies con ovulación espontánea como bovinos, equinos y cerdos, sugiriendo que se mantiene conservado entre los animales (Adams y Ratto 2013.) Este factor ha sido identificado

como factor de crecimiento neuronal β (β -NGF), pertenece a una familia de neurotrofinas que fueron descubiertas en el sistema nervioso y, posteriormente, en otros órganos, como el sistema reproductor de muchas especies animales (Adams y col., 2016; Ratto y col., 2012). El β -NGF es una molécula proteica de alrededor de 26-27 kDa, que bajo condiciones reductoras de electroforesis es separado en dos subunidades monoméricas de aproximadamente 13kDa. (Ratto y col., 2012). Al ser inoculada parenteralmente en llamas, esta proteína provoca un pico preovulatorio de LH, seguido de ovulación y consecuente formación de CL (Ratto y col., 2011). El hecho de que se haya descrito una proteína capaz de inducir la ovulación en el PS de especies con ovulación inducida por el coito sugiere que también podría ser un componente del PS en el gato.

La importancia de los componentes del plasma seminal ha sido motivo de numerosas investigaciones. En carneros ciertas proteínas del PS poseen un rol fundamental en la funcionalidad y protección de las membranas espermáticas (Muiño-Blanco y col. 2008). Estos autores han observado que la adición de proteínas del plasma seminal a los espermatozoides antes de la criopreservación previene los daños en las membranas y mantiene la viabilidad celular. Mientras que la adición de estas proteínas después de la criopreservación tiene la capacidad de restaurar las membranas estabilizándolas, incrementando así la fertilidad espermática al descongelado. Dos bandas de 14 y 20 kDa han sido caracterizadas con electroforesis en geles de poliacrilamida como las responsables de estos efectos. Análisis posteriores determinaron una fuerte homología con proteínas del PS de otras especies, particularmente con una de las proteínas perteneciente al grupo de proteínas del plasma seminal bovino que contiene dominios de fibronectina II, lo cual le brinda habilidad de ligando (Muiño-Blanco y col., 2008). Estas proteínas similares al grupo de proteínas del PS bovino, también se han documentado en el PS de cerdos, chivos y bisonte, por lo que se cree que se encuentran bastante

conservadas entre las especies (Muiño-Blanco y col., 2008). Los antecedentes en relación con la funcionalidad de ciertas proteínas del PS, sumado a que podrían conservarse entre las especies, sugiere que estas podrían formar parte del PS del gato doméstico, adquiriendo gran relevancia en la criopreservación espermática.

En los felinos domésticos, la utilización de biotecnologías como la criopreservación, y la inseminación artificial (IA) son muy importantes ya que el gato doméstico puede ser utilizado como modelo experimental para implementar biotecnologías en félidos silvestres en vías de extinción, lo que permite aumentar sus posibilidades de preservación (Pukazhenthil y col., 2006b; Diaz y Ojeda, 2000). Además, la implementación de criopreservación de semen e IA son de suma importancia en el manejo reproductivo del criadero como medio para conservar material genético de animales de altos estándares raciales. La 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. Es así que la criopreservación de semen en el gato doméstico ha despertado gran interés entre los científicos.

Mediante la criopreservación seminal es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación conservando su potencial fecundante en el tiempo (Watson, 1995). Cuando la célula espermática se congela (-196°C) las reacciones metabólicas se detienen y la célula puede mantenerse viva indefinidamente. Sin embargo, para que la criopreservación sea exitosa, debe realizarse un descenso gradual de temperaturas minimizando los daños sobre la célula espermática. De esta manera, el primer paso de la congelación espermática es la refrigeración, la cual permite la equilibración entre los medios intra y extracelulares y la adaptación de las células al nuevo medio extracelular, para finalizar con la congelación espermática sobre los vapores de nitrógeno líquido. Estos eventos producen estrés sobre la célula

espermática, desestabilizan las membranas y es por esto que los espermatozoides criopreservados poseen menor capacidad fecundante en comparación con los espermatozoides frescos (Watson, 1995; Hammerstedt y col., 1990). También puede alterarse la interacción de los diversos componentes de las membranas espermáticas y consecuentemente su función (Aloia, 1988; Yeste 2016; Muñoz Sarmiento, 2021).

Se ha demostrado que durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos del proceso sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (Watson, 1995; Mazur y col., 1970; Parks y Lynch, 1992; Kasai y col., 2002; Naresh, 2016; Yeste, 2016; Muñoz Sarmiento, 2021). Varios autores observaron en diferentes especies (bovinos, ovinos, equinos, cerdos, felinos, caninos y en el hombre) que se producen alteraciones en la célula espermática que reducen la viabilidad de la población espermática inicial, provocando una disminución de la fertilidad al descongelado (Hammerstedt y col., 1990; Mazur y col., 1970; Dhami y col., 1992; Parks y Lynch, 1992; Chen y col., 1993; Watson, 1995, 2000; England y Ponzio, 1996; O'connell y col., 2002; Bailey y Morrier, 2003; Stornelli MC y col., 2005; Yeste, 2016). En felinos se evidenció una disminución significativa de los parámetros seminales como motilidad, viabilidad, integridad de membranas plasmáticas y acrosomales luego de la criopreservación espermática con diferentes métodos de recolección de semen (Thiangtum y col., 2009; Villaverde y col., 2013; Prochowska y col., 2016).

Es así que para disminuir las pérdidas inducidas por el proceso de congelación-descongelación las muestras se deben manipular, criopreservar y descongelar correctamente, esto implica la selección de un protocolo de congelación y medios que consideren las características particulares de las membranas espermáticas de cada especie, para, de esta forma, optimizar los resultados a la descongelación (Leivo y Bradley, 1999;

Buranaamnuay, 2017). Es así que, para estimar los porcentajes de espermatozoides dañados luego de la congelación, y evaluar objetivamente la resistencia que presenta una muestra de semen al proceso de criopreservación y comprobar cómo han tolerado los espermatozoides el proceso de congelación-descongelación, se utiliza el índice de congelabilidad, según la siguiente fórmula: características espermáticas al descongelado/características del semen fresco * 100 (Hidalgo y col., 2014; Ortiz y col., 2015).

Se han realizado varios estudios que relacionan el contenido de lípidos de las membranas espermáticas con la resistencia a los procesos de criopreservación seminal (Maldjian y col., 2005; Waterhouse y col., 2006). Sin embargo, existen pocos trabajos que relacionen los componentes del plasma seminal con la resistencia de los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación. En bovinos se observaron cambios de los metabolitos del plasma seminal (aminoácidos, péptidos, lípidos) en relación con la criopreservación y la fertilidad (Longobardi y col., 2020). En esta misma especie, Ugur y col. (2020), observaron que determinados aminoácidos del plasma seminal están relacionados con la congelabilidad de los espermatozoides. Además, se ha observado que ciertas proteínas del plasma seminal de carneros, bovinos, búfalos, equinos y cerdos actúan como marcadores de fertilidad y/o como indicadoras de resistencia a la congelación (Barrios y col., 2000; Moura y col., 2010; Jobim y col., 2004; Rego y col., 2016; Asadpour y col., 2007; Trein y col., 2008; Jobim, y col., 2011; Usuga Suárez, 2017; Yeste, 2016).

El conocimiento del contenido de colesterol, triacilglicéridos y proteínas del plasma seminal y su relación con los parámetros seminales y ultraestructura espermática podrían aportar información de relevancia en la capacidad fecundante del semen felino. Asimismo, ciertas características del plasma seminal y de la ultramicroscopía espermática

podrían influir en la supervivencia espermática al descongelado. Sin embargo, a pesar de que se han estudiado las características bioquímicas del plasma seminal en hombres y algunos animales domésticos, en el gato hay pocos informes sobre este tema y a su vez aún no se han realizado estudios que relacionen las características bioquímicas del plasma seminal con las características morfológicas del semen felino ni con su capacidad de congelación. Incluir en la evaluación de rutina del semen, la determinación bioquímica del plasma seminal, como predictores de calidad del semen, cuando los gatos son parte de programas de reproducción en colonias o criaderos sería de gran utilidad.

Es así como los objetivos planteados para este trabajo de tesis fueron:

- 1) Estudiar la relación entre el contenido de colesterol, triacilglicéridos y proteínas del plasma seminal con la calidad de semen (Capítulo II).
- 2) Estudiar las características ultramicroscópicas de espermatozoides felinos y relacionarla con la calidad del semen y los parámetros bioquímicos del plasma seminal (Capítulo II).
- 3) Evaluar la relación entre el peso molecular de las proteínas del plasma seminal y la calidad de semen (Capítulo III).
- 4) Determinar si las características bioquímicas del plasma seminal influyen sobre la supervivencia espermática del semen congelado (Capítulo IV).

CAPITULO II

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COLESTEROL, TRIACILGLICÉRIDOS Y PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL CON LA CALIDAD DE SEMEN Y LA ULTRAESTRUCTURA ESPERMÁTICA

INTRODUCCIÓN

El potencial de fertilización del semen depende no solo de la calidad seminal, de la composición lipídica de la membrana de los espermatozoides, sino también de la composición del plasma seminal.

Dentro de los lípidos presentes en la membrana de los espermatozoides, el colesterol, cumple un rol fundamental debido a su efecto estabilizador en las membranas plasmáticas. El colesterol se inserta en los espacios intersticiales de la bicapa lipídica, junto a la cola de ácidos grasos de fosfolípidos vecinos; otorgándole así un orden a la membrana. (Leahy y Gadella, 2015). Uno de los cambios bioquímicos asociados al proceso de capacitación, es la salida de colesterol de membrana plasmática, aumentando la fluidez y la permeabilidad de la membrana a los iones bicarbonato y calcio (Hernandez-Gonzalez y col., 2006; Abou-Haila y Tulsiani, 2009). La salida de colesterol es favorecida por el ingreso de estos iones, que a su vez impulsan la redistribución de los lípidos y proteínas de la membrana espermática, provocando un aumento de colesterol en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Asimismo, los iones de calcio y bicarbonato activan la producción de AMPc y de proteína quinasa A dependiente de AMPc, que facilitan la fusión de membranas induciendo la reacción acrosómica. El colesterol liberado de las membranas espermáticas es tomado por aceptores de colesterol del líquido extracelular. (Gilbert, 2005; Abou-Haila A y Tulsiani D, 2009; Leahy y Gadella, 2015).

Entre estos aceptores se encuentran la albúmina y las lipoproteínas presentes en el fluido uterino. Sin embargo, en el oviducto es más probable que una lipoproteína sea el aceptor dominante de colesterol. La albúmina sérica es predominantemente un portador circulatorio de ácidos grasos, no de colesterol, y su papel como aceptor de colesterol solo se ha descrito durante la capacitación espermática. Aunque el oviducto tiene altas concentraciones de albúmina, es probable que su capacidad para aceptar colesterol se vea reducida debido a que exista una forma unida a una proporción significativa de ácidos grasos. Por ello, en el oviducto el principal aceptor de colesterol espermático serían las lipoproteínas, entre ellas, las lipoproteínas de alta densidad se encuentran en altas concentraciones en oviducto y demás fluidos del tracto genital femenino (Leahy y Gadella, 2015). Asimismo, Naseer y col. (2014), mediante estudios *in vitro* evidenciaron que la albúmina sérica bovina y las β -ciclodextrinas son aceptoras de colesterol muy eficientes. De forma similar, Iborra y col. (2000), han evidenciado un alto porcentaje de espermatozoides ovinos con reacción acrosómica luego de su incubación con ciclodextrina. En este sentido, las proteínas del PS también han sido blanco de estos estudios. Tal es así que Thérien y col. (1999), en un estudio *in vitro* con espermatozoides bovinos, demostraron que las principales proteínas del PS bovino (BSP) causan un eflujo de colesterol de la membrana espermática acelerando de esta manera la capacitación. En este proceso, el PS juega un papel importante en la prevención de la capacitación espermática suministrando colesterol adicional a la membrana plasmática (Davis, 1978; Benoff, 1993; Cross, 1996; Maxwell y Johnson, 1999). Esta función del colesterol externo para prevenir la capacitación espermática ha sido utilizada en la criopreservación del semen suministrando colesterol a las membranas espermáticas mediante el uso de ciclodextrinas (Purdy y Graham, 2004; Amorim y col., 2009; Moore y col., 2005 y Mesa y col., 2012).

Como se mencionó, el PS cumple un rol importante evitando la capacitación espermiática epididimal, ocurriendo la misma luego de la eyaculación en el tracto genital femenino para la fertilización. El PS está formado por las secreciones que provienen principalmente del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias. Asimismo, está compuesto por varias proteínas, incluyendo enzimas (fosfatasa alcalina, alanino-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa), lípidos, macroelementos (Na, K, Ca, Mg, P, Cl) y microelementos (Cu, Fe, ZN; Johnston y col., 2001). Algunos autores han considerado la evaluación de parámetros bioquímicos del plasma seminal como parte de las pruebas que permitan mejorar la estimación de la calidad seminal y poder fecundante del semen en animales y hombres. Es así como, en especies como el bovino, se observó que las concentraciones de colesterol y otros lípidos se correlacionan con la calidad de semen (Beer-Ljubic y col. 2009). En 2007, Argov y col., demostraron que una alta concentración de triglicéridos en el plasma seminal se asocia con semen de buena calidad en toros. Ese mismo año, Brinsko y col., registraron una asociación entre la composición de lípidos del plasma seminal, la calidad del semen y la fertilidad/infertilidad en equinos (Brinsko y col., 2007). Recientemente, Longobardi y col. (2020) observaron variaciones en el perfil lipídico de toros de alta y baja fertilidad, siendo los niveles de triacilgliceroles, tripropanoato de glicerol y estearato de 2,3-diacetoxipropilo predominantes en el plasma seminal de toros de alta fertilidad. Kacel y Iguer-Ouada (2018), demostraron que la concentración de triacilglicéridos del plasma seminal, y ciertos parámetros seminales (concentración, viabilidad y motilidad espermiática), fueron mayores en gallos alimentados con una dieta suplementada con aceite de oliva comparado con gallos alimentados con una dieta estándar.

En humanos se ha demostrado que los hombres fértiles presentaron correlaciones positivas entre la concentración de zinc en el plasma seminal con la densidad, motilidad

y viabilidad espermática. Lo que indica que el zinc puede contribuir a la fertilidad a través de su efecto positivo sobre la espermatogénesis, debido a que ejerce actividad protectora como eliminador de excesivos aniones superóxido producidos por espermatozoides y/o leucocitos defectuosos en el semen después de la eyaculación (Chia y col., 2000). Más tarde, Meseguer (2004), observó una correlación significativa positiva entre el colesterol de la membrana del espermatozoide con la morfología espermática en humanos. Mientras que la concentración de Ca^{2+} intracelular fue menor en los pacientes infértiles comparados con los fértiles. Por estas razones, propuso la utilización del calcio y colesterol como marcadores de calidad del semen, debido a su relación directa con la morfología espermática y potencial de fertilidad. De forma similar, Garolla y col. (2018), informaron que existen diferencias significativas en el contenido de colesterol y sus derivados oxidados (7β -hidroxicolesterol y 7-ceto-colesterol) en las membranas espermáticas al comparar hombres fértiles e infértiles, lo que sugiere un vínculo bioquímico estricto que relaciona la función testicular, el estado de la membrana espermática y el potencial de fertilidad masculina. Si bien no se habían encontrado diferencias en los niveles de colesterol del PS en pacientes fértiles e infértiles (Meseguer 2004), un estudio reciente asoció positivamente la cantidad total de colesterol en el plasma seminal con la calidad del semen (de Neergaard y col., 2018).

Además de funciones relacionadas al colesterol, las proteínas del PS han sido relacionadas con la calidad seminal. De esta forma se han podido identificar bandas de proteínas que pueden relacionarse directamente con la calidad seminal en toros y equinos (Killian y col., 1993, Brandon y col., 1999). En perros, de Souza y col. (2007), demostraron la existencia de dos proteínas que fueron correlacionadas positivamente con los parámetros seminales (motilidad, vigor, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales e integridad de membrana). En la actualidad, en el gato existe

solo un trabajo que describe a las proteínas totales del plasma seminal. El mismo identifica una proteína que podría actuar como ligando de colesterol durante la capacitación espermática. Sin embargo, no se ha relacionado la calidad de semen con las proteínas totales del plasma seminal (Zambelli y col., 2010).

La importancia de ciertos componentes del PS en la determinación de la capacidad reproductiva de un individuo demostrada en el hombre y en otras especies domésticas, sugiere que esta relación podría sucederse también en el gato doméstico.

Por otra parte, las pruebas rutinarias de evaluación seminal brindan información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides de una muestra, pero no ofrecen información completa sobre el potencial fertilizante del material seminal (Jurado y col., 2008). La morfología espermática y la motilidad estudiadas al MO, no son eficientes para detectar alteraciones cuando los defectos morfológicos poseen magnitud a escala ultramicroscópica (Crespilho y col., 2006). Blottner y col. (2001), observaron que un daño subcelular puede afectar la capacidad reproductiva de un animal sin tener necesariamente un impacto en la motilidad. Es por esto que el uso de microscopios de alta resolución como lo es la microscopía electrónica de transmisión o de barrido resulta una herramienta muy valiosa que brinda información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías y permite estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud (Bonaura y col., 2014). En el gato doméstico existen muy pocos estudios ultramicroscópicos acerca de la morfología espermática siendo los mismos descriptivos del tipo de anormalidad encontrada (Villaverde y col., 2013b).

Por esta razón, es de suma importancia contar con pruebas que puedan optimizar la evaluación de cada muestra seminal de forma tal de poder estimar la aptitud reproductiva de un animal. En este sentido el conocimiento del contenido de colesterol, triacilglicéridos

y proteínas del plasma seminal y su relación con los parámetros seminales y ultraestructura espermática podrían aportar información de relevancia en la evaluación de la calidad del semen en el gato doméstico.

OBJETIVOS

- Estudiar la relación entre el contenido de colesterol, triacilglicéridos y proteínas del plasma seminal con la calidad de semen;
- Estudiar las características ultramicroscópicas del espermatozoide felino y relacionarla con la calidad del semen y los parámetros bioquímicos del plasma seminal.

HIPOTESIS

- El semen de mejor calidad posee plasma seminal con mayores contenidos de colesterol, triacilglicéridos y proteínas;
- El semen con mayores contenidos de colesterol, triacilglicéridos y proteínas en el plasma seminal posee mayor cantidad de espermatozoides sin alteraciones ultramicroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Animales

Se utilizaron gatos (n=13), mestizos, sanos, de 1 a 5 años. Los animales fueron sometidos a un régimen de luz artificial, con ciclos lumínicos alternos cada 2 meses para mantener la calidad de semen e inhibir el efecto fotorrefractario (Nuñez Favre y col., 2012b). Para ello se utilizaron lámparas LED de 1400 lúmenes dando entre 150–300 lux a nivel del piso. Los animales estuvieron alojados en un ambiente acondicionado (3,50 x 4,60 m) en jaulas individuales (0,75 x 1,50 x 2 m) con agua *ad-libitum* y alimento comercial para gatos (control de pH, Vital Can[®], Buenos Aires, Argentina). Semanalmente se les realizó un examen físico, conductal, y se evaluó diariamente la ingesta de alimentos, agua, y sus excreciones.

Los experimentos respetaron las recomendaciones sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. (.3# 40-3-14P y # 82-5-18P).

Toma de muestra y evaluación de semen

Los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.) y xylazina (1mg/kg i.m.; Slatter, 2003) y sometidos a electroeyaculación una vez cada 4 semanas. Se utilizó un electroeyaculador manual, Electronic Siremaster Eyaculator[®] (Ice Corporation – Manhattan, Kansas) para la extracción de las muestras de semen. El vástago del electroeyaculador se introdujo en el recto del animal y se posicionó a nivel de la próstata. La electroeyaculación se realizó mediante la técnica descrita por Howard, donde los animales recibieron un total de 80 estímulos divididos en 3 series (30, 30 y 20) con 2-3

minutos de descanso entre las mismas. La primera serie consistió en 10 estímulos a 2V, 10 a 3V y 10 a 4V. La segunda serie consistió en 10 estímulos a 3V, 10 a 4V y 10 a 5V. La última serie consistió en 10 estímulos a 4V y 10 a 5V (Figura 2.1; Howard y col., 1990). El animal respondió a la descarga de estímulos eléctricos con la abducción del miembro posterior. Se obtuvieron y evaluaron 58 eyaculados totales. Cada muestra seminal fue recolectada en un tubo de 1,5 ml precalentado a 37°C y sometida a las siguientes pruebas de contrastación seminal:

En el examen macroscópico se evaluó:

- 1) Volumen, se determinó mediante micropipetas graduadas.
- 2) Color, se determinó mediante observación directa, pudiendo variar de blanco a transparente.
- 3) Aspecto, también se apreció por observación directa, pudiendo ser desde translúcido hasta turbio.

En el examen microscópico se evaluó:

- 1) Motilidad individual (MI), 10 μ l de semen se colocaron entre porta y cubreobjetos atemperados a 37°C. Luego se observaron en microscopio óptico con una magnificación de 400X. Se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en 5 a 7 campos microscópicos (Nuñez Favre y col., 2012a);
- 2) Vigor (VI), se evaluó conjuntamente con la motilidad individual. Para establecer este parámetro se utilizó una escala de 0 a 5, donde 0 representa inmovilidad, 1-2 movimientos circulares u oscilatorios en el lugar, 3 movimiento progresivo lento, 4 movimiento progresivo rápido y 5 movimiento progresivo muy rápido;
- 3) Número total de espermatozoides (ET), se obtuvo realizando el producto entre la concentración espermática y el volumen del eyaculado. La concentración espermática (CE; 10^6 /ml) se calculó utilizando una dilución 1:200 en solución

- fisiológica formolada al 2%; con ella se cargó la cámara de Neubauer por capilaridad. Aplicando la técnica y la fórmula utilizada para conteo de glóbulos rojos (conteo en el retículo central de la cámara), se obtuvo la concentración por unidad de volumen (Nuñez Favre y col., 2012a);
- 4) Porcentaje de espermatozoides vivos (PV), se mezcló una gota de 10 µl de semen con una gota de 10 µl de tinción vital eosina-nigrosina sobre un portaobjetos a 37°C durante 30 segundos. Se realizó un extendido y se contaron 100 células, las cuales se clasificaron en espermatozoides vivos y muertos con microscopio óptico con una magnificación de 1000X. Las células vivas no se colorearon, mientras que las células muertas se observaron coloreadas debido al paso del colorante por la alteración de la permeabilidad de membrana (Figura 2.2; Tittarelli y col., 2006);
 - 5) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), se realizó mediante la técnica de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína. Se contaron 100 células y se clasificaron en dos grupos según posean acrosoma intacto o acrosoma dañado. Esta prueba se realizó en microscopio de fluorescencia con una magnificación de 1000X (Figura 2.2; Mendoza y col., 1992);
 - 6) Morfología espermática (ME, % de espermatozoides morfológicamente normales), se utilizó para su estudio Tinción 15[®] (Biopur SRL, Rosario, Argentina), se observaron 100 células totales con microscopio óptico con una magnificación de 1000X. Se clasificaron las anomalías encontradas según su localización (cabeza, pieza intermedia y cola), (Figura 2.2; Nuñez Favre y col., 2012a).

A fin de poder demostrar las posibles diferencias entre el contenido de colesterol, triacilglicéridos y proteínas totales del plasma seminal con la calidad de semen, se decidió dividir a los eyaculados en 2 grupos bien definidos según su calidad seminal.

Es así como la MI, VI y CE se utilizaron para establecer un índice de calidad de semen. Cada variable fue categorizada por terciles. Aquellos eyaculados que se encontraron en el tercil superior para las tres variables seleccionadas fueron clasificados como buena calidad de semen (BCS). Mientras que los eyaculados que se encontraron en el tercil inferior fueron clasificados como mala calidad de semen (MCS).

De todos los gatos se obtuvieron eyaculados que se incluyeron en el grupo BCS y MCS.

En ambos grupos (BCS/ MCS) se pudieron realizar todas las pruebas de contrastación seminal.

Luego de la evaluación macroscópica y microscópica del semen, el mismo fue centrifugado a 1500 x g durante 10 minutos a 20°C y las muestras de plasma seminal fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.



Figura 2.1. Electroeyaculación en felinos. Electroeyaculador manual utilizado, fuente de poder (A) y vástago (B). Posición del animal en decúbito lateral (C).

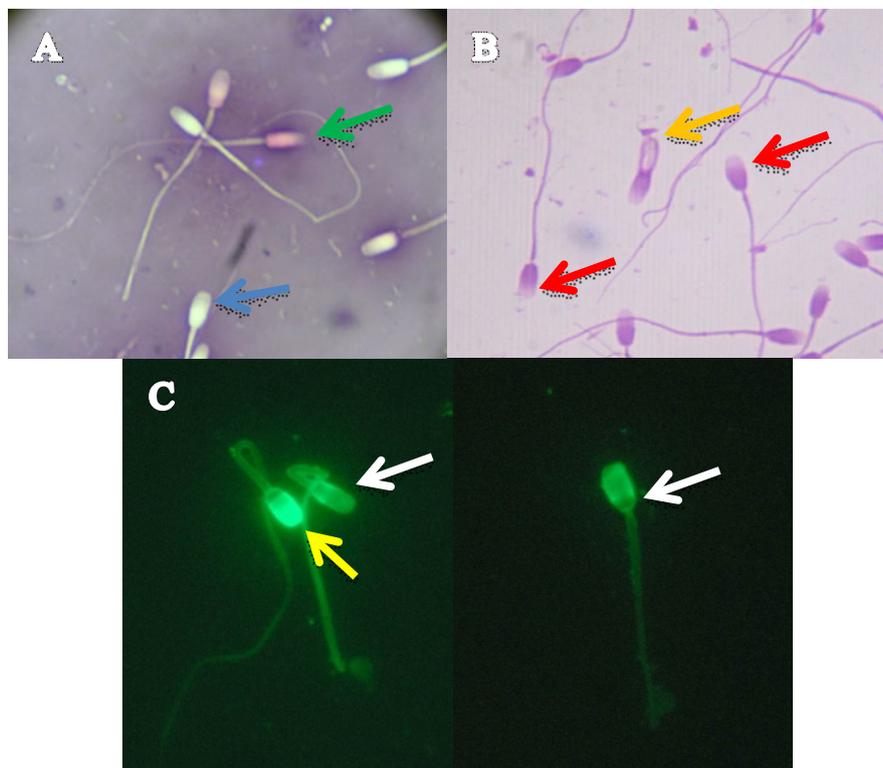


Figura 2.2. Pruebas de contrastación del material seminal in vitro. A: vitalidad espermática, se observan espermatozoides vivos (flecha azul) y espermatozoides muertos (flecha verde); tinción eosina-nigrosina, 1000X. B: morfología espermática, tinción 15[®] Biopur SRL, 1000X, se observan espermatozoides felinos con morfología normal (flecha roja) y un espermatozoide con Defecto de “Dag” menor (flecha naranja): caracterizado por el super-enrollamiento de la cola sin involucrar la cabeza. C: evaluación de la integridad del acrosoma, estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína, se observan dos espermatozoides felinos con sus acrosomas rotos (flecha blanca) y un acrosoma sano (flecha amarilla).

Examen Ultramicroscópico

El estudio mediante microscopía electrónica fue realizado en 11 eyaculados, de los cuales 9 pertenecieron al grupo de buena calidad seminal (BCS, n = 9); y 2 eyaculados al grupo de mala calidad seminal (MCS, n =2).

Inmediatamente después de la evaluación seminal, cada muestra de semen se centrifugó durante 10 minutos a 1500 x g a 20°C a fin de separar el plasma seminal del paquete celular. Las muestras del plasma seminal libre de células fueron conservadas a -20°C hasta su análisis; y el paquete espermático fue procesados para realizar la evaluación ultramicroscópica. Cada muestra fue fijada con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido se colocó en el fijador durante 2 hs a 4°C. Luego se realizó una fijación secundaria con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C y posteriormente, los espermatozoides se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina Epoxi (Jurado 2008). Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estas muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (MET) Jeol JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Figura 2.3). Se evaluaron 100 cabezas y 100 colas en cada eyaculado.

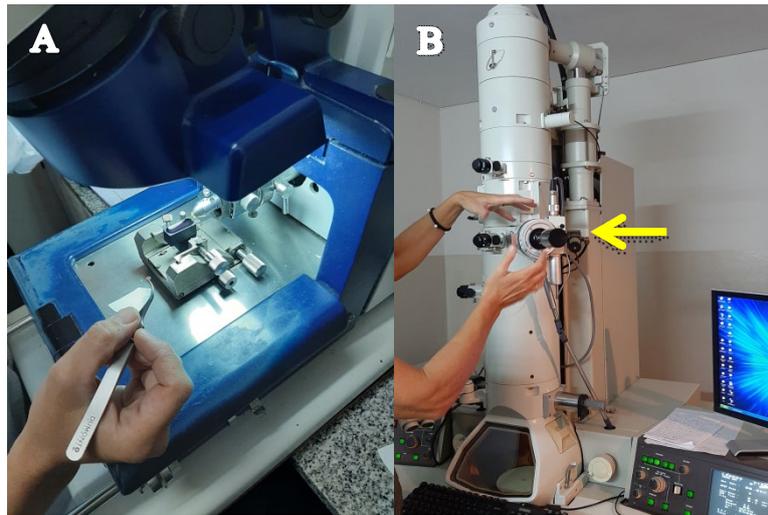


Figura 2.3. Procesamiento de la muestra. A: Obtención de cortes ultrafinos con el Ultramicrotomo. B: Se observa el microscopio electrónico de transmisión (MET) Jeol JEM 1200 EX II. La flecha amarilla señala el sitio de colocación de las muestras.

Evaluación Bioquímica

Con las muestras del plasma seminal libres de células se realizó la determinación de colesterol (C), triacilglicéridos (TAG) y proteínas (PROT) en las 58 muestras de plasma seminal mediante colorimetría (cholesterol and triglycerides BioSystems Reagents & Instruments[®]; Proti 2 Wiener[®]). Para la lectura de las reacciones colorimétricas se utilizó un espectrofotómetro (Metrolab 1600) y se siguieron las instrucciones del fabricante para el uso de los kits de las determinaciones bioquímicas. Los límites de detección fueron: 0.02–12 g/dl para PROT; 0,0063–5 g/l para C; y 1.6–600 mg/dl para TAG. (Figura 2.4)



Figura 2.4. Espectrofotómetro (Metrolab 1600). Instrumento usado en el análisis químico para medir la cuantificación de sustancias (colesterol- flecha amarilla, triacilglicéridos- fecha azul y proteínas- flecha roja).

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA utilizando el ProcGlimmix de SAS (9.4) y fueron estimadas las correlaciones de Pearson entre las variables (ProcCorr, SAS 9.4). La variación de C, TAG y PROT fueron explicados por modelos de regresión con la variable calidad de semen como el predictor fijo e incluyendo al gato como un efecto aleatorio para tener en cuenta las medidas repetidas de los eyaculados. Las diferencias de las medias de los cuadrados medios mínimos entre BCS y MCS fueron evaluados en todos los modelos utilizando la prueba de Student (ProcGlimmix SAS 9.4).

MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES

Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA referidas al uso de gatos como animales de laboratorio. Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas y toma de muestras sangre (National Research Council 2002). Además, se respetaron las recomendaciones sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. (57-2-16T).

RESULTADOS

En total se evaluaron 58 eyaculados, de los cuales 30 correspondieron al tercil central, es decir los eyaculados que representan a la media de la población (media \pm 0,5 desvíos estándar; MeCS; Tabla 2.1). Para este estudio se seleccionaron los eyaculados correspondientes al tercil superior, para conformar el grupo de buena calidad seminal (BCS, n = 11); y los correspondientes al tercil inferior, conformaron el grupo de mala calidad seminal (MCS, n = 17).

La comparación entre los grupos evidenció que la MI, VI, CE, ET y ME fueron significativamente mayores en el grupo BCS comparado con el grupo MCS ($P \leq 0,01$, Tabla 1). Mientras que el VOL, AI y PV no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,25$; Tabla 2.1). Las concentraciones de C y TAG del plasma seminal

fueron significativamente mayores en el grupo BCS en comparación con el grupo MCS ($P < 0,0001$). Mientras que la concentración de PROT totales del plasma seminal no evidenció diferencias significativas en ninguno de los grupos ($P > 0,14$; Figura 2.5).

En la Tabla 2.2 se muestran las correlaciones entre los grupos para los parámetros seminales y bioquímica del PS. Se encontraron correlaciones significativas y positivas entre C con TAG; C y TAG con MI, VI, CE, ET y ME ($P < 0,01$). Además, hubo correlaciones significativas y positivas entre MI con VI, CE, ET y ME; VI con CE, ET y ME; CE con ET; CE y ET con PV y PV con IA ($P < 0,01$).

Adicionalmente, la relación entre ET y la cantidad de C y TAG del plasma seminal se muestran en la Figura 2.6. Sin embargo, no se observó correlación entre las PROT y los parámetros seminales ($P > 0,10$).

Es interesante notar que si bien las concentraciones de C y TAG en el PS correspondiente a eyaculados de BCS son significativamente mayores que las de eyaculados de MCS (C: $18,97 \pm 1,5$ vs. $6,9 \pm 1,21$ y TAG: $101,77 \pm 9,26$ vs. $21,19 \pm 7,45$; respectivamente), la diferencia en la cantidad de espermatozoides por mililitro en cada uno de los grupos invierte esta relación cuando se compara por millón de espermatozoides. De esta manera, los eyaculados con BCS presentan una significativa reducción en la cantidad de C y TAG por millón de espermatozoides comparados con los de MCS (Tabla 2.3).

Tabla 2.1. Parámetros seminales de los grupos de buena calidad seminal (BCS), calidad seminal media (MeCS) y mala calidad seminal (MCS).

Grupo/ Parámetros seminales	BCS (n=11)	MeCS (n=30)	MCS (n=17)
Motilidad individual (%)	89,82±3,17 ^a	75,67±3,30 ^b	32,39±2,65 ^c
Vigor (0-5)	4,96±0,07 ^a	3,90±0,14 ^b	2,95±0,06 ^c
Volumen (µL)	106,57±13,79	100,71±0,63	95,71±11,32
Concentración (x10 ⁶ /mL)	137,27±14,79 ^a	73,17±13,56 ^b	13,10±11,89 ^c
Número total de sperm. (x10 ⁶)	14,28±1,32 ^a	7,35±1,23 ^b	1,28±1,06 ^c
Vivos (%)	75,20±2,92 ^a	65,78±2,25 ^b	61,50±5,86 ^b
Acrosomas intactos (%)	73,50±2,17 ^a	63,44±3,15 ^b	65,00 ^{ab}
Morfología espermática (%)	69,95±5,07 ^a	60,43±2,66 ^b	49,75±6,56 ^c

Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM±SE). Letras diferentes indican diferencias significativas. La significancia se estableció en P<0,05

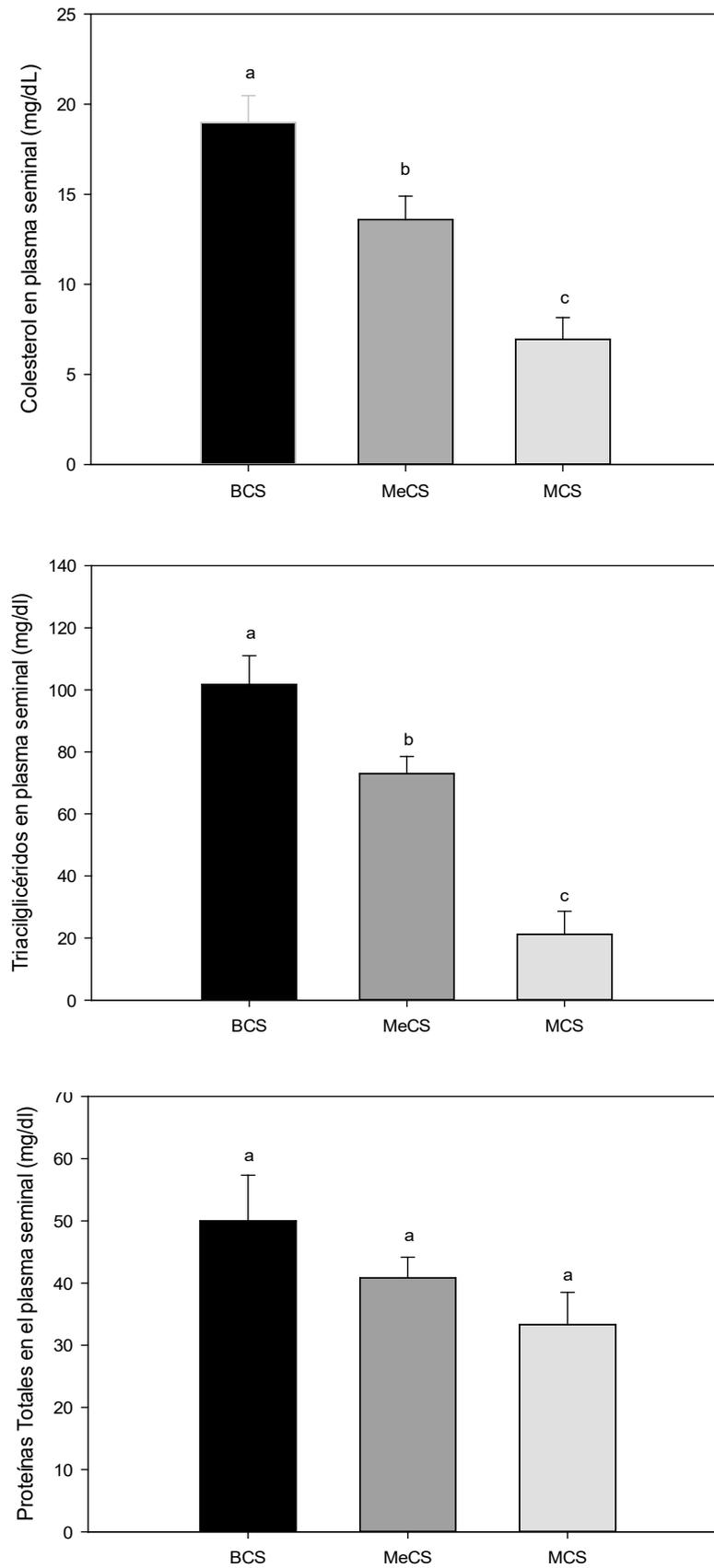


Figura 2.5. Variaciones en la concentración de colesterol, triacilglicéridos y proteínas totales en el plasma seminal correspondiente a eyaculados de buena calidad seminal (BCS), calidad seminal media (MeCS) y mala calidad seminal (MCS). Valores expresados como LSM \pm SE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 2.2. Correlaciones simples entre la evaluación bioquímica del plasma seminal y los parámetros seminales.

	C	TAG	PROT	MI	VI	CE	ET	PV	AI	ME	VOL
C		0,75 [†]	0,01	0,53 [†]	0,59 [†]	0,53 [†]	0,57 [†]	0,20	-0,001	0,45 [†]	0,07
TAG			-0,16	0,59 [†]	0,64 [†]	0,53 [†]	0,64 [†]	0,23	0,03	0,44 [†]	0,24
PROT				0,13	0,31	0,10	0,25	0,06	-0,35	-0,14	0,18
MI					0,78 [†]	0,41 [†]	0,44 [†]	0,22	-0,12	0,70 [†]	0,07
VI						0,43 [†]	0,49 [†]	0,07	-0,14	0,49 [†]	0,10
CE							0,90 [†]	0,43 [†]	0,30	0,26	-0,05
ET								0,38*	0,33	0,19	0,26
PV									0,45 [†]	0,21	-0,09
AI										0,13	0,10
ME											-0,29
VOL											

C: Colesterol, TAG: Triacilglicéridos, PROT: Proteínas totales, MI: Motilidad, VI: Vigor, VOL: Volumen, CE: Concentración espermática, ET: Número total de espermatozoides, PV: Vivos, AI: Acrosomas intactos, ME: Morfología espermática; [†]: $P < 0,01$ *: $P < 0,05$.

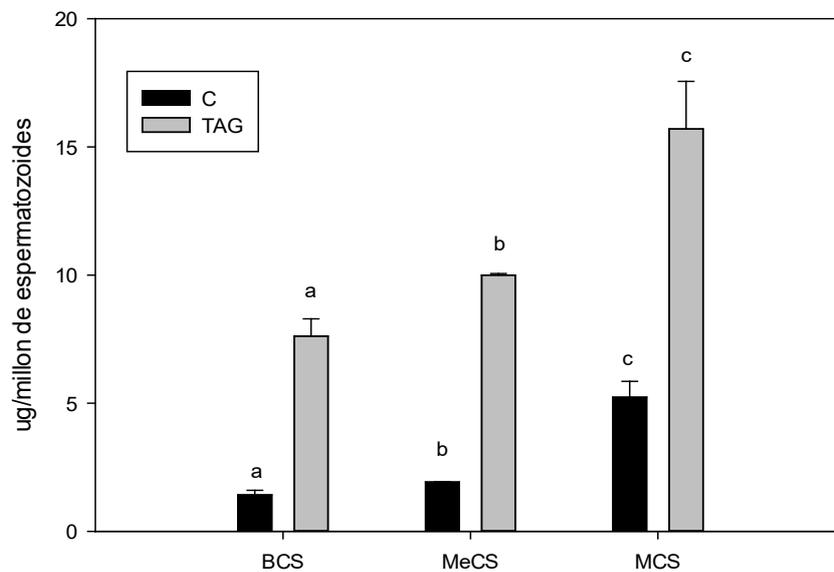


Figura 2.6. Relación entre la cantidad de colesterol (C) y triacilglicéridos (TAG) del plasma seminal por millón de espermatozoides en los grupos de buena (BCS), media (MeCS) y mala calidad de semen (MCS).

Tabla 2.3. Relación entre el número total de espermatozoides y la cantidad de colesterol (C) y triglicéridos (TAG) del plasma seminal en los grupos de buena calidad de semen (BCS) y mala calidad de semen (MCS)

	BCS (n = 11)	MCS (n = 17)
C plasma seminal (μg)/ 1×10^6 espermatozoides	1.33 ± 0.11	52.74 ± 0.91
TG plasma seminal (μg)/ 1×10^6 espermatozoides	7.12 ± 0.65	16.10 ± 5.67

Morfología espermática

Microscopía óptica

Al evaluar al microscopio óptico los 58 eyaculados (BCS=11, MeCS= 30 y MCS=17), se observó un mayor porcentaje de espermatozoides normales en el grupo BCS comparado con los grupos MeCS y MCS ($P<0,05$); las anormalidades localizadas en la cabeza y pieza intermedia fueron significativamente mayores en los grupos MCS y MeCS comparado con el grupo BCS ($P<0,05$). Mientras que el porcentaje de anormalidades localizadas en la cola fue significativamente mayor en el grupo BCS ($P<0,05$; Tabla 2.4).

Entre las anormalidades más frecuentes encontradas en el grupo BCS se observaron cabezas sueltas (7,01%), cabezas alargadas (3,25%) e irregulares (2,25%), piezas intermedias dobladas (14,16%), inserciones excéntricas (4,53%), piezas intermedias engrosadas (2,24%), colas enrolladas (29,80%) y colas dobladas (28,65 %). En el grupo MeCS predominaron cabezas sueltas (8,25 %), cabezas alargadas (4,38%), sobreteñidas (2,95%), irregulares (2,85%), macrocefalias (2,60%), cabezas con quiste acrosomal (2,27%), piezas intermedias dobladas (16,76 %), inserciones excéntricas (5,04%), piezas intermedias engrosadas (1,75%), cuellos quebrados (1,41%), colas enrolladas (22,46%) y colas dobladas (25,49 %). Mientras que en el grupo MCS se observaron más frecuentemente cabezas sueltas (9,17%), irregulares (4,97%), macrocefalias (3,84%), cabezas sobreteñidas (3,77%), alargadas (1,77%) y con quiste acrosomal (1,77%), piezas intermedias dobladas (19,55%) inserciones excéntricas (6,51%), gotas citoplasmáticas proximales (2,37%), cuellos quebrados (1,71%), gotas citoplasmáticas distales (1,02%), colas enrolladas (22,47%) y dobladas (17,49%).

Tabla 2.4. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas observada al Microscopio Óptico en los grupos BCS, MeCS y MCS.

Calidad seminal	Porcentaje de anomalías	Localización de anomalías		
		Cabeza	Pieza Intermedia	Cola
BCS	30,05 ± 5,07 ^{a*}	22,04 ± 0,78 ^{a*}	24,06 ± 1,22 ^{a*}	53,90 ± 1,76 ^{a*}
MeCS	39,57 ± 2,66 ^{b*}	25,05 ± 1,22 ^{b*}	27,20 ± 0,55 ^{b*}	47,75 ± 0,72 ^{b*}
MCS	50,25 ± 6,56 ^{c*}	27,7 ± 2,11 ^{b*}	31,21 ± 2,09 ^{c*}	41,09 ± 1,60 ^{c*}

BCS: grupo de buena calidad de semen, MeCS: grupo de calidad seminal media, MCS: grupo de mala calidad de semen. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas. *: P<0,05

Al estudiar al microscopio óptico los 11 eyaculados evaluados en microscopía electrónica de transmisión, se observó mayor porcentaje de espermatozoides normales en el grupo BCS comparado con el grupo MCS (P<0,001); las anomalías localizadas en la cabeza fueron significativamente mayores en el grupo MCS comparado con el grupo BCS (P<0,05; Tabla 2.5).

Entre las anomalías más frecuentes encontradas en el grupo BCS se observaron cabezas sueltas y cabezas irregulares, piezas intermedias dobladas e inserciones excéntricas, colas dobladas y colas enrolladas. Mientras que en el grupo MCS se observaron más frecuentemente macrocefalias, cabezas piriformes e irregulares, piezas intermedias dobladas y engrosadas, piezas intermedias dobles, colas dobladas y colas enrolladas (Tabla 2.6).

Tabla 2.5. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas observada al Microscopio Óptico.

Calidad seminal	Porcentaje de anomalías	Localización de anomalías		
		Cabeza	Pieza Intermedia	Cola
BCS	33,03 ± 1,91 ^{a†}	12,56 ± 1,18 ^{a*}	18,80 ± 1,44 ^a	68,64 ± 2,76 ^a
MCS	51,75 ± 5,08 ^{b†}	18,54 ± 0,46 ^{b*}	23,62 ± 3,44 ^a	57,84 ± 5,38 ^a

BCS: grupo de buena calidad de semen, MCS: grupo de mala calidad de semen. Letras diferentes indican diferencias significativas. †: P<0,001. *: P<0,05

Tabla 2.6. Anormalidades espermáticas observadas al microscopio óptico de los grupos de buena calidad seminal (BCS) y mala calidad seminal (MCS).

Anormalidades	% BCS	% MCS
Cabeza		
Macrocaabeza	1,57	5,30
Microcaabeza	0,28	0,66
Piriforme	1,57	3,98
Alargada	1,57	1,66
Suelta	3,14	1,32
Irregular	2,51	2,65
Quiste acrosomal	0,94	0,33
Pieza intermedia		
Deshilachada	2,02	0,00
Engrosada	2,02	7,54
Partida	0,58	1,06
Cuello quebrado	1,73	0,33
Doblada	4,62	7,54
Doble	0,87	3,63
Excéntrica	3,73	3,10
Gota citoplasmática proximal	0,58	0,59
Gota citoplasmática distal	2,91	0,31
Cola		
Doble	4,90	0,75
Doblada	36,69	40,56
Enrollada	27,77	17,01

Examen ultramicroscópico

La comparación entre ambos grupos evidenció que el grupo de MCS presentó un porcentaje mayor de morfoanomalías en comparación con el grupo BCS ($P < 0,001$). El estudio del tipo de anomalía mostró que el porcentaje de anomalías localizadas en la cabeza y pieza intermedia fue significativamente mayor en el grupo MCS comparado con el grupo BCS ($P < 0,05$; $P < 0,01$; Tabla 2.7). Mientras que el porcentaje de anomalías

localizadas en la cola fue significativamente mayor en el grupo BCS comparado con el grupo MCS ($P < 0,01$; Tabla 2.7).

El estudio al MET mostró diversas alteraciones localizadas en la cabeza como acrosomas defectuosos (lipping acrosomal), cabezas redondeadas, inmaduras, irregulares, alargadas, dobles, macrocefalias y microcefalias; en la pieza intermedia (PI) pudimos evidenciar gotas citoplasmáticas proximales y distales, y piezas intermedias dobles, y en la cola, colas enrolladas, dobladas, dobles, defectos de Dag mayor y menor (Figura 2.7).

Entre las anormalidades más frecuentes pertenecientes al grupo BCS se observaron cabezas redondeadas, microcefalias y cabezas inmaduras, gotas citoplasmáticas distales, gotas citoplasmáticas proximales, piezas intermedias agrandadas y colas enrolladas, colas dobladas y colas dobles. Mientras que en el grupo MCS se observaron más frecuentemente las cabezas redondeadas, acrosomas defectuosos (lipping acrosomal) cabezas irregulares, piezas intermedias agrandadas, gotas citoplasmáticas distales, gotas citoplasmáticas proximales y colas enrolladas, colas dobladas y colas dobles (Tabla 2.8).

Tabla 2.7. Porcentaje de morfologías espermáticas observada al Microscopio Electrónico de Transmisión

Calidad seminal	Porcentaje de anomalías	Localización de anomalías		
		Cabeza	Pieza Intermedia	Cola
BCS	33,71 ± 1,93 ^{a†}	19,95 ± 1,48 ^{a*}	17,43 ± 1,39 ^{a#}	62,61 ± 2,64 ^{a#}
MCS	62,35 ± 5,58 ^{b†}	27,08 ± 2,08 ^{b*}	30,00 ± 3,87 ^{b#}	42,92 ± 4,63 ^{b#}

BCS: grupo de buena calidad de semen, MCS: grupo de mala calidad de semen. Letras diferentes indican diferencias significativas. †: P<0,001. #: P<0,01. *: P<0,05.

Tabla 2.8. Anormalidades espermáticas observadas al microscopio electrónico de transmisión de los grupos de buena calidad seminal (BCS) y mala calidad seminal (MCS).

Anormalidades	% BCS	% MCS
Cabeza		
Macrocabeza	2,37	2,73
Microcabeza	3,72	2,18
Doble	1,69	0,00
Redondeada	4,73	10,37
Alargada	2,03	1,64
Inmadura	3,04	1,64
Irregular	0,34	3,27
Acrosoma defectuoso (lipping acrosomal)	2,03	6,00
Pieza intermedia		
Doble	2,05	3,96
Agrandada	3,42	9,63
Gota citoplasmática proximal	3,76	5,66
Gota citoplasmática distal	8,20	9,06
Cola		
Doble	10,49	10,08
Doble enrollada	1,64	0,00
Doblada	15,08	12,60
Enrollada	24,91	17,14
Defecto Dag mayor	6,88	0,50
Defecto Dag menor	3,61	3,53

Al observar los porcentajes de anormalidades encontradas al MET comparadas con las anormalidades encontradas al MO en ambos grupos (BCS y MCS) podemos destacar que las anormalidades localizadas en la cabeza en ambos grupos (BCS y MCS) fueron significativamente mayores en el MET comparada con el MO ($P < 0,05$; Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Porcentaje de anomalías espermáticas encontradas al microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión según su localización en ambos grupos BCS y MCS

Calidad seminal	Microscopía	An. Ca	An. PI	An. Co
BCS	MO	12,56 ± 1,18 ^{a*}	18,80 ± 1,44 ^a	68,64 ± 2,76 ^a
	MET	19,95 ± 1,48 ^{b*}	17,43 ± 1,39 ^a	62,61 ± 2,64 ^a
MCS	MO	18,54 ± 0,46 ^{a*}	23,62 ± 3,44 ^a	57,84 ± 5,38 ^a
	MET	27,08 ± 2,08 ^{b*}	30,00 ± 3,87 ^a	42,92 ± 4,63 ^a

BCS: grupo de buena calidad de semen, MCS: grupo de mala calidad de semen, MO: microscopio óptico, MET: microscopio electrónico de transmisión, An. Ca: anomalías de cabeza, An. PI: anomalías de pieza intermedia, An. Co: anomalías de cola. Letras diferentes indican diferencias significativas *: P<0,05.

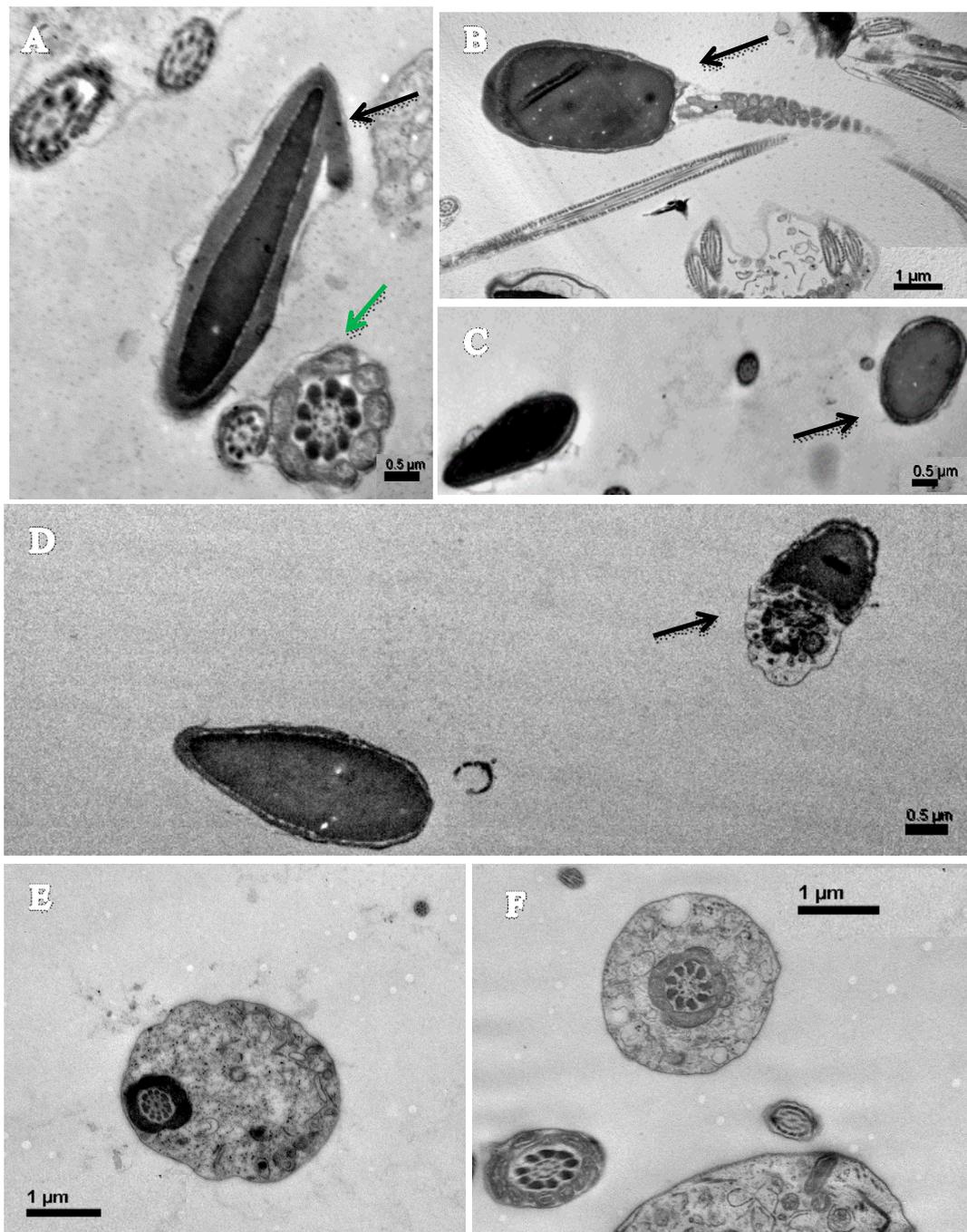


Figura 2.7. Anormalidades espermáticas al MET. A: acrosoma defectuoso (lipping acrosomal, flecha negra) y cola doblada (flecha verde). B: macrocefalia. C: cabeza redondeada. D: cabeza inmadura. E y F: gota citoplasmática proximal.

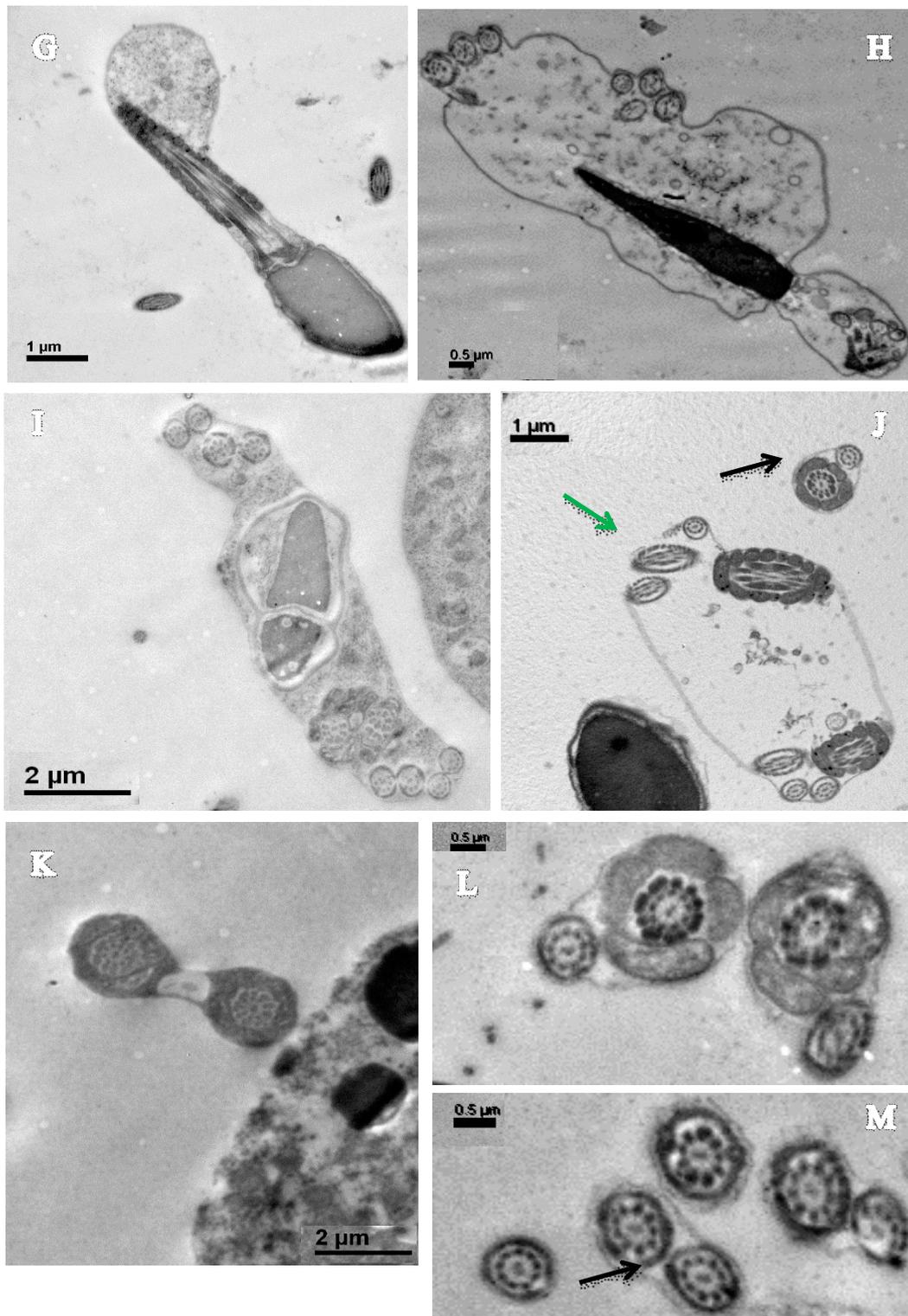


Figura 2.7. Anormalidades espermáticas al MET. G: gota citoplasmática distal. H: defecto de “Dag” (cola enrollada alrededor de la cabeza). I: defecto de Dag con doble cabeza. J: cola enrollada (flecha verde) y cola doblada (flecha negra). K: pieza intermedia doble. L: colas dobladas. M: cola doble

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los parámetros seminales para la media de la población presentados en este trabajo concuerdan con publicaciones previas para esta especie (Zambelli y Cunto, 2006; Zambelli y col., 2010; Furthner y col., 2018). Nuestros resultados evidencian diferencias significativas en la calidad seminal cuando se comparó el grupo BCS con el grupo MCS. Asimismo, las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos del plasma seminal fueron significativamente más altas en las muestras del grupo BCS en comparación con el de MCS, demostrando la relación entre las concentraciones de C y TAG del plasma seminal y la calidad de semen en el gato doméstico. Estos hallazgos concuerdan con lo observado previamente por Beer-Ljubic y col. (2009) en bovinos, y con Brinsko y col. (2007) en equinos. En bovinos se ha observado un aumento en la concentración de colesterol en el PS acompañando a la buena calidad seminal en el periodo invernal. Por el contrario, durante el verano, una baja concentración de colesterol en el PS acompañó a la pobre calidad seminal en este periodo (Beer-Ljubic y col., 2009; Argov y col., 2007). Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por estos dos autores, ya que las mayores concentraciones de C en el PS se asociaron a eyaculados con BCS. Asimismo, observamos una correlación positiva y significativa entre el C del plasma seminal y la MI. Trabajos previos sugieren que el PS juega un papel importante en la prevención de la capacitación espermática suministrando colesterol adicional a la membrana plasmática (Davis, 1978; Benoff, 1993; Cross, 1996; Maxwell y Johnson, 1999).

Meseguer (2004) no evidenció diferencias significativas al comparar los parámetros seminales (volumen, concentración y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) en hombres fértiles e infértiles destacando que la causa de infertilidad no está relacionada con ningún parámetro seminal macro y microscópico. Tampoco encontró

asociaciones entre las concentraciones de C del plasma seminal y los parámetros seminales entre hombres fértiles e infértiles. Axner y col. (1996) comunicaron, en un estudio clínico, mala calidad seminal asociada a infertilidad en el 4% de los gatos estudiados. No se ha evaluado la fertilidad de los gatos incluidos en el presente estudio por lo cual no podemos hipotetizar si gatos fértiles e infértiles poseen diferencias seminales. Sin embargo, los parámetros seminales del grupo de MCS sugiere que estos animales producirían menores porcentajes de preñez que los del grupo de BCS. Recientemente, de Neegaard y col. (2018), comunicaron una asociación positiva entre el C total en el plasma seminal y la MI, CE, ET y ME. Estas asociaciones en humanos concuerdan con nuestros hallazgos en gatos; asimismo en gatos también el porcentaje de VI mostró una asociación positiva con el contenido de C del PS.

Los TAG del PS son esenciales para el metabolismo espermático, ya que su oxidación suministra energía a los espermatozoides, y además juegan un papel importante en la fertilización. Una alta concentración de triglicéridos en el PS ha sido asociada a semen de buena calidad en toros (Argov y col., 2007; Longobardi y col., 2020) y en gallos (Kacel y Iguer-Ouada, 2018). Estos hallazgos concuerdan con lo observado en nuestro estudio donde las concentraciones de TAG del PS fueron significativamente mayores en el grupo BCS. Además, nuestros resultados mostraron una correlación significativa y positiva entre la concentración de TAG y C del PS con la ME. Estos resultados concuerdan con Cevik y col. (2007), quienes comunicaron mayores niveles de TAG y C en toros normozoospermicos comparados con toros oligoastenozoospermicos.

En perros, la concentración de PROT del plasma seminal, no se ha podido correlacionar con la calidad de semen. (de Souza y col., 2007). Similares resultados fueron observados en gatos, donde la concentración de PROT en el PS no mostró diferencias entre los eyaculados de buena y los de mala calidad seminal (Zambelli y col.,

2010). Nuestros resultados concuerdan con ambos grupos de investigación, debido a que la concentración de PROT del PS no evidenció diferencias en los diferentes grupos. Asimismo, las concentraciones de PROT en el PS halladas en nuestro trabajo fueron similares a las comunicadas previamente en gatos (Zambelli y col., 2010).

Este es el primer estudio que correlaciona ciertos componentes del plasma seminal con calidad del semen en los gatos. Los resultados en este trabajo muestran que la determinación de concentraciones de C y TAG del PS podrían utilizarse para mejorar la evaluación del semen en el gato doméstico, reduciendo la cantidad de muestreos necesarios para la estimación del poder fecundante del semen en la selección de un reproductor felino. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar su relación con la fertilidad.

El estudio de la morfología espermática mediante MO es de suma importancia en la evaluación de la calidad del eyaculado felino. De Sousa Barbosa y col. (2019) observaron en espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo, un 67,21% de espermatozoides normales; evidenciando un mayor porcentaje de anormalidades localizadas en la cola comparadas con la cabeza y pieza intermedia. Entre las anormalidades espermáticas más frecuentes encontradas predominaron colas enrolladas y dobladas, piezas intermedias dobladas, cabezas con formas anormales y sueltas. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en nuestro estudio en el grupo de eyaculados de BCS.

No obstante, se ha comunicado que la microscopía electrónica de transmisión podría ser una herramienta importante para detectar alteraciones estructurales que no pueden ser visibles al microscopio óptico y que interfieren en el proceso de fecundación, ya que nos brinda información más detallada acerca de la integridad de la célula. (Jurado y col., 2008). Se han realizado varios estudios descriptivos de la ultraestructura

espermática normal en diversas especies como bovinos y caprinos (Saacke y Almquist, 1964; Faisal y col., 2011). Sin embargo, existen muy pocos trabajos que detallen las anomalías ultraestructurales presentes en los espermatozoides felinos, y menos aún en espermatozoides eyaculados. Villaverde y col. (2013b) observaron una alta incidencia de defectos de “Dag” en los espermatozoides obtenidos mediante vagina artificial, y a partir de recuperados de la cola del epidídimo y testículo de un gato teratospérmico describiéndolos como un enrollamiento y fractura de la pieza intermedia, donde la cola enrollada está encapsulada por una membrana que atrapa varias organelas, entre ellas, las mitocondrias hinchadas y distribuidas de manera desigual. Acompañando estas anomalías también observaron secciones transversales de la cola con cambios en la estructura del axonema. Estos hallazgos concuerdan con la alteración observada frecuentemente en nuestro estudio y clasificada como defecto de Dag.

Además, nuestros resultados muestran gran variedad de anomalías en los eyaculados de gatos domésticos que se correlacionan con los hallazgos de Bonaura y col. (2013; 2014) en espermatozoides obtenidos a partir de la cola del epidídimo, quienes observaron alteraciones acrosomales, defecto de “Dag”, colas dobles, cabezas dobles, y axonemas incompletos.

Se ha descrito que daños ultramicroscópicos en los acrosomas podrían causar disfunción acrosomal y comprometer el proceso de capacitación, llevando a un bajo éxito en la fertilización en gatos domésticos (Long y col., 1996). Si bien los estudios de capacitación espermática y fertilidad no fueron parte de los objetivos de nuestro trabajo, encontramos una mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales localizadas en el acrosoma en eyaculados de MCS lo cual podría concordar con lo expresado por Long y col.

En conclusión, nuestro estudio confirma parte de las hipótesis de trabajo propuestas en este experimento. Pudo observarse que el semen de buena calidad presentó PS con mayores concentraciones de C y TAG; sin embargo, la cantidad de PROT no se correlacionó con las variaciones de la calidad de semen. Asimismo, pudimos observar que el semen con mayor contenido de C y TAG en el plasma seminal, presentó una menor cantidad de espermatozoides con alteraciones observables al MO, así como anomalías ultramicroscópicas. Conjuntamente pudo registrarse que el MET permite observar morfoanomalías espermáticas no detectables al MO.

CAPITULO III

EVALUACIÓN PROTEICA DEL PLASMA SEMINAL MEDIANTE ELECTROFORESIS

INTRODUCCIÓN

El plasma seminal contiene una amplia variedad de componentes tanto orgánicos como inorgánicos, entre ellos, las proteínas. La composición del plasma seminal varía de una especie a otra, ejerciendo efectos importantes sobre la función espermática. Es así que en animales de producción y compañía se han identificado proteínas asociadas a la calidad seminal, a la criotolerancia y a la fertilidad (Killian y col., 1993; Brandon y col., 1999; de Souza y col., 2007; Asadpour y col., 2007; Flowers, 2001; 2009; Yue y col., 2009; Novak y col., 2010a; Jobim y col., 2004; 2011; Somashekar y col., 2017; Kasimanickam y col., 2019).

La electroforesis en gel de poliacrilamida representa una herramienta valiosa para la separación y caracterización de proteínas de muestras biológicas (Chacur, 2012). La técnica más empleada, denominada “SDS-PAGE” consiste en la formación de una placa de gel de poliacrilamida utilizando el método desarrollado por Laemmli (1970) con el agregado de dodecil sulfato de sodio (Chandel y Pahadiya, 2005; Gallagher, 2012). Las proteínas, se revisten con carga negativa, mediante la acción del detergente Dodecilsulfato Sódico (SDS), y de esta manera se pueden separar en el gel y migrar hacia el cátodo bajo la acción de un campo eléctrico. La migración va a depender de la combinación de la carga, peso molecular y estructura tridimensional de la proteína, así como del tamaño de los poros de la matriz del gel (Towbin, y col., 1979; García 2000; Manns, 2011; Perez-Chabela y col., 2015; Matsumoto y col., 2019).

Esta técnica ha sido empleada en varias especies a fin de estudiar las características proteicas del plasma seminal con el fin de encontrar posibles marcadores que puedan predecir la fertilidad. La banda proteica asociada con alguna característica reproductiva es eluída y los componentes proteicos identificados. Estos últimos son posteriormente evaluados mediante pruebas de campo, que son determinantes para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides, así como la fertilidad.

Una de las especies en las que más se ha estudiado el plasma seminal y su relación con la fertilidad es la bovina. Cuatro proteínas han sido asociadas a la fertilidad mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y pueden utilizarse como predictivas de fertilidad en toros (Killian y col.,1993). En esta misma especie, Park y col., identificaron ocho proteínas potencialmente asociadas a la fertilidad mediante electroforesis bidimensional, pero solo tres de ellas pudieron correlacionarse significativamente con la fertilidad (Park y col., 2012). Recientemente, Kasimanickam y col. (2019) mostraron mediante electroforesis bidimensional que ciertas proteínas del plasma seminal se expresan en mayor cantidad en toros de alta fertilidad comparado con toros de baja fertilidad. Algunas de estas proteínas participan en funciones biológicas como la interacción espermatozoide-óvulo y el desarrollo embrionario. Asimismo, como la cantidad de ciertas proteínas presentes en el plasma seminal es mayor en toros con alta fertilidad, esto podría indicar que la eficiencia en la función específica de cada proteína también podría ser mayor en toros de alta fertilidad en comparación con los de baja fertilidad.

Asimismo, la calidad de semen y la fertilidad también se han correlacionado con la presencia de determinadas bandas de proteínas en búfalos, padrillos, ovinos, verracos y caninos (Asadpour y col., 2007; Brandon y col., 1999; Yue y col., 2009; Flowers, 2001; 2009; Novak y col., 2010a, de Souza y col., 2007).

La importancia del rol de las proteínas del plasma seminal en la fertilidad ha sido motivo de intensas investigaciones en las diferentes especies de animales. Mediante estudios más avanzados se han podido identificar proteínas, e incluso agruparse en familias, proteínas con funciones específicas, las cuales se encuentran conservadas entre las especies. Es así como en bovinos se han identificado proteínas del plasma seminal que se unen a las células espermáticas modulando sus funciones. Este grupo de proteínas capaces de unirse a los espermatozoides fue denominado BSP (por su nombre en inglés *bind sperm protein*). Estas proteínas son productos secretores de las vesículas seminales y son adquiridas por los espermatozoides en el momento de la eyaculación (Chacur, 2012). Las mencionadas proteínas se unen específicamente a los fosfolípidos que contienen colina en la membrana plasmática de los espermatozoides y estimulan el eflujo de colesterol. A medida que los espermatozoides llegan al oviducto, las proteínas BSP unidas a los mismos interactúan con las lipoproteínas de alta densidad del epitelio oviductal, dando como resultado una mayor eliminación del colesterol. Esto desestabiliza la membrana e inicia una serie de transducciones de señales intracelulares que inducen la capacitación espermática (Villemure y col., 2003). Sin embargo, la salida de colesterol estimulado por estas proteínas es dependiente del tiempo de exposición y de la cantidad de BSP presentes en el plasma seminal. De esta manera, la exposición continua del semen a dichas proteínas causaría una remoción constante de colesterol desde la membrana plasmática, pudiendo afectar negativamente la capacidad de criopreservación de los espermatozoides (Manjunath y col., 2006; Chacur, 2012). Es así como los cambios inducidos por las proteínas BSP en la membrana del espermatozoide pueden influir en la capacidad de fertilización y en el éxito del proceso de criopreservación. Estas proteínas representan el 65% del total de las proteínas del plasma seminal bovino (Manjunath y col., 2006).

Este tipo de proteínas también ha sido descrito en el plasma seminal de otras especies. En equinos se han caracterizado 8 proteínas (HSP-1 a HSP-8), siendo las más abundantes HSP-1 y HSP-2, (renombradas SP1 y SP2) que representan entre un 70 - 80% del total de proteínas BSP presentes en el plasma seminal (Kareskoski y Katila, 2008). En cabras, el plasma seminal contiene las denominadas proteínas GSP, relacionadas estructuralmente con las proteínas BSP de los bovinos (Villemure y col. 2003). En bisontes, se identificaron las proteínas BiSV que son idénticas a las proteínas BSP y representan aproximadamente el 25% de las proteínas totales de la vesícula seminal (Boisvert y col., 2004). En ovinos, Jobim y col. (2005) también identificaron proteínas similares a las bovinas BSP A1/A2.

Además de las proteínas BSP, en padrillos Novak y col. (2010b) identificaron, cuatro proteínas del plasma seminal (calicreína-1E2, clusterina y proteínas plasmáticas seminales 1 y 2) relacionadas negativamente con la fertilidad; mientras que CRISP3 (proteína secretora rica en cisteína 3) y PLUNC (familia de proteínas similares a la proteína del epitelio nasal, pulmonar y del paladar), se relacionaron positivamente con la fertilidad.

Por otra parte, se ha observado que ciertas proteínas del plasma seminal también poseen un rol importante en la conservación de las membranas espermáticas durante los procesos de criopreservación de semen. El plasma seminal de carneros contiene proteínas que pueden ser utilizadas como posibles marcadores de semen criopreservado. La proteína 31 (21,4 kDa) mostró una correlación negativa con la integridad de la membrana plasmática y la cantidad de espermatozoides vivos con acrosoma intacto tras la descongelación, por lo que podría ser considerada como un indicador de menor capacidad de resistencia a la congelación. El grupo de proteínas 03 (7,9 kDa) y 23 (13,6 kDa) mostraron una correlación positiva con la integridad de la membrana plasmática, siendo

consideradas como marcadores de mayor capacidad de resistencia a la congelación de semen. Estas últimas, pueden estar relacionadas con el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación y su ausencia podría resultar en una menor capacidad de resistencia a congelación (Moura y col., 2010). En bovinos, han podido identificarse grupos de proteínas asociadas con la capacidad de resistencia espermática a la congelación. De esta forma, dos grupos de proteínas (entre 13-14 kDa y otro entre 15-16 kDa) se han asociado a toros con alta capacidad de resistencia espermática a la congelación, mientras que otro grupo con un peso entre 25-26 kDa fue asociado a toros con baja capacidad de resistencia espermática a la congelación (Jobim y col., 2004). Un estudio reciente, identificó mediante electroforesis bidimensional a tres proteínas del plasma seminal de toros (osteopontina-K, precursor de DNasa γ y DNASE1L3) que se expresaron en mayor cantidad en el grupo de toros con alta capacidad de resistencia a la congelación comparado con el grupo de baja capacidad de resistencia a la congelación. Otras seis proteínas del plasma seminal (inhibidor de acrosina 1, glutatión peroxidasa 3, inhibidor de metaloproteínasa 2, efrina-A1, anexina A1 y factor activador de plaquetas acetilhidrolasa) fueron significativamente mayores en el grupo de baja capacidad de resistencia a la congelación (Rego y col., 2016).

En búfalos bandas de proteínas de 24,5 kDa se correlacionaron significativamente con la viabilidad en el semen congelado-descongelado. Mientras que las bandas de 45 kDa se correlacionaron con la morfología espermática al descongelado (Asadpour y col., 2007). En equinos, un estudio realizado por Trein y col., (2008) identificaron mediante electroforesis bidimensional, dos proteínas del plasma seminal, proteínas de 80-85 kDa y de 20-24 kDa que estaban presentes en concentraciones más altas en sementales que presentaban buena capacidad de resistencia a la congelación comparado con sementales con baja capacidad de resistencia a la congelación del semen. A su vez, Jobim, y col.,

(2011) también han observado diferencias en el perfil de proteínas del plasma seminal de animales con baja y alta resistencia espermática a la congelación. A partir de electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional se han identificado veinticinco proteínas de diferente peso molecular en el plasma seminal de padrillos. Dos de ellas, la de 80-85 kDa identificada como CRISP3, y la de 18,2 kDa identificada como HSP-2 fueron más abundantes en muestras de plasma seminal recogidas de sementales con alta capacidad de resistencia a la congelación comparado con sementales con baja capacidad de resistencia a la congelación del semen. Es así que las mencionadas proteínas fueron consideradas como posibles marcadores de alta capacidad de resistencia a la congelación del semen.

Si bien son importantes los avances con relación al perfil proteico del plasma seminal en especies de interés productivo, en el gato doméstico, la caracterización proteica del plasma seminal aún no ha sido estudiada en detalle. Es así que su estudio permitiría identificar marcadores proteicos de la calidad seminal en felinos.

OBJETIVO

- Evaluar la relación entre el peso molecular de las proteínas del plasma seminal y la calidad de semen.

HIPOTESIS

- El peso molecular de las proteínas del plasma seminal está relacionado con la calidad de semen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Los *animales* fueron mantenidos de la forma descripta para el capítulo II.

La *recolección y evaluación de semen* se realizó como se describió en el capítulo II.

Luego de la evaluación macroscópica y microscópica del semen, el mismo fue centrifugado a 1500 x g durante 15 minutos a 20°C y las muestras de plasma seminal fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Determinación del peso molecular de las proteínas del plasma seminal mediante electroforesis

Las proteínas de plasma seminal se separaron por electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida (30:1) al 15% (SDS-PAGE) según el protocolo de Laemmli (Laemmli,1970). Se prepararon los geles y se llenó la cuba con un buffer de corrida (Figura 3.1). Cada calle se sembró con 5 µl de plasma seminal, lo cual equivalió a ~1,9 µg de proteínas totales en el grupo de buena calidad seminal (BCS) ya ~1,5 µg en el grupo de mala calidad seminal (MCS). El marcador de peso molecular se cargó en la primera calle (Figura 3.2). El campo eléctrico hizo migrar a las proteínas cargadas negativamente hacia el electrodo positivo desde la parte superior a la inferior del gel separándose de esta manera por tamaño. Debido a que el SDS iguala la carga en todas las proteínas, la migración se realizó por su peso molecular migrando las moléculas más pequeñas más rápidamente que aquellas con pesos moleculares mayores.

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)y, las bandas proteicas transferidas se evidenciaron tiñendo las membranas con solución de tinta china (Figura 3.3, 3.4). En el Anexo 1 se detalla la técnica de electroforesis, así como las soluciones utilizadas.

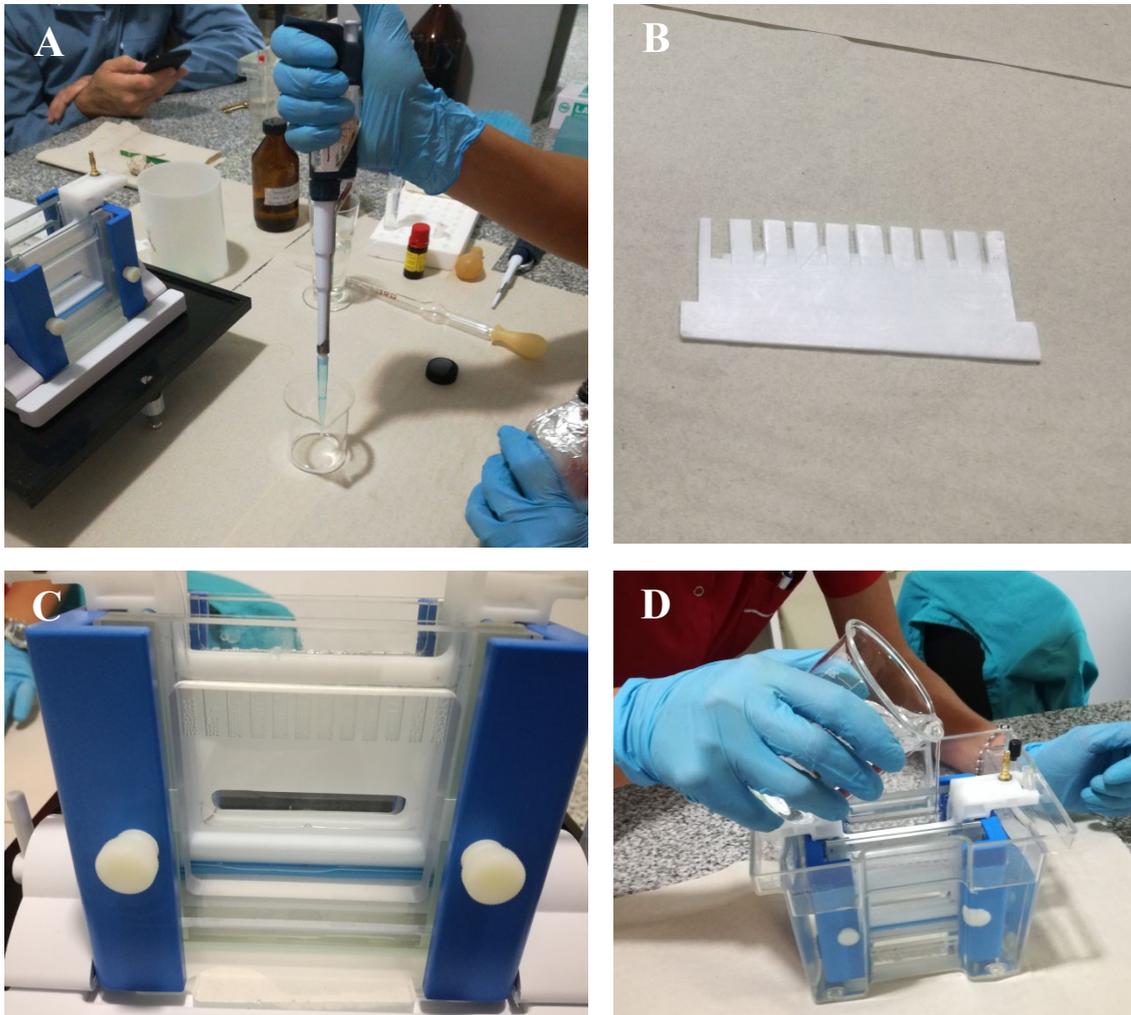


Figura 3.1. Preparación de los geles para la electroforesis. A: Preparado de las soluciones en un vaso de precipitado, se homogeniza suavemente y se vierte entre los vidrios. B: Peine que permite dar forma a las calles. C: Gel preparado, pueden observarse las calles marcadas. D: Llenado de la cuba de electroforesis con buffer de corrida.

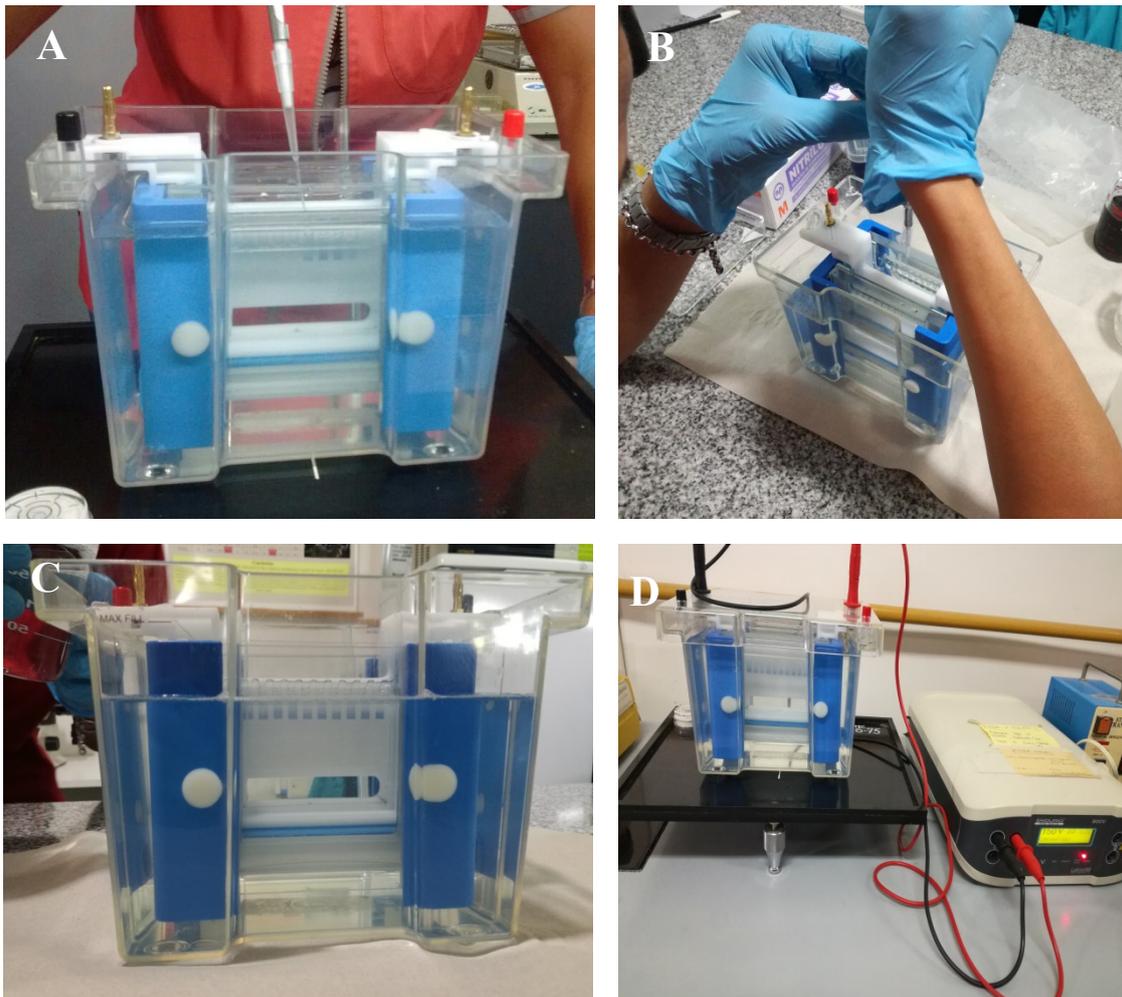


Figura 3.2. Siembra de las muestras. A y B: En la primera calle se sembró el marcador de peso molecular y en las siguientes, el plasma seminal. C: Se observa el gel con todas las calles cargadas. D: Se conecta a una fuente de poder con un voltaje constante. Comienza la corrida electroforética.

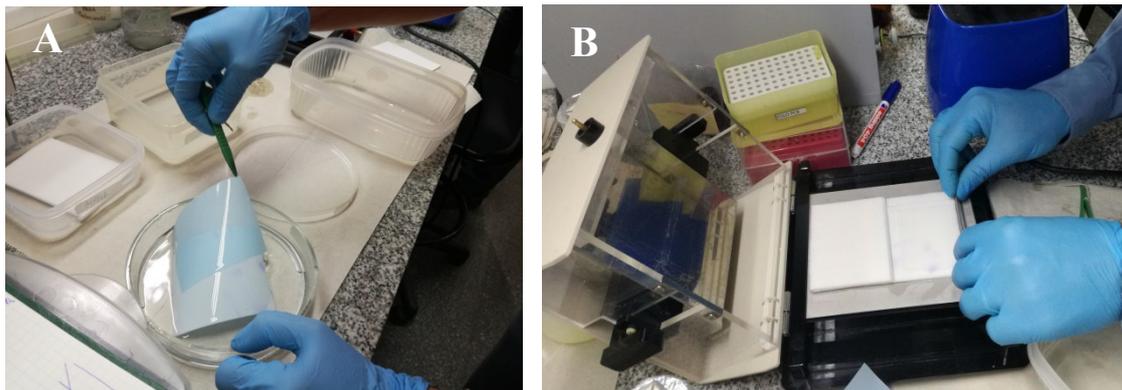


Figura 3.3. Preparación de la Transferencia a membranas. A: Activación de la membrana en metanol. B: Colocación en el transblot.

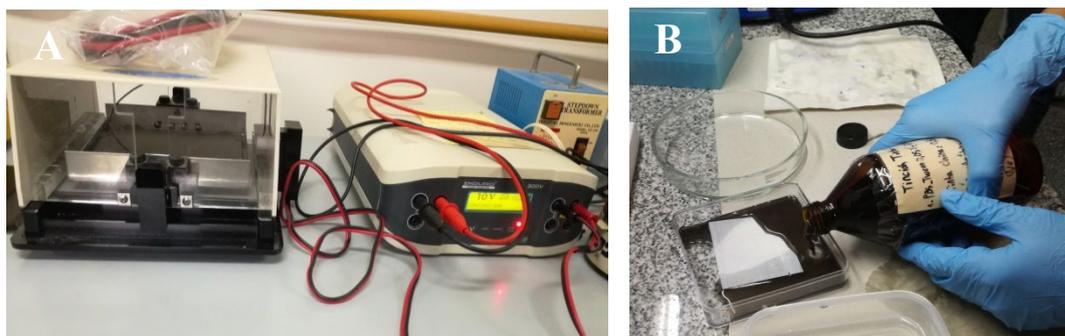


Figura 3.4. Transferencia a membranas. A: Se conecta a la fuente de poder, inicio de la transferencia a membranas. B: Tinción de las membranas con tinta china.

ANALISIS ESTADISTICO

El grado de acuerdo entre la banda de 14,4 kDa y la calidad seminal se realizó mediante el test no paramétrico Mann-Whitney Rank Sum Test (PROC FREQ; SAS,2003) y las asociaciones entre los grupos se estimó mediante *odds ratio* (PROC GLIMMIX; SAS, 2003).

MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES

Este experimento se realizó siguiendo las mismas pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio detalladas en el capítulo II.

RESULTADOS

Como se mencionó en el capítulo anterior, del total de 58 eyaculados evaluados, 28 fueron seleccionados para el estudio en relación con la calidad seminal (BCS: n = 11; MCS: n = 17). Se realizaron las corridas electroforéticas y transferencia a membranas PVDF de cada muestra de plasma seminal. Cada gel de corrida fue sembrado con muestras de BCS y MCS.

Pudieron evidenciarse claramente cinco bandas de proteína en todas las muestras, correspondientes a pesos moleculares de 20,1, 30,0, 45,0, 66,0 y 97,0 kDa. El plasma seminal del grupo BCS presentó una banda extra de 14,4 kDa (Figuras 3.5 y 3.6). Se encontró una asociación positiva y significativa entre la presencia de esta última banda y la calidad de semen (BCS vs. MCS, $p < 0,001$). Esta asociación no se observó al comparar

los eyaculados de MeCS con los de MCS. No se observaron diferencias en cuanto a la presencia de esta banda entre los eyaculados de MeCS con los de BCS ($p>1$)

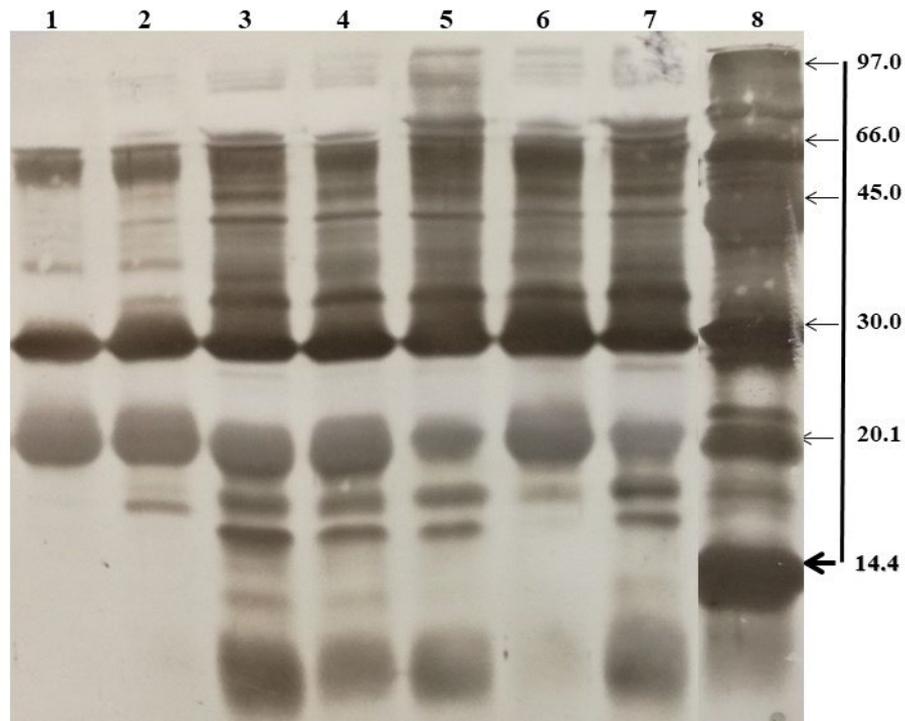


Figura 3.5. Membrana de PVDF teñida con tinta china. Las calles 1, 2 y 6 se sembraron con 5 μ l de plasma seminal de mala calidad de semen. Las calles 3,4,5 y 7 se sembraron con 5 μ l de plasma seminal de buena calidad de semen. La calle 8 corresponde al marcador de bajo peso molecular (14,4 a 97,0 kDa). Se visualiza la banda 14,4 que está presente solo en el grupo de buena calidad del semen.

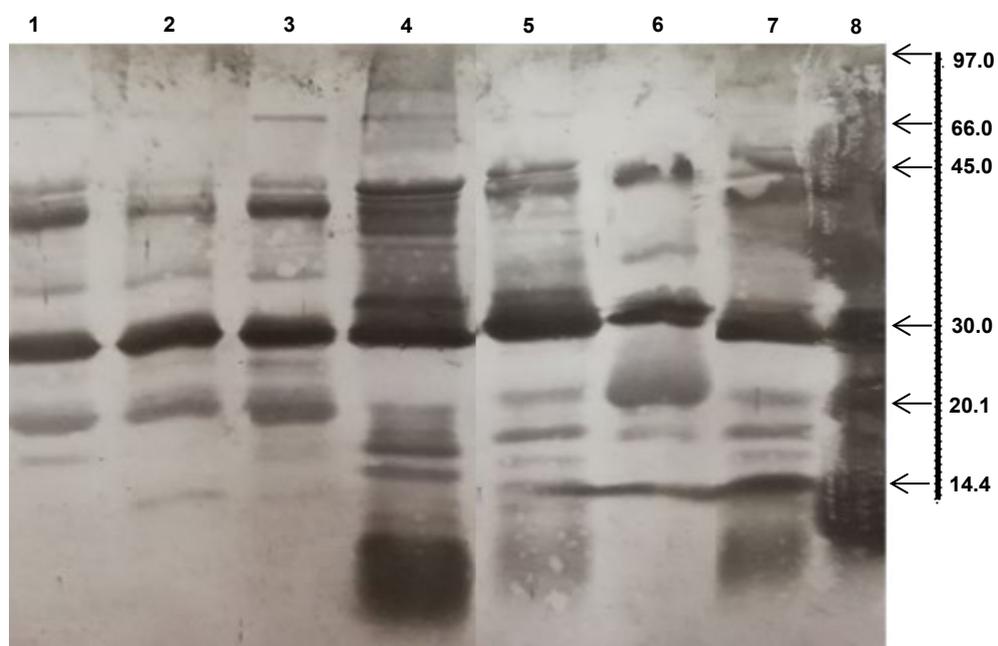


Figura 3.6. Membrana de PVDF teñida con tinta china. Las calles 1 y 3 se sembraron con 5 μ l de plasma seminal de mala calidad de semen. Las calles 2,4,5,6 y 7, se sembraron con 5 μ l de plasma seminal de buena calidad de semen. La calle 8 corresponde al marcador de bajo peso molecular (14,4 a 97,0 kDa). La banda de 14,4kDa está presente solo en el grupo de buena calidad del semen.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Varios estudios realizados en especies domésticas demostraron que el tipo de proteína del PS se correlacionan con la calidad del semen y la fertilidad (Killian y col., 1993; Brandon y col., 1999; Flowers, 2001; de Souza y col., 2007; Asadpour y col., 2007; Yue y col., 2009; Flowers, 2009; Novak y col., 2010a; 2010b; Park y col., 2012; Somashekar y col., 2017; Kasimanickamy col., 2019). En el gato doméstico, el perfil proteico del plasma seminal fue evaluado por Zambelli y col. (2010), utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida. Este estudio describe más de 30 bandas de proteínas con pesos moleculares entre 3,5 y 200 kDa. Sin embargo, solo ocho bandas de proteínas fueron observadas en todas las muestras, y solo tres de ellas (P200, P80, P28) fueron más evidentes en las muestras obtenidas por la técnica de electroeyaculación. A diferencia de lo observado por Zambelli y col., en nuestro estudio pudimos identificar claramente cinco bandas de proteínas que variaron entre 20 a 97 kDa en todas las muestras del plasma seminal obtenidas mediante electroeyaculación. Además, pudimos observar una banda de 14,4 kDa exclusivamente en eyaculados correspondientes al grupo de BCS. Asimismo, el estudio realizado por Zambelli y col., se llevó a cabo en las estaciones de invierno y primavera, mientras que en nuestro trabajo los gatos se colocaron en un ambiente controlado con fotoperiodo alternado para mantener la calidad de semen. La estacionalidad reproductiva en el gato ha sido bien documentada (Axner y Linde Forsberg, 2007; Blottner y Jewgenow, 2007; Stornelli, 2007; Nuñez Favre y col. 2012a). Es así que teniendo en cuenta que la producción de espermatozoides y la calidad del semen en los gatos están influenciadas por la estación del año, las diferencias entre los estudios podrían estar relacionadas con la estacionalidad en la expresión de ciertas proteínas en el plasma seminal del gato. En este sentido, las variaciones estacionales en la calidad de semen se han descrito ampliamente en los carneros, encontrándose también

diferencias en la composición de proteínas del plasma seminal entre las temporadas reproductivas y no reproductivas (Dominguez y col., 2008). Además, el análisis del plasma seminal por SDS-PAGE reveló la presencia de varias bandas de proteínas solo durante la temporada reproductiva (Perez-Pe y col., 2001; Cardozo y col., 2006). En esta misma especie, un estudio comparativo entre tres razas (Criolla, Hamshire y Romney Marsh) adaptadas a temporadas de lluvias en climas tropicales de gran altitud, demostraron diferencias en la calidad de semen y en la concentración de proteínas del PS entre las temporadas. Asimismo, mediante SDS-PAGE se identificaron 32 bandas de proteínas en PS, de las cuales 4 de ellas, presentaron diferencias significativas entre las razas (Serna y col., 2018).

Esta variación estacional en la calidad de semen y las proteínas del plasma seminal también se ha descrito en búfalos. La calidad seminal (volumen, concentración espermática, motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, integridad acrosómica y prueba de HOST) mejoró durante la temporada de verano. La expresión de proteínas del plasma seminal se incrementó en verano comparado con las temporadas de invierno y de lluvias. Además, en la temporada de verano se observaron dos bandas de proteínas de alto peso molecular (184 y 200 kDa) con SDS-PAGE, las cuales no fueron observadas en las otras estaciones (Sharma y col., 2014).

Se ha comprobado, que durante la capacitación el colesterol se mueve desde la membrana del espermatozoide hasta los aceptores de proteínas solubles, entre ellos la albúmina (Cross, 1998; Pilch y Mann, 2006; Leahy y Gadella, 2015). En este sentido, en nuestro estudio se observó una banda de proteínas con peso molecular similar a la albúmina (66 kDa) en todas las muestras de plasma seminal, lo que sugeriría que el plasma seminal de gatos contendría este aceptor de proteínas solubles (Pilch y Mann, 2006). En perros, dos bandas de proteínas (67 y 58,6 kDa) se correlacionaron

positivamente con la calidad seminal (De Souza y col., 2007). De la misma manera, la banda de proteína de 14,4 kDa del plasma seminal de gato se asoció a eyaculados de BCS. Por lo tanto, la banda de proteína de 14,4 kDa podría usarse para mejorar la evaluación del semen en los gatos. Además, en el plasma seminal de llama se describió una banda de proteína de 14 kDa responsable de la inducción de la ovulación en esa especie y luego se identificó como β -NGF (Ratto y col., 2012). Por tanto, la banda de proteína de 14,4 kDa que se encuentra en el plasma seminal del gato del grupo BCS podría estar relacionada con la presencia de alguna molécula capaz de inducir la ovulación en los gatos domésticos. Este hecho también podría estar relacionado con la fertilidad del semen. En toros, dos bandas de proteínas (26 kDa y 55 kDa) se asociaron con alta fertilidad, y la banda de proteínas de 16 kDa se asoció con baja fertilidad (Killian y col., 1993). En esta misma especie, se identificó mediante electroforesis bidimensional a la proteína Enolasa 1 que se correlacionó positivamente con la fertilidad (Park y col., 2012) y a la proteína, PEBP 4 la cual podría representar un potencial marcador de calidad y fertilidad del semen (Somashekar y col., 2017).

En sementales, la banda de proteína de 72 kDa se correlacionó positivamente con fertilidad (Brandon y col., 1999). En búfalos, dos bandas de proteínas se correlacionaron significativamente con la calidad de semen, la banda de proteínas de 24,5 kDa se correlacionó con la motilidad progresiva, mientras que la banda de 55 kDa se correlacionó con la viabilidad de los espermatozoides (Asadpour y col., 2007). Asimismo, en el carnero el contenido relativo de la banda de 72,45 kDa se correlacionó positivamente con la viabilidad y concentración de los espermatozoides, mientras que el contenido proteico relativo de la banda de 116 kDa podría tratarse de proteínas relacionadas con la fertilidad (Yue y col., 2009). En el verraco, se evidenciaron dos proteínas de 55 kDa y 26 kDa que mostraron una correlación positiva con la fertilidad (Flowers, 2001; 2009). También en

esta misma especie, se identificó una proteína de 25 kDa (glutación peroxidasa), una enzima antioxidante que puede proteger las membranas de los espermatozoides del daño oxidativo, que podría llegar a ser un marcador de fertilidad (Novak y col., 2010a).

Nuestros resultados evidencian que la banda de proteína de 14,4 kDa que se encuentra en el plasma seminal del grupo BCS, podría ser un marcador valioso de calidad seminal y debería investigarse más a fondo. Se necesitan más estudios para demostrar el papel potencial de dicha banda de proteína y poder predecir la fertilidad en los machos. Además, es necesario realizar trabajos futuros para determinar si la banda de proteína de 14,4 kDa está relacionada con la presencia de β -NGF en el plasma seminal del gato, como se ha descrito en otras especies con ovulación inducida por el coito. Finalmente, los resultados obtenidos en gatos domésticos también podrían ser valiosos en felinos salvajes.

CAPITULO IV

EFFECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA DEL SEMEN CONGELADO

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen en el gato doméstico ha despertado el interés de los investigadores, no solo para su implementación en el manejo reproductivo del criadero, como medio para conservar material genético de animales de altos estándares raciales, sino también como modelo para la conservación de felinos silvestres en vías de extinción (Villaverde y col., 2013a). Es así que, la estandarización y puesta a punto de técnicas y protocolos de criopreservación seminal en felinos domésticos, hacen posible su aplicación en felinos silvestres que se encuentren en riesgo de extinción (Tebet y col., 2020). En estos grupos de animales, la criopreservación de espermatozoides permite preservar material genético de alto valor biológico; el cual, mediante la aplicación de otras biotecnologías podrá incrementar la variabilidad genética de esas poblaciones (Pukazhenthí y col., 2006; Díaz y Ojeda, 2000; Díaz y Ojeda, 2012; Buranaamnuay, 2017; Ponglowhapan, 2018). Si bien la criopreservación seminal involucra diferentes métodos, como la refrigeración, vitrificación y congelación, esta última ha sido utilizada con éxito en felinos domésticos (Tebet y col., 2006; Cocchia y col., 2010; Buranaamnuay, K, 2017). Durante el proceso de congelación, varios factores y diferentes tipos de estrés actúan sobre los espermatozoides pudiendo producir daño celular. Entre ellos el estrés térmico, provocado por los descensos rápidos de temperatura ocasionan daños en la célula espermática (shock de frío) y el estrés osmótico y tóxico relacionado con la velocidad de enfriamiento son factores determinantes en el compromiso de la viabilidad espermática. La velocidad de enfriamiento es crucial en el proceso de congelación. Si el descenso de

temperatura en muy rápido, el volumen de agua intracelular que fluye hacia el exterior no es suficiente quedando dentro de la célula una cantidad superior a la óptima, con la consecuente formación de cristales de hielo en el citoplasma y la posterior ruptura de las membranas celulares (efecto de cristalización; Watson, 1995; Yeste 2016; Muñoz Sarmiento, 2021). Si el descenso de temperatura es muy lento, ocurre una deshidratación celular extrema y los solutos intracelulares se concentran en forma excesiva antes de alcanzar la temperatura de congelación de la solución (efecto de solución; Gao y col., 1995; Watson y Duncan, 1988, Yeste, 2016). Durante el proceso de congelación pueden ocurrir efectos deletéreos sobre las membranas, el citoesqueleto, el aparato motor y núcleo del espermatozoide; los cuales pueden afectar la fertilidad debido a alteraciones en la capacitación espermática e integridad del ADN (Kasai y col, 2002; Naresh, 2016; Yeste, 2016; Valencia y col., 2019; Muñoz-Sarmiento, 2021). Para minimizar las lesiones criogénicas se utilizan compuestos denominados crioprotectores que, al ser agregados a los diluyentes del semen en concentraciones adecuadas, permiten que los espermatozoides sobrevivan y conserven la fertilidad pos descongelación. Uno de los más utilizados es el glicerol (Villaverde y col., 2013a; Yeste 2016). Sin embargo, concentraciones muy altas de glicerol causan daño osmótico y efectos tóxicos en los espermatozoides, lo que lleva a la rotura de la membrana plasmática y acrosomal entre otros daños (Villaverde y col., 2013a).

Se ha comprobado en diferentes especies (bovinos, ovinos, equinos, cerdos, felinos, caninos y en el hombre) que los procesos de congelación y descongelación seminal producen alteraciones en la célula espermática que reducen la viabilidad de la población espermática inicial, provocando una disminución de la fertilidad al descongelado (Hammerstedt y col., 1900; Mazur y col., 1970; Dhani y col., 1992; Parks y Lynch, 1992; Chen y col., 1993; Watson, 1995, 2000; England y Ponzio, 1996; O'connell y col., 2002;

Bailey y Morrier, 2003; Stornelli MC y col., 2005). En felinos, Thiangtum y col., (2009) evidenciaron una disminución significativa en la motilidad, viabilidad e integridad acrosómica luego de la criopreservación de semen recolectado mediante vagina artificial. Con este mismo método de recolección, Villaverde y col., (2013) evaluaron el efecto crioprotector de tres concentraciones de glicerol (3%, 5% y 7%). En todos los grupos, el semen descongelado registró una reducción en los parámetros seminales relacionados con la motilidad e integridad de membranas plasmática y acrosomal en comparación con el semen fresco. Si bien concentraciones de glicerol de 5% y 7% mostraron un efecto beneficioso sobre la motilidad y la velocidad de los espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas reaccionados aumentó en relación directa a la concentración de glicerol, mientras que la integridad de membrana y la integridad del ADN no se vieron modificadas con la concentración de glicerol. Estos autores sugieren que el glicerol produce un efecto beneficioso dosis-dependiente sobre la motilidad del semen felino hasta concentraciones del 4-5%, observándose efectos deletéreos con concentraciones superiores al 7%. Prochowska y col. (2016), comunicaron que las muestras de semen felino obtenidas mediante cateterismo uretral y recuperación espermática epididimal respondieron de manera similar al proceso de criopreservación.

El plasma seminal está compuesto por diferentes componentes bioquímicos, entre ellos proteínas, iones, sustancias orgánicas de bajo peso molecular, como aminoácidos libres, monosacáridos, lípidos, poliamidas (Johnston y col., 2001; Katila y Kareskoski, 2006). La importancia en la relación de los componentes del plasma seminal con la calidad de semen y la resistencia de los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación no ha sido completamente estudiada en el hombre y los animales de producción, mientras que, en el gato doméstico, según nuestro conocimiento no hay estudios al respecto. Un estudio reciente en bovinos demostró que determinados

metabolitos del plasma seminal (aminoácidos, péptidos, lípidos) difieren entre toros de alta y baja fertilidad, así como también la composición del plasma seminal antes y después de la criopreservación. En toros con alta fertilidad, el perfil lipídico del plasma seminal presentó mayores concentraciones de L-acetilcarnitina, tripropanoato de glicerol, estearato de 2,3-diacetoxipropilo y triacilglicéridos, y una reducción de lisofosfatidilcolina y butirilcarnitina en comparación con toros de baja fertilidad. A su vez, cuando se comparó el plasma seminal fresco con el plasma seminal congelado-descongelado se observó que las lisofosfatidilcolinas se encontraban en mayor cantidad en el plasma seminal congelado-descongelado. Las lisofosfatidilcolinas son lisofosfolípidos que inducen la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosómica al aumentar las concentraciones calcio. Este hecho podría explicar los cambios similares a la capacitación observado después de la criopreservación. (Longobardi y col., 2020). Ese mismo año, Ugur y col., (2020) observaron que determinados aminoácidos del plasma seminal están relacionados con la congelabilidad de los espermatozoides. El grupo de toros que presentaban buena congelabilidad seminal tenían mayor proporción de fenilalanina comparados con el grupo de baja congelabilidad de semen. Este aminoácido podría tener un efecto antioxidante y su aumento en el plasma seminal podría reducir el daño del ADN causado por el estrés oxidativo. Es así que podría considerarse un marcador de congelabilidad y usarse como un suplemento crioprotector.

Asimismo, se ha observado que ciertas proteínas del plasma seminal de carneros, bovinos, búfalos y equinos actúan como marcadores de fertilidad y/o como indicadores de resistencia a la congelación por lo que se proponen como una herramienta de selección de los reproductores (Barrios y col., 2000; Moura y col., 2010; Jobim y col., 2004; Rego y col., 2016; Asadpour y col., 2007; Trein y col., 2008; Jobim, y col., 2011; Usuga Suárez, 2017). En cerdos se identificó a la fibronectina 1 como marcador de congelabilidad para

los eyaculados; dicha proteína se encontró en mayor cantidad en los eyaculados con buena capacidad de congelación comparados con los eyaculados de mala capacidad de congelación. Por el contrario, la actividad enzimática al descongelado de la proteína β -HEX (N-acetil- β -hexosaminidasa), se correlacionó negativamente con la viabilidad, la motilidad y la peroxidación de lípidos de los espermatozoides. Por esta razón, el nivel más alto de actividad de esta enzima en el plasma seminal se relacionó con una baja resistencia a la congelación (Yeste, 2016). En carneros se han estudiado los efectos de la exposición de los espermatozoides con proteínas del PS antes de la congelación sobre los parámetros espermáticos posteriores a la descongelación, observándose una mejora de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Leahy y col, 2010; Leahy y De Graaf, 2012). Asimismo, en equinos se informó que los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados expuestos a PS mostraron mejoras en la motilidad y en la morfología (Stout y col., 2000; Heise y col, 2011). En esta misma especie, un estudio reciente expuso a los espermatozoides del epidídimo con PS antes de la congelación, observándose una mayor viabilidad de los espermatozoides y menor daño del acrosoma después de la descongelación en la mitad de los animales evaluados, mientras que todos mostraron una disminución de la generación espermática de especies reactivas de oxígeno. Esta diferencia entre animales podría deberse a la composición del PS (Vieira y col., 2021). Los valores más altos de las concentraciones de proteínas estaban presentes en las muestras de PS que mejoraron la calidad de los espermatozoides congelados-descongelados del epidídimo, además de tener una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), capacidad antioxidante, y algunas proteínas como la proteína 3 rica en cisteína (CRISP-3) que podría usarse como indicadoras de resistencia a la congelación (Vieira y col., 2021). Investigaciones anteriores relacionaron el alto nivel de

CRISP-3 en plasma seminal de animales con buena capacidad de congelación y calidad de semen (Usuga y col., 2018; Restrepo y col., 2019).

Es así que, la presencia de ciertos componentes del plasma seminal, pueden influir en la resistencia de los espermatozoides al daño ocurrido en el proceso de congelación-descongelación.

En el gato doméstico aún no se han realizado estudios que relacionen las características bioquímicas del plasma seminal con la capacidad de resistencia espermática a los procesos de congelación. Dicha información resultaría interesante para la selección de reproductores felinos, así como para el desarrollo de diluyentes de congelación que permitan mejor calidad seminal al descongelado y su aplicación en felinos silvestres en riesgo de extinción.

OBJETIVO

- Determinar si las características bioquímicas del plasma seminal influyen sobre la supervivencia espermática del semen congelado.

HIPOTESIS

- Determinadas características bioquímicas del plasma seminal mejoran la supervivencia espermática del semen congelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se utilizaron siete *animales*, los cuales fueron mantenidos en las condiciones descritas en el capítulo II.

La *recolección y evaluación de semen* se realizó como se describió en el capítulo II.

Criopreservación seminal.

Para realizar la congelación de semen de los felinos experimentales se utilizó un diluyente (DIL) Tris Base (TB, Tris 2,4 g; ácido cítrico 1,4 g; fructosa 0,6; glicerol 4 g; yema de huevo 20% v/v; penicilina sódica 0,06 g; sulfato de estreptomicina 0,1 g; agua destilada csp 100ml; Zambelli 2002, Bonaura, 2016). Un eyaculado de cada gato se mezcló con un volumen calculado del DIL para obtener una concentración final de 25×10^6 espermatozoides/ml. El semen se mezcló con el diluyente a 37°C en baño térmico volcando el diluyente por las paredes del tubo que contenía el semen y se homogeneizó suavemente (Figura 4.1). Posteriormente se inició el descenso gradual de la temperatura; se colocó el tubo en la mesada del laboratorio durante 10 minutos para que alcance temperatura ambiente. A continuación, se realizó el proceso de refrigeración en la heladera. Durante esta fase, el tubo se colocó en la parte superior de la misma durante 5 minutos para alcanzar los 15°C, luego se colocó en una cubeta con agua (previamente refrigerada) durante 5 minutos para lograr el descenso hasta los 4°C (Figura 4.2).

Una vez alcanzados los 4°C, el semen diluido se mantuvo a esta temperatura durante 20 minutos a fin de permitir la adaptación espermática a los cambios osmóticos

(estabilización). Transcurrido ese tiempo, el semen diluido se envasó a 4°C en pajuelas de 0,25 ml de forma manual utilizando una pipeta Pasteur. Posteriormente las pajuelas se sellaron con alcohol polivinílico. Previo al envasado las pajuelas se rotularon con la fecha de la toma de muestra y un símbolo definido para cada gato. Para la congelación sobre vapores de nitrógeno líquido se utilizó una caja de poliuretano expandido de aproximadamente 30 cm de largo x 24 cm de ancho x 25 cm de altura. Las pajuelas se depositaron sobre una gradilla a 5 cm del nivel del nitrógeno líquido durante 10 minutos (tasa de congelación: 11° C/min de 4 a -5 °C; 3,5° C/min de -5° C a -15° C y 12° C/min de -15° C a -100° C; Figura 4.3). Una vez transcurrido ese tiempo, se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196°C) y luego se almacenaron en el termo banco (Silva Balbín y col., 2009; Figura 4.4). En el termo banco, las pajuelas se colocaron en gobelets, contenidos en un rack metálico, los cuales a su vez se almacenaron en canastillos perforados en su base para que penetre el nitrógeno líquido. Los datos correspondientes a la muestra congelada se volcaron en una planilla (identificación del eyaculado del gato, fecha, nomenclatura de la pajuela, número de canastillo, identificación del rack).

La descongelación del semen se realizó extrayendo cada pajuela del termo de nitrógeno líquido y sumergiéndola en baño térmico a 37°C durante 1 minuto (Stornelli MA, 2004; Bonaura, 2016). Luego se cortaron los extremos de la pajuela, el semen se depositó dentro de un tubo tipo Eppendorf y se mantuvo en el baño térmico durante 10 minutos a 37°C previo a la evaluación seminal pos-descongelación (Figura 4.5). El semen congelado-descongelado se sometió a las mismas pruebas de contrastación microscópica que el semen fresco.

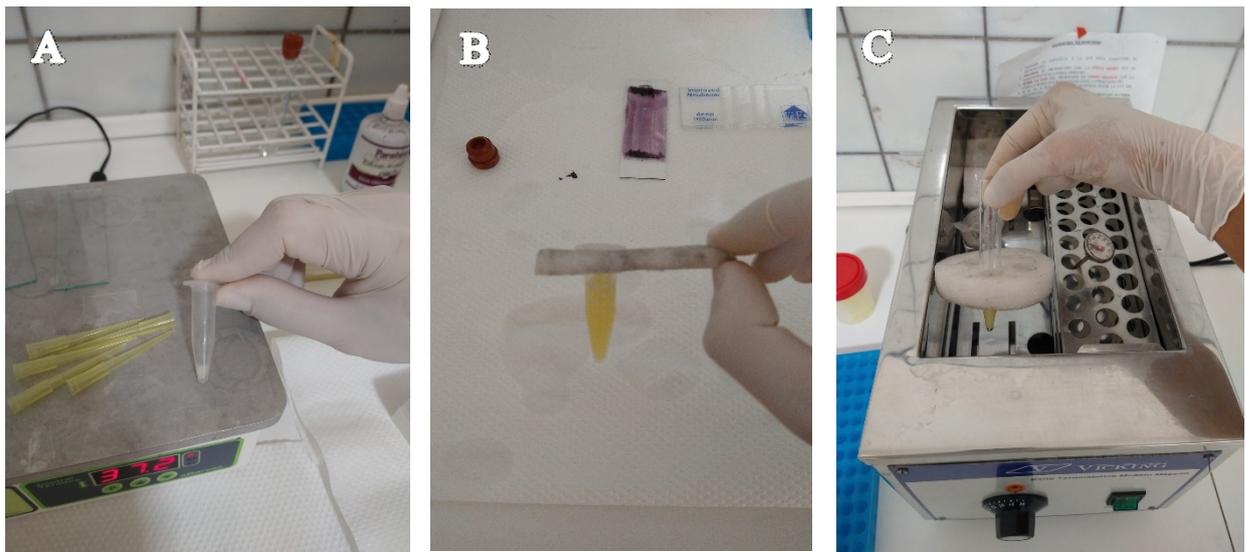


Figura 4.1. Dilución del semen. A: Eyaculado de gato. B: Diluyente base Tris yema de huevo. C: El semen se mezcla con el diluyente a una temperatura de 37° en baño térmico.

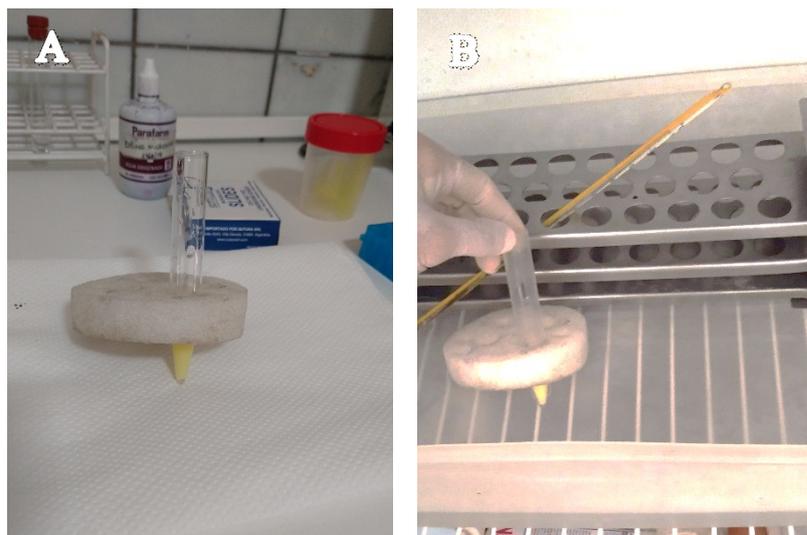


Figura 4.2. Descenso de temperatura. A: Descenso a temperatura ambiente. B: Refrigeración en agua a 4° C.

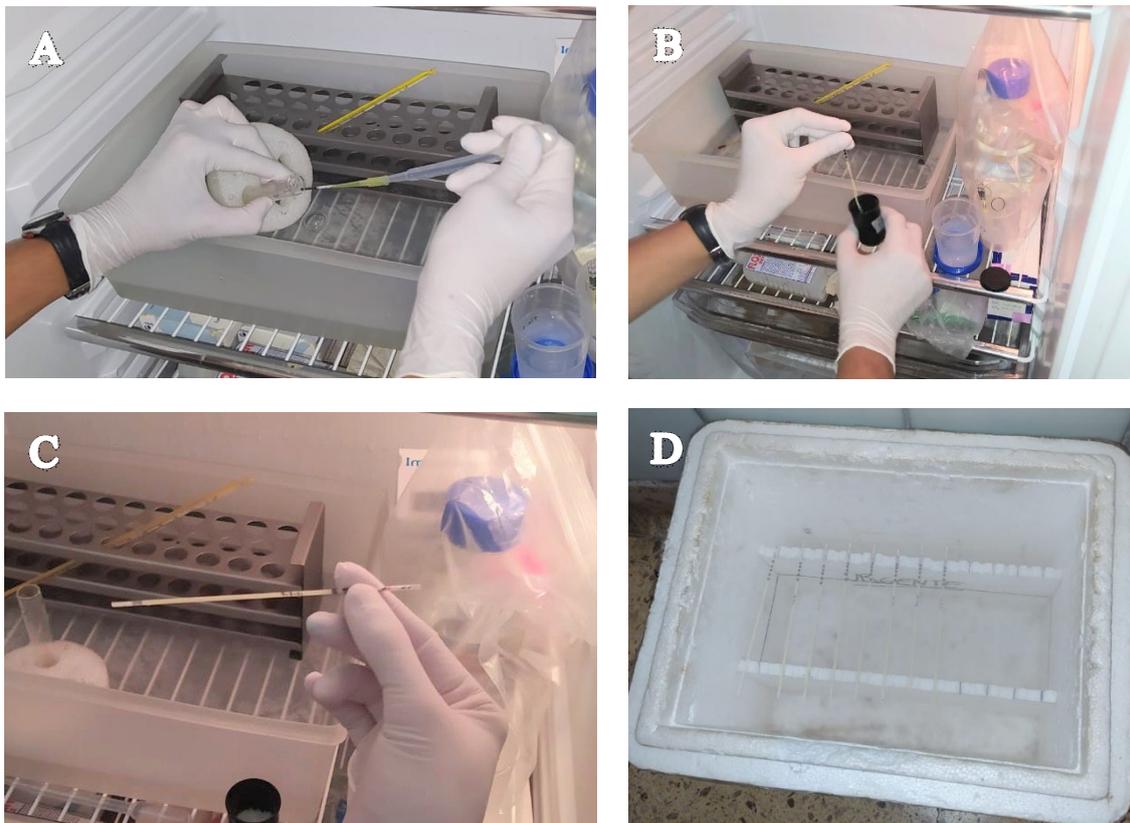


Figura 4.3 Envasado y congelación. A: Envasado utilizando pipeta Pasteur plástica. B: Sellado de la pajueta. C: Finalización del proceso de empaquetado, la pajueta se encuentra lista para ser congelada. D: Congelación sobre los vapores de nitrógeno líquido.

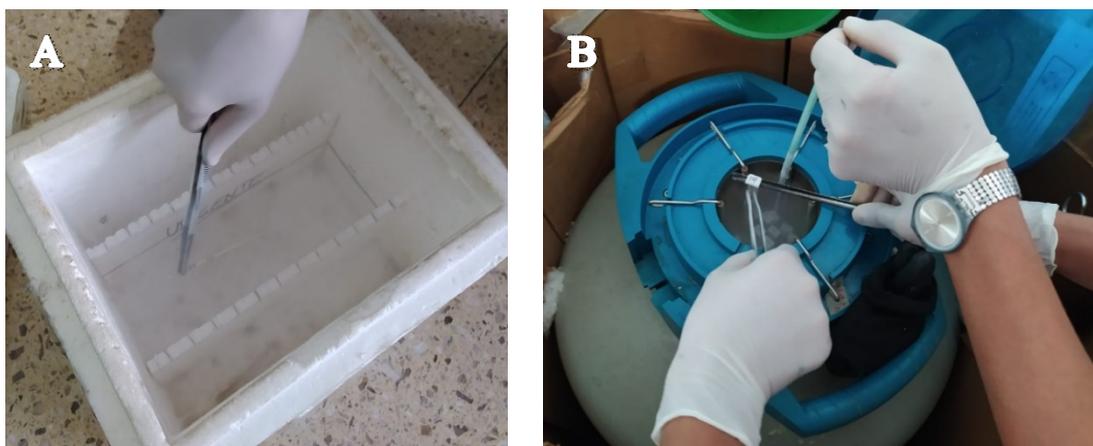


Figura 4.4. Almacenamiento del semen. A: Las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido. B: almacenamiento en el termo de nitrógeno líquido.

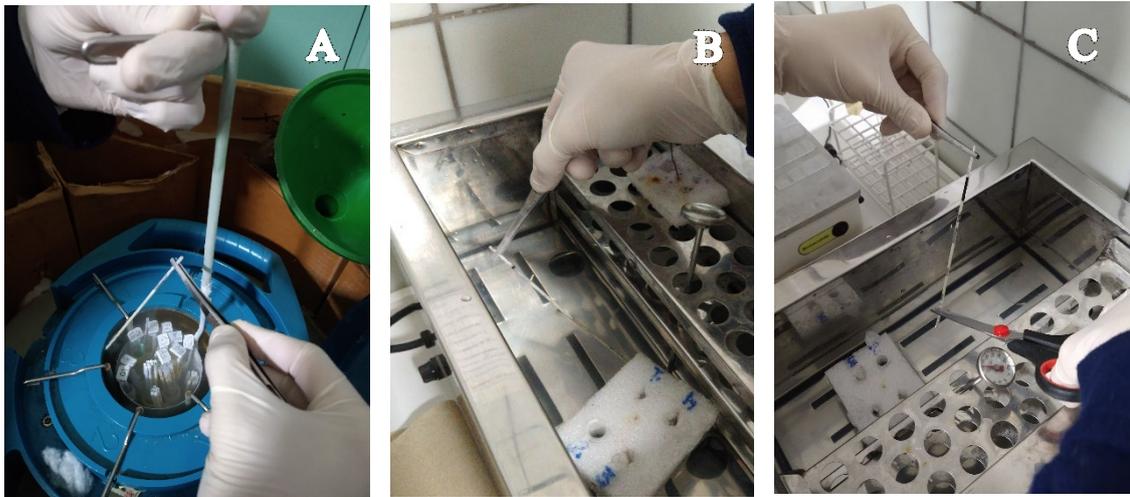


Figura 4.5. Descongelado. A: Se selecciona la pajuela a descongelar B: Se colocan en baño térmico a 37°C durante 1 minuto. C: Se cortan los extremos de la pajuela para depositar el semen dentro del tubo tipo Eppendorf.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos correspondientes a los parámetros seminales fueron analizados mediante ANOVA con PROC GLM de SAS® (9.4). Las variables concentración espermática y cantidad de espermatozoides totales fueron transformadas para su análisis respondiendo a una distribución Poisson. Se estimaron las correlaciones de Spearman entre todas las variables con PROC CORR de SAS 9.4). Los resultados se presentan como Diferencia de cuadrados medios mínimos (Least Square Means, LSM) \pm SEM (error estándar de la media). En todos los casos un valor de $P \leq 0,05$ fue considerado significativo, mientras que valores de $P > 0,05$ y $< 0,1$ se consideraron tendencia.

MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES

Este experimento se realizó siguiendo las mismas pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio detalladas en el capítulo II.

RESULTADOS

En este experimento, se congelaron en total 38 eyaculados de BCS (MI $81,58 \pm 1,32$; VI $4,46 \pm 0,10$; ET $28,92 \pm 3,76$; CE $257,89 \pm 14,97$; PV $77,43 \pm 1,46$; AI $76,13 \pm 1,38$, ME $63,29 \pm 2$; volumen $124,87 \pm 7,60$).

La comparación entre los eyaculados frescos y descongelados evidenció que la MI, VI, PV y AI fueron mayores en los eyaculados frescos comparado con los eyaculados descongelados ($P \leq 0,05$; Tabla 4.1).

En la Tabla 4.2 se muestran las correlaciones entre los índices de congelabilidad ([características espermáticas al descongelado/ características del semen fresco] x 100) de los parámetros seminales y la bioquímica del PS (C, TAG). Se encontraron correlaciones significativas y positivas entre el IC MI y C, el IC MI y TAG ($P < 0,0001$); el IC AI y C y el IC AI y TAG ($P < 0,0001$).

No se observaron correlaciones significativas entre el IC ME, el IC VI y el IC PV con C y TAG.

A fin de poder observar diferencias en la morfología espermática de eyaculados teratospérmicos y normospérmicos, se decidió dividirlos en 2 grupos bien definidos. Del total de eyaculados ($n=38$), 12 correspondían a eyaculados de animales teratospérmicos (7 de los cuales tenían menos del 50 % de espermatozoides normales y 5 eyaculados, entre 50 y 59 % de espermatozoides morfológicamente normales) y 26 eyaculados fueron

considerados normospermicos por tener mayor del 60 % de espermatozoides normales. Al comparar los IC de motilidad individual, porcentaje de vivos y acrosomas intactos entre eyaculados teratospermicos y nosmospermicos no se observaron diferencias significativas (Tabla 4.3).

Tabla 4.1. Parámetros seminales de eyaculados frescos y congelados- descongelados.

Eyaculados/ Parámetros seminales	Eyaculados Frescos	Eyaculados Descongelados	IC
Motilidad individual (%)	81,58± 1,32 ^a	44,69± 1,41 ^b	54,88
Vigor (0-5)	4,46± 0,10 ^a	2,95± 0,03 ^b	67,33
Vivos (%)	77,43± 1,46 ^a	46,04± 1,28 ^b	60,84
Acrosomas intactos (%)	76,13± 1,38 ^a	41,89± 1,37 ^b	53,44

IC: índice de congelabilidad. Los valores se expresan como diferencia de cuadrados medios mínimos± error estándar (LSM±SE). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tabla 4.2. Correlaciones simples entre la concentración de C y TAG del plasma seminal y los índices de congelabilidad seminal.

	C	IC IA	IC ME	IC MI	IC VI	IC PV	TAG
C	1,00	0,19	0,99	0,16	0,002	0,99	
	<,0001	0,51	<,0001	0,58	0,99	<,0001	
IC IA		0,18	0,51	-0,08	0,60	1,00	
		0,38	0,009	0,69	0,001	<,0001	
IC ME			0,11	-0,03	-0,18	0,18	
			0,48	0,82	0,26	0,55	
IC MI				-0,16	0,30	0,98	
				0,32	0,06	<,0001	
IC VI					-0,13	0,09	
					0,41	0,76	
IC PV						0,04	
						0,87	
TAG							

C: Colesterol, TAG: Triacilglicéridos, IC IA: índice de congelabilidad de acrosomas intactos, IC ME: índice de congelabilidad de morfología espermática, IC MI: índice de congelabilidad de motilidad, IC VI: índice de congelabilidad de vigor, IC PV: índice de congelabilidad de vivos

Tabla 4.3. Índices de congelabilidad de los parámetros seminales entre los eyaculados teratospérmicos y normospérmicos

Eyaculados	IC MI	IC PV	IC AI	IC ME
< 50% EN (n=7)	57,57 ±2,49	62,66 ±3,03	58,71 ±1,40	96,68 ±0,83
entre 50 y 59% EN (n=5)	58,62 ±3,92	59,23 ±2,77	55,20 ±5,67	94,89 ±1,53
> 60% EN (n=26)	55,47 ±2,06	60,10 ±1,44	52,85 ±5,11	95,78 ±0,50

IC MI: índice de congelabilidad de motilidad individual, IC PV: índice de congelabilidad de espermatozoides vivos, IC IA: índice de congelabilidad de acrosomas intactos, IC ME: índice de congelabilidad de morfología espermática, EN: espermatozoides normales.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la composición del plasma seminal está relacionada con la supervivencia espermática al descongelado.

Durante el proceso de congelación y descongelación se producen alteraciones en la célula que afectan la viabilidad y supervivencia causando disminución de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco. Dentro de los factores involucrados en el proceso de congelación y descongelación que producen estrés sobre las células pueden mencionarse: el cambio de temperatura, el estrés osmótico y tóxico de los crioprotectores y, la formación y disolución de cristales de hielo en el ambiente extracelular (Watson 2000). Se ha estimado en varias especies animales que entre el 40 y 50% de la población espermática no sobrevive a la criopreservación, incluso con protocolos optimizados, debido a modificaciones estructurales en las membranas, aumento de la permeabilidad, y modificaciones en el citoesqueleto (Watson 2000). Nuestros resultados en felinos concuerdan con los estudios realizados por Watson (2000), registramos una pérdida de viabilidad al descongelado de alrededor del 40%, mientras

que las pérdidas en la motilidad individual alcanzaron el 45% y las relacionadas con la integridad del acrosoma fueron alrededor del 47%.

Asimismo, Bailey y Morrier (2003) comunicaron que en mamíferos como ovinos, bovinos y cerdos, una proporción considerable de espermatozoides sufre alteraciones que reducen su fertilidad durante el proceso de congelación-descongelación. Si bien, en el presente estudio, no hemos estudiado la fertilidad del semen felino congelado-descongelado, nuestros resultados muestran una reducción significativa de parámetros seminales como motilidad e integridad acrosómica en el semen descongelado en comparación con el semen fresco, lo cual estaría relacionado con disminución de la fertilidad. Así mismo, Neild y col., (2003) en equinos observaron daños en las membranas espermáticas y una disminución en la motilidad individual en todas las muestras de semen después de la descongelación. Las observaciones realizadas en este estudio concuerdan con lo descrito por dichos autores ya que evidenciamos una disminución de la motilidad individual e integridad acrosómica al someter las muestras al proceso de congelación-descongelación.

Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Es así como, ciertos parámetros seminales como motilidad, viabilidad y el estado del acrosoma son cruciales para que un espermatozoide atraviese la zona pelucida y fertilice un ovocito (Watson, 1995). La motilidad, es uno de los parámetros más afectados por la congelación y podría estar relacionada con una disminución en la función mitocondrial (Watson, 1995; Kao y col, 1998). Es así como en humanos se observó una significativa reducción en la motilidad, la morfología espermática y en la función mitocondrial de los espermatozoides luego de la congelación-descongelación (O'connell y col, 2002). Asimismo, en caninos England y Ponzio observaron en semen congelado-descongelado una reducción en la

motilidad, integridad de la membrana espermática y longevidad, así como aumento de alteración espermáticas en comparación con eyaculados frescos (England y Ponzio, 1996). Nuestros hallazgos en gatos concuerdan con estos trabajos; ya que observamos reducción significativa de la motilidad al comparar el semen fresco con el congelado-descongelado. Sin embargo, no encontramos asociación entre morfología espermática y congelabilidad. En felinos, Thiangtum y col. (2009), evidenciaron que tanto la motilidad, la viabilidad y la integridad acrosómica disminuyeron significativamente con la criopreservación seminal. De forma similar, Terrell y col. (2012) observaron una reducción significativa de la motilidad y la integridad acrosómica después de la congelación-descongelación de eyaculados de gatos domésticos recolectados mediante electroeyaculación. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en nuestro estudio donde se evidenció una significativa reducción en la motilidad, el vigor, la viabilidad espermática, y la integridad acrosómica al descongelado. Villaverde y col. (2013), en su estudio registraron una reducción en los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, vigor, integridad de membrana plasmática y acrosomal luego de la descongelación. Asimismo, observaron mejor motilidad espermática al descongelado utilizando concentraciones de glicerol de 5% comparado con 3 o 7%. Similares resultados fueron obtenidos previamente con el uso de 4% de glicerol (Villaverde y col., 2009). En nuestro trabajo observamos resultados semejantes mediante la utilización de diluyente Tris base yema de huevo con concentraciones de glicerol del 4%. Recientemente Prochowska y col. (2016), evidenciaron una disminución significativa en la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma después de la descongelación de eyaculados recolectados mediante cateterismo uretral y en espermatozoides recuperados de epidídimo. Si bien estos autores utilizan otros métodos de recolección de espermatozoides, nuestros resultados concuerdan con los de este grupo de investigación.

Además, en concordancia con nuestros hallazgos, los mencionados autores, no observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales al descongelado. Asimismo, en humanos se ha observado que eyaculados con elevada proporción de espermatozoides morfológicamente anormales (teratospermicos) presentaron una mayor cantidad de espermatozoides con daño en el ADN al descongelado en comparación con muestras de semen normospermico. Esto indicaría una mayor susceptibilidad de los espermatozoides morfológicamente anormales al daño criogénico; posiblemente debido a la formación de radicales libres de oxígeno (ROS), que causan daño a la cromatina (Kalthur y col., 2008). En el gato doméstico, si bien se ha comunicado la presencia de gran variabilidad en el tipo y porcentaje de anomalías en el semen fresco, existen pocos datos de su influencia sobre la congelabilidad seminal.

Algunos estudios han comunicado que los espermatozoides de machos teratospermicos son más susceptibles al frío y estrés osmótico que aquellos provenientes de machos normospermicos. Registrándose en eyaculados teratospermicos altos porcentajes de rupturas de membranas, motilidad reducida y bajos porcentajes de acrosomas intactos al descongelado en comparación con los normospermicos (Pukazhenthí y col., 1999; 2000). Estas observaciones sugieren que podría haber diferencias en la conformación de las membranas entre los espermatozoides provenientes de machos normospermicos y teratospermicos, hecho que influiría en la cinética del agua y el movimiento de solutos a través de las membranas (Luvoni y col., 2003). En nuestro trabajo, observamos una disminución de la motilidad e integridad de membranas acrosomales al descongelado, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el IC de la MI, PV, AI y ME al comparar eyaculados teratospermicos y normospermicos. Este hecho podría relacionarse con que, en los mencionados estudios, a

diferencia de nuestro trabajo, no se utilizó el IC. Así mismo, nuestros resultados concuerdan en parte con los estudios de Luvoni quien informó que los espermatozoides criopreservados sufren graves daños espermáticos que alteran su motilidad y morfología, afectando así su potencial fertilizante (Luvoni y col., 2003).

Debido a que los procesos de criopreservación también alteran el metabolismo celular (Terrell y col., 2012), se ha sugerido que el contenido de lípidos de las membranas espermáticas podría estar relacionado con la capacidad de tolerancia a los procesos de criopreservación (Maldjian y col., 2005; Waterhouse y col., 2006).

Si bien se han realizado varios estudios sobre congelación de semen felino, según nuestro conocimiento la relación de los componentes bioquímicos del plasma seminal con la calidad de semen y la tolerancia a los procesos de criopreservación espermática aún han sido objeto de estudio. En humanos Martínez-Soto y col. (2012), observaron una correlación significativa entre la composición de ácidos grasos del plasma seminal y los parámetros seminales al descongelado. Sus registros mostraron que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el ácido docosahexaenoico (DHA) se correlacionaron con la movilidad y viabilidad de los espermatozoides al descongelado. En concordancia con estos hallazgos, nuestro estudio muestra una correlación significativa y positiva entre la motilidad al descongelado y la concentración de TAG en el plasma seminal.

Thérien y col. (1999), en un estudio *in vitro* con espermatozoides bovinos, demostraron que las principales proteínas del PS bovino (BSP) causan un eflujo de colesterol de la membrana espermática acelerando la capacitación. En este proceso, el PS juega un papel importante en la prevención de la capacitación espermática suministrando colesterol adicional a la membrana plasmática (Davis, 1978; Benoff, 1993; Cross, 1996; Maxwell y Johnson, 1999). Esta función del colesterol externo ha sido utilizada para minimizar los daños producidos durante el proceso de congelación y descongelación.

Algunos estudios realizados *in vitro* con semen bovino y equino mostraron una mejora en el porcentaje de espermatozoides móviles y con membranas intactas al descongelado al adicionar ciclodextrinas cargadas con colesterol a las membranas espermáticas (Purdy y Graham, 2004; Amorim y col., 2009; Moore y col., 2005 y Mesa y col., 2012). Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados en los cuales los eyaculados con mayor concentración de C en PS poseen mayores índices de congelabilidad. Asimismo, evidenciamos una correlación significativa y positiva entre la concentración de C y los índices de congelabilidad seminal.

En conclusión, nuestro estudio confirma las hipótesis propuestas. Los eyaculados con mayor concentración de C y TAG soportaron mejor la congelación, es decir las características bioquímicas del plasma seminal (C, TAG) influyeron sobre la supervivencia espermática del semen congelado. Asimismo, la supervivencia al descongelado de muestras seminales con una proporción de anomalías espermáticas entre 35 y 40 %, no se vio afectada.

Cómo se mencionó en el capítulo II, las concentraciones de C y TAG del plasma seminal fueron significativamente mayores en el grupo BCS en comparación con el grupo MCS. A su vez, en el capítulo III, el PS del grupo BCS presentó una banda proteica extra de 14,4 kDa. Es así como este trabajo de tesis demuestra la relación existente entre los componentes del plasma seminal con la calidad de semen y con la resistencia de los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación.

CAPITULO V

EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL DEL GATO Y EL FACTOR INDUCTOR DE OVULACION PURIFICADO DE LLAMAS (β -NGF) SOBRE LA FUNCIÓN OVARICA EN GATAS DOMÉSTICAS

INTRODUCCIÓN

En los gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) que habitan en zonas templadas, la ciclicidad ovárica y la calidad del semen están relacionadas con cambios en el fotoperiodo (Stornelli MA y col., 2009; Petersen, 2015). De esta forma, las gatas muestran actividad ovárica, comportamiento estral y receptividad durante los días largos de primavera y verano (época reproductiva); mientras que la inactividad ovárica (anestro) está presente durante los días cortos de otoño e invierno. La hembra felina posee ovulación inducida por el coito, la estimulación vaginal desencadena la liberación hipotalámica de GnRH, la cual provoca una liberación pulsátil de las gonadotrofinas hipofisarias especialmente de la hormona luteinizante (LH; Greulich, 1934; Malandain y col., 2011). El grado de desarrollo folicular y el número de apareamientos están relacionados con el aumento de LH lo suficientemente alto como para desencadenar la ovulación. Se necesitan de dos a tres estímulos coitales en 30 minutos ó, cuatro en 80 minutos, para inducir una onda de LH de suficiente intensidad para que ocurra la ovulación, la cual se producirá 23 a 32 horas posteriores al pico de LH (Petersen, 2015; Glover y col., 1985; Kauffman y Rissman, 2006). Sin embargo, un solo apareamiento podría ser suficiente para desencadenar la ovulación cuando la concentración de estradiol fuera marcadamente alta (Glover y col., 1985; Tsutsui y col., 2009). Se ha observado ovulación espontánea en el 35% de las hembras confinadas con machos, aún sin contacto físico ni visual, debido

al efecto de las feromonas como en otras especies (Brown, 2006; Fontbonne y col., 2016; Binder y col., 2019).

Si ocurre ovulación, pero los ovocitos no son fertilizados o hay fallas en la concepción, los folículos se luteinizan y se forman cuerpos lúteos funcionales productores de progesterona. A partir de este momento, la progesterona plasmática aumenta progresivamente hasta alcanzar sus niveles máximos entre los días 16 a 23 después de la ovulación, declinando paulatinamente hasta alcanzar valores basales entre los días 30 y 46 (Kauffman y Rissman, 2006; Siemieniuch y col., 2012; Zschockelt y col., 2014; Jewgenow y col., 2012). Estos niveles de progesterona elevados alargan el periodo de interestro (periodo entre un celo y la aparición del siguiente celo durante la temporada reproductiva) de forma similar a lo que ocurre durante la gestación, por lo cual se lo denomina pseudogestación. No obstante, el intervalo hasta la aparición del siguiente estro es muy variable. Se han informado intervalos entre 32 y 56 días (Siemieniuch y col., 2012), 60 días (Verhage y col., 1976), y entre 30 y 44 días con un extremo de 73 días en una gata (Paape y col., 1975). La inducción de los ciclos estrales se puede realizar de forma medicamentosa, mediante la utilización de gonadotrofina exógena (gonadotrofina coriónica equina, eCG) ó, colocando a las hembras bajo un fotoperiodo artificial de días largos usando lámparas led o incandescentes (Gimenez y col., 2009; Graham y col., 2000). Una vez inducidos los ciclos estrales, si se desea realizar la aplicación de alguna biotecnología reproductiva como inseminación artificial, fertilización in vitro o transferencia de embriones, es necesario inducir la ovulación. En este caso, el tratamiento generalmente utilizado es la administración de hCG (gonadotrofina coriónica humana; Graham y col., 2000).

Al igual que el gato doméstico, las llamas (*Lama glama*) reproductivamente se clasifican como ovuladores inducidos por el coito. En esta última especie, el plasma

seminal cumple un papel fundamental para desencadenar la ovulación. Tal es así que la ovulación puede inducirse mediante la administración intramuscular del mismo (Tanco y col., 2011). Se observó el mismo efecto en alpacas, mediante la administración intramuscular e intrauterina del plasma seminal (Ratto y col., 2005). Este efecto del plasma seminal sobre la actividad ovárica se debe a unas moléculas presentes en el mismo denominadas en primera instancia factor inductor de la ovulación (OIF). Este componente del plasma seminal se ha encontrado en otras especies como alpacas (*Llama pacos*; Adams y col., 2005), koalas (*Phascolarctoscinereus*; Johnston y col., 2004) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*; Silva y col., 2011). Este OIF fue descrito también en especies con ovulación espontánea como bovinos, equinos, porcinos y ratones (Bogle y col., 2011; Ratto y col., 2006). Posteriormente pudo identificarse al OIF como una proteína del plasma seminal de camélidos, factor de crecimiento neuronal β (β -NGF), determinándose también en el plasma seminal de alpacas y conejos (Ratto y col., 2011;2012;Berland y col., 2016; Garcia-Garcia y col., 2018; Kershaw-Young y col., 2012). Estos estudios respaldan la hipótesis de que el OIF también podría estar presente en el plasma seminal de los gatos domésticos.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto del plasma seminal de gato y el OIF purificado de llama (β -NGF) para inducir la ovulación en las gatas.

HIPOTESIS

- El plasma seminal de gato tiene moléculas responsables de inducir la ovulación, y su efecto se puede lograr administrándolo de manera parenteral.
- El OIF purificado de llama (β -NGF) puede inducir la ovulación en la gata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se diseñó un estudio cruzado para evaluar el efecto de la administración parenteral de plasma seminal de gato y de OIF purificado de llama para inducir la ovulación en las gatas. Las gatas (n=6) fueron sometidas a cada uno de los siete tratamientos de forma aleatoria dejando entre tratamientos un intervalo de tres ciclos estrales. Cuarenta y ocho horas después de la detección del estro citológico (día 0), las gatas fueron asignadas a los siguientes tratamientos:

- 1) Plasma seminal de gato (0,25 ml sc; PSsc, n = 6);
- 2) Plasma seminal de gato (0,25 ml im; PSi, n = 6);
- 3) Factor inductor de la ovulación purificado de llama (15 μ g im; β NGF1, n = 6);
- 4) Factor inductor de la ovulación purificado de llama (35 μ g im; β NGF2, n = 5).
- 5) Gonadotrofina corionica humana (Ovusyn®, Syntex, Buenos Aires, Argentina, 75 UI im; hCG, n = 3);
- 6) Apareamiento con un gato vasectomizado (GV, n = 6);
- 7) Control (0,25 ml de solución salina estéril im; CON, (n = 6);

La dosis del plasma seminal de gato se estimó sobre el volumen de dos o tres eyaculaciones consecutivas, considerando que el volumen seminal disminuye en eyaculaciones sucesivas.

La dosis del factor inductor de la ovulación purificado de llama (β -NGF) se basó en la suposición de que el β -NGF estaría presente en el plasma seminal del gato en una proporción similar a la de los camélidos sudamericanos. En las alpacas, el β -NGF representa el 15-30% de las proteínas plasmáticas totales (Kershaw-Young y col., 2012),

mientras que en las llamas es de aproximadamente el 50% (Ratto y col., 2011). Cada eyaculado de gato contiene aproximadamente 40 mg/dL de proteínas seminales totales (García y col., 2020), asumiendo así que el 30% son β -NGF, cada eyaculado tendría alrededor de 12 μ g de β -NGF. Por lo tanto, β NGF1 (15 μ g) representa aproximadamente la dosis de un eyaculado y β -NGF2 (35 μ g) aproximadamente la dosis de tres eyaculados.

Animales

Hembras

Se utilizaron gatas (n=6), sexualmente maduras, sanas, de 1 a 4 años y con un peso de 2,5 a 3 kg. Las gatas estuvieron alojadas en un ambiente acondicionado (3,50 x 4,60 m) en jaulas individuales (0,75 x 1,50 x 2 m) con agua *ad-libitum* y alimento comercial para gatos (Balance[®]; Vitalcan, Buenos Aires, Argentina). Se mantuvieron en un ambiente controlado con 12 h de luz diarias (lámparas LED de 1400 lúmenes dando entre 150–300 lux a nivel del piso). Posteriormente, se obtuvieron citologías vaginales cada dos días para determinar la etapa del ciclo estral e identificar gatas con ovulaciones espontáneas. Sólo se incluyeron en el estudio las gatas con intervalo de interestro de 8-10 días en al menos tres ciclos estrales consecutivos.

Machos

Se utilizaron gatos (n=7), mestizos, sanos, de pelo corto, de 2 a 5 años, con un peso de 4,5 y 5 kg. Los animales fueron sometidos a un régimen de luz artificial, con ciclos lumínicos alternos cada 2 meses para mantener la calidad de semen e inhibir el efecto fotorrefractario (NuñezFavre y col., 2012). Para ello se utilizaron lámparas LED de 1400 lúmenes dando entre 150–300 lux a nivel del piso. Los animales estuvieron alojados, separados de las hembras, en un ambiente acondicionado (3,50 x 4,60 m) en jaulas

individuales (0,75 x 1,50 x 2 m) con agua *ad-libitum* y alimento comercial para gatos (control de pH, Vitalcan[®], Buenos Aires, Argentina).

Antes del comienzo del estudio, los gatos tuvieron un período de 4,5 meses (45 días de aclimatación + 1,5 ciclo de espermatogénesis y maduración) para familiarizarse con el nuevo ambiente, manejo y evidenciar el efecto lumínico sobre la producción de semen.

Se utilizaron seis machos para la recolección de semen y un macho fue vasectomizado para prevenir preñeces durante el tratamiento de apareamiento.

Una vez a la semana, se les realizó un examen físico a todos los animales para monitorear su salud. Además, se registró diariamente las características del comportamiento, la ingesta de alimentos y agua, y calidad de heces y orina.

Citología vaginal

A cada una de las gatas se le realizaron frotis vaginales en días alternos para determinar la etapa del ciclo estral a lo largo del experimento.

Para la recolección de las muestras se utilizaron hisopos de algodón de 3 mm de diámetro y 6 cm de largo. Previa a la toma de muestra el hisopo se humedeció con solución salina estéril, se introdujo en la vagina aproximadamente 0,5 cm rotando suavemente contra el suelo y las paredes laterales de la misma. Se realizó un frotis sobre portaobjetos, se dejó secar al aire y se tiñó con azul de metileno. Cada frotis se examinó con 100X y 400X, registrándose el tipo de células (parabasales, intermedias y superficiales). La etapa del ciclo estral se determinó de acuerdo con el porcentaje y el tipo de células presentes (Figura 5.1; Gimenez y col., 2009).

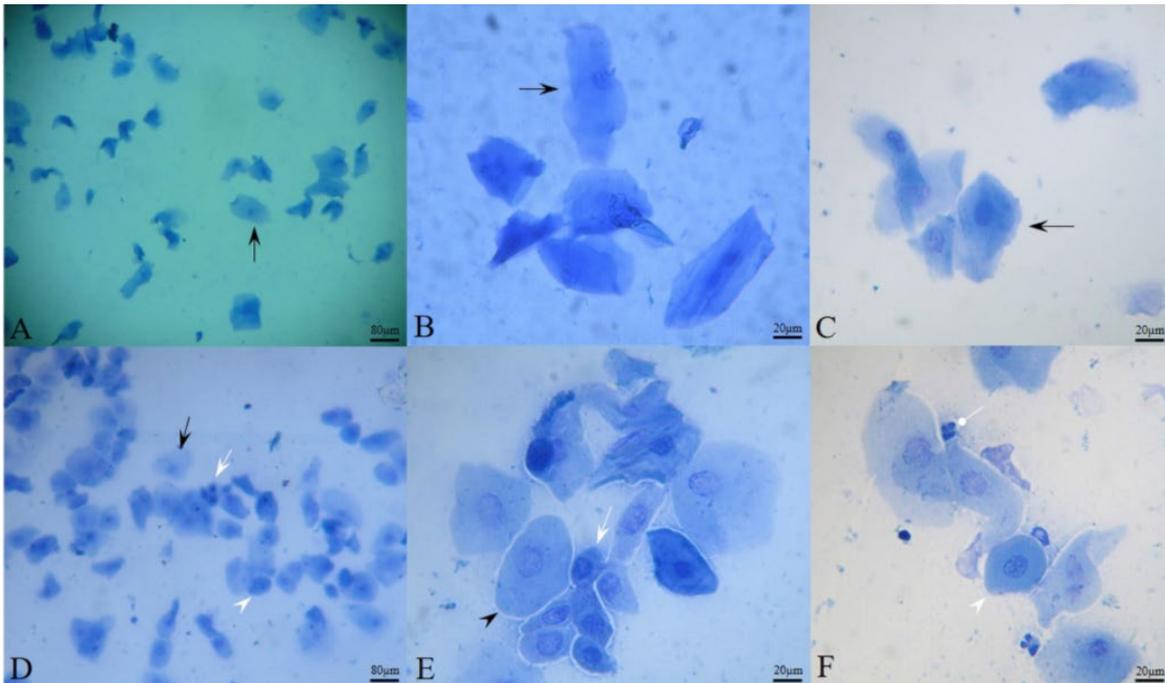


Figura 5.1 Imágenes microscópicas de frotis vaginales de gatas teñidos con azul de metileno. A-C: representan la etapa de estro; predominan las células epiteliales superficiales (flechas negras). D-F: representan la etapa de interestro; siempre están presentes células epiteliales intermedias grandes y pequeñas (puntas de flecha negra y blancas, respectivamente). Suelen encontrarse células epiteliales parabasales (flecha blanca) y células epiteliales superficiales. A menudo se observan polimorfonucleares neutrófilos (flecha blanca punta redonda). Columna izquierda 100X, columna central y derecha 400X.

Análisis hormonal

Se tomaron muestras de sangre 48 horas después de la detección del estro por citología vaginal, para medir la concentración sérica de estradiol (E_2) y confirmar el estro. La concentración sérica de progesterona (P_4) se midió el primer día del interestro citológico (IE1), luego el día 21 del interestro (IE21) y después cada 7 días hasta el siguiente estro citológico (es decir, IE28, IE35, IE42, IE49) para confirmar la actividad del cuerpo lúteo (CL). Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero se almacenó a -20°C hasta su uso. Las mediciones de E_2 y P_4 se realizaron mediante electroquimioluminiscencia (Estradiol III - Progesterona II Elecsys[®], Roche,

Alemania). Los coeficientes de variación intraensayo para el pool alto y pool bajo de P₄ fueron 2,65% y 5,59% (0,27 y 0,07 ng/ml, respectivamente); y los de E₂ fueron 10,11% y 3,70% (20 y 1 pg/mL) para el pool alto y bajo, respectivamente.

Toma de muestra de semen de gato

A cada uno de los gatos, se les realizó la recolección de semen cada cuatro semanas mediante la técnica de electroeyaculación descrita por Howard (Howard y col., 1990). Los gatos fueron anestesiados con una combinación de dexmedetomidina (10 µg / kg im; Dexdomitor[®], OrionPharma, Finlandia) y ketamina (5 mg/kg im; Ketamine 50[®], Holliday-Scott SA, Argentina). La muestra de semen se colocó en un tubo tipo Eppendorf precalentado a 37° C y se realizó la evaluación seminal (macroscópicamente se evaluó volumen y microscópicamente motilidad individual, vigor, concentración espermática y número total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos y morfología espermática). Concluida la evaluación seminal, el semen se centrifugó a 700 × g durante 10 minutos para separar el plasma seminal del paquete espermático. Se evaluó una gota del sobrenadante mediante microscopía para confirmar la ausencia de espermatozoides y se almacenó a -20°C hasta su uso. El volumen promedio de eyaculado para esta población de gatos fue de 140 µL (90-190 µL), se utilizaron 70 µL para la evaluación seminal; por lo tanto, se conservó de 10 a 110 µL de plasma seminal libre de espermatozoides por eyaculado.

Toma de muestra y evaluación de semen de llama. Purificación del factor inductor de la ovulación

Se utilizaron cuatro machos, maduros (de 5 a 7 años de edad) a los que se les extrajo semen mediante vagina artificial insertada en un maniquí de madera durante dos meses

(Adams y col., 2005; Lichtenwalner y col., 1996). Las muestras de semen (2 ml) se diluyeron 1:1 (v/v) con PBS (pH 7,4; Invitrogen), se pasaron a través de una aguja calibre 18 unida a una jeringa de 10 ml, y se centrifugaron a $1500 \times g$ durante 30 min para separar el plasma seminal de los espermatozoides (Adams y col., 2005). Las muestras diluidas sin espermatozoides se almacenaron a -70°C hasta su posterior purificación. El factor inductor de la ovulación (OIF) se aisló y purificó del plasma seminal de llama como fuera descrito previamente por Ratto y col. (Ratto y col., 2011). Brevemente, después de la sonicación y la centrifugación, el plasma seminal se cargó en una columna de hidroxiapatita (20 μm , Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Se recogieron las diferentes fracciones midiendo absorbancia a 280 nm. La fracción C se concentró utilizando ultrafiltro de membrana de 5 kDa (Vivaspin, Vivascience/Sartorius, Göttingen, Alemania; Ratto y col., 2011). Se realizó una purificación adicional mediante cromatografía de flujo (Amersham Biosciences, Inc, QC, Canadá). La elución de las muestras se realizó isocráticamente usando PBS a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, y los volúmenes de elución correspondientes a la Fracción C2 (OIF purificado) se concentraron como se describió anteriormente (Ratto y col., 2011). Las muestras de la Fracción C2 se almacenaron a -70°C y, luego de su descongelación, se diluyeron con PBS para preparar la dosis de 15 y 35 μg de proteína total (OIF - β -NGF- purificada) en 0,25 ml de PBS. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de microensayo (Protein Assay, Bio-Rad Mississauga, ON, Canadá) basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

ANALISIS ESTADISTICO

La variación en la duración del estro y E₂ fueron explicados por modelos de regresión lineal que incluyen la variable tratamiento como variable predictiva única. La variación en P₄ se explicó con modelos de regresión lineal con medidas repetidas en el tiempo que también incluyen a tratamiento como variable predictiva única (Proc GLIMMIX, SAS 9.4). Los resultados se expresan como diferencia de mínimos cuadrados (LSM) ± error estándar (SE). La significancia se estableció en $p < 0.05$.

MARCO BIOETICO DEL USO DE ANIMALES

El cuidado, alojamiento y experimentación de los animales cumplieron con los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica que involucra a los animales (Council, 2011). Además, se respetaron las recomendaciones sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. (# 40-3-14P y # 82-5-18P).

RESULTADOS

El plasma seminal del gato y el β -NGF purificado de llama, administrado por vía parenteral inducen ovulación en algunas hembras. Nuestros resultados muestran que la duración del estro y la concentración de E₂ fueron similares entre los tratamientos (Tabla 5.1). Se observó CL activo y elevadas concentraciones de P₄ sérica en el 100% de las gatas tratadas con GV (6/6) y con hCG (3/3); en el 67% de las tratadas con PSsc (4/6), y

en el 17% de las tratadas con β NGF1 (1/6). Mientras que las gatas tratadas con β NGF2, PSi y CON no se observaron signos indicativos de CL activo.

Las concentraciones elevadas de P_4 séricas confirmaron la presencia de CL activo en los tratamientos con hCG y GV, sin diferencias en la concentración de P_4 entre ambos tratamientos ($p > 0,29$; Figura 5.2) ni en la duración del IE (50 ± 6 vs. 45 ± 4 días, respectivamente, $p > 0,25$). De manera similar, en el grupo tratado con plasma seminal subcutáneo (PSsc), el 67% de las gatas (4/6) mostraron un IE prolongado de alrededor de 38 días (34 a 42 días). En estas hembras, la concentración sérica de P_4 el primer día de IE (IE1, $15,88 \pm 6,44$ ng/ml) fue similar a la de los tratamientos con hCG y GV ($8,05 \pm 8,33$ y $18,53 \pm 6,45$ ng/ml, respectivamente, $p > 0,32$). Sin embargo, los tratamientos con hCG y GV aumentaron rápidamente las concentraciones de P_4 alcanzando niveles máximos en IE21, sin encontrar entre tratamientos ($54,67 \pm 8,32$ vs. $51,94 \pm 6,44$ ng / mL, $p > 0,79$). Mientras que las gatas tratadas con PSsc mostraron valores más bajos en ese momento ($27,57 \pm 8,33$ ng/ml, $p < 0,03$; Figura 5.2), así como IE de más corta duración (37 ± 2 días; $p < 0,02$). Solo una gata tratada con β NGF1 tuvo un IE prolongado de 63 días. Sin embargo, las concentraciones séricas de P_4 fueron aún más bajas que las tratadas con PSsc (Figura 5.2).

Ninguna de las gatas tratadas con β NGF2 (n=6) o PSi (n=6) mostraron concentraciones elevadas de P_4 o IE prolongados, tampoco hubo diferencias al comparar con CON (n = 12; $p > 0,35$). Similares hallazgos se observaron en dos gatas tratadas con PSsc y cinco tratadas con β NGF1 ($p > 0,92$). La Tabla 5.2 muestra la duración del IE y la concentración de P_4 sérica de todos los tratamientos en gatas no ovuladas.

Tabla 5.1. Duración del estro y concentración sérica de estradiol 48 horas después de la detección del estro por citología vaginal (día 0 de tratamiento).

Tratamiento	GV (n=6)	hCG (n=3)	PSsc (n=6)	PSi (n=6)	βNGF1 (n=6)	βNGF2 (n=6)	CON (n=12)
Duración del estro (días)	5,17 ±0,72	6,00 ±1,02	6,50 ±0,72	5,83 ±0,92	5,83 ±0,82	4,80 ±0,89	6,50 ±0,58
Concentración de estradiol (pg/mL)	45,20 ±10,20	59,67 ±14,10	30,00 ±14,46	42,17 ±10,22	31,00 ±10,23	31,80 ±11,20	29,67 ±8,35

GV, apareamiento con un gato vasectomizado; hCG, gonadotropina coriónica humana; PSsc dosis subcutánea de plasma seminal; Psi, dosis intramuscular de plasma seminal; βNGF1 15 µg de factor inductor de la ovulación purificado de llama; βNGF2, 35 µg de factor inductor de la ovulación purificado de llama; CON, control, solución salina estéril. Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM±SE).

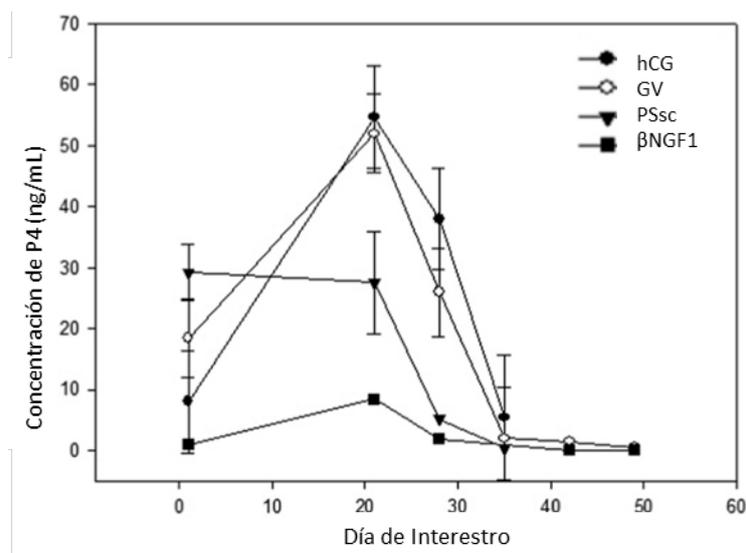


Figura 5.2. Diferencias de la actividad del cuerpo lúteo activo entre los tratamientos (gatas tratadas con hCG, apareamiento con un gato vasectomizado-GV, dosis subcutánea de plasma seminal-PSsc, y tratamiento intramuscular con factor inductor de la ovulación purificado de llama (15 µg)-βNGF1. Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM±SE). La significancia se estableció en P<0,05.

Tabla 5.2. Duración del interestro anovulatorio y concentración sérica de progesterona en el día 1 entre los tratamientos.

Tratamiento	PSsc	Psi	βNGF1	βNGF2	CON
	(n=2)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=12)
Duración del interestro (días)	22,00 ± 10	14,67 ± 4	10,00 ± 4	14,60 ± 5	10,00 ± 3
Concentración de progesterona (ng/mL)	0,38 ± 0,73	0,26 ± 0,42	1,02 ± 0,42	0,28 ± 0,52	0,66 ± 0,34

PSsc, dosis subcutánea de plasma seminal -CL no activo-; Psi, dosis intramuscular de plasma seminal; βNGF1 15 μg de factor inductor de la ovulación purificado de llama; βNGF2 35 μg de factor inductor de la ovulación purificado de llama; CON control, solución salina estéril. Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados ± error estándar (LSM±SE). La significancia se estableció en P<0,05.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El plasma seminal de llamas presenta al menos una molécula conocida (β-NGF) capaz de inducir la ovulación después de su administración intrauterina o sistémica (intramuscular o endovenosa; Berland y col., 2016). La presencia de un OIF en el plasma seminal de especies ovuladoras inducidas plantea la posibilidad de que también pueda estar presente en el plasma seminal del gato. En el gato doméstico, la estimulación vaginal durante la cópula ha sido aceptada como el evento responsable de desencadenar la ovulación, sin embargo, los hallazgos en especies de ovulación inducida plantean una nueva hipótesis en relación con el mecanismo inductor de ovulación en la gata. En nuestro estudio, se registraron 192 ciclos estrales para evaluar el efecto del plasma seminal del gato y del β-NGF sobre la actividad ovárica en las gatas. La duración del estro mostró un promedio de 6±1 días, con un rango entre 2 a 10 días. Mientras que las concentraciones séricas de E₂ oscilaron entre 10 y 75 pg/mL 48 horas posteriores a la detección del estro citológico, confirmando la actividad folicular, además de una gran variabilidad en la

producción de E₂. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura (Verhage y col., 1976; Gimenez y col., 2009; Wildt y col., 1981; Johnston y col., 2001). Nuestros hallazgos revelaron que el 67% de las gatas tratadas de manera subcutánea con el plasma seminal de gato (PSsc) mostraron un interestro prolongado y concentraciones altas de P₄ séricas que coincidían con actividad de CL. Sin embargo, la vía de administración parece importante ya que no se observó actividad de CL con la administración intramuscular de plasma seminal (PSi). Si bien la vía de administración afecta a la biodisponibilidad de las sustancias; las sustancias administradas por vía subcutánea se absorben a un ritmo más lento que por vía intramuscular, principalmente debido a un menor flujo sanguíneo tisular (Turner y col., 2011). Sin embargo, la absorción depende de otros factores como propiedades químicas, volumen y lugar de administración, entre otros. Con la vía intramuscular, las sustancias que se administran deben atravesar membranas y las moléculas lipídicas son absorbidas más fácilmente que los agentes solubles en agua (Turner y col., 2011). En este sentido, las diferencias en la solubilidad de las sustancias también pueden influir en la tasa de absorción. Por ejemplo, medicamentos como fenobarbital y diazepam tienen una mala absorción después de la administración intramuscular, mientras que otros, como la fenitoína, cristalizan en el tejido muscular y provocan necrosis, lo que afecta su absorción (Patterson y col., 2008; Evans y col., 1992; Benet y col., 1983). Es así que, en nuestro estudio, las moléculas del OIF presentes en el plasma seminal felino administradas por vía intramuscular podrían haberse absorbido de forma incompleta, mientras que la vía subcutánea habría permitido una absorción más lenta pero completa. Este hecho podría explicar los diferentes efectos ovulatorios obtenidos con la administración del plasma seminal vía subcutánea e intramuscular.

El tratamiento con hCG tuvo una duración del interestro y concentraciones séricas de P₄ similares al tratamiento con GV (apareamiento con un macho vasectomizado). La concentración sérica de P₄ durante la pseudopreñez mostró variaciones considerables entre los estudios. Algunos autores observaron que el CL alcanza su pico de actividad entre los días 10 a 17 con valores de P₄ sérica de 17 ng/ml (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993; Shille y Stabenfeldt, 1979). Por el contrario, nuestros hallazgos mostraron un pico de actividad de CL en el día 21 de interestro, con una concentración sérica de P₄ alrededor 45 ng/ml. Estos resultados concuerdan con otros autores que informaron niveles de P₄ entre 25 y 40 ng/mL, 20 a 25 días después del apareamiento con un macho vasectomizado (Siemieniuch y col., 2012; Verhage y col., 1976; Wildt y col., 1981). Posteriormente, el CL comienza a disminuir gradualmente la producción de P₄ alcanzando niveles basales hacia los días 30 a 35 (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993), 30 a 46 (Shille y Stabenfeldt, 1979), 35 a 38 (Paape y col., 1975), 26 a 55 (Wildt y col., 1981) incluso hasta 50 a 60 días de interestro (Verhage y col., 1976). Nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente, ya que los niveles basales de P₄ se encontraron el día 35 en los tratamientos con PSsc y el día 49 en los tratamientos con hCG y GV. En hembras con pseudopreñez, el intervalo interestrual es muy variable, habiéndose reportado duraciones entre 30 y 71 días (Verhage y col., 1976; Paape y col., 1975; Wildt y col., 1981; Shille y Stabenfeldt, 1979). En nuestro estudio los intervalos interestrales oscilaron entre 35 y 52 días para el tratamiento con GV, entre 49 y 51 en el tratamiento con hCG, 34 y 42 en el tratamiento con PSsc y 63 días en una gata tratada con β NGF1. Es interesante notar que la gata con el intervalo interestrual de 63 días presentó niveles basales de P₄ a partir del día 35 de interestro, lo que significa que los días restantes podrían representar un período de anestro. Un hecho similar fue descrito por Shille y col. (1979), quienes describieron una fase lútea de aproximadamente 35 días seguida de un período de anestro que condujo a

un interestro prolongado de 64 y 73 días en dos gatas que estaban bajo un régimen lumínico controlado. El intervalo interestral medio en gatas con CL inactivo observado en este estudio es consistente con los reportados en la literatura (Verhage y col., 1976; Johnston y col., 2001; da Silva y col., 2006).

El factor inductor de la ovulación (β -NGF) se encuentra presente en el plasma seminal de especies ovuladoras inducidas y en ovuladoras espontáneas, modificando la función ovárica en las hembras (Bogle y col., 2011; Ratto y col., 2006). En nuestro estudio, las gatas tratadas con dosis crecientes de β -NGF de llama (15 y 35 μ g de factor inductor de ovulación purificado de llama) condujeron a un solo interestro prolongado. Sin embargo, el efecto de β -NGF ha sido diferente en las especies. En las vaquillonas aceleró la aparición de ondas foliculares, además de tener impacto luteotrófico (Tanco y col., 2012). Recientemente, se informó sobre la presencia del β -NGF en el tracto genital y en el plasma seminal de conejos machos (García-García y col., 2018). Sin embargo, en conejas, el tratamiento intramuscular con plasma seminal de conejo o llama, sólo indujo un mayor número de folículos hemorrágicos sin ovulación (Silva y col., 2011; Cervantes y col., 2015). Es posible que la vía de administración en las hembras no fuera adecuada como observamos en las gatas. Además, podría ser que en esta especie el estímulo mecánico de la cópula fuera el factor crítico para inducir la ovulación en conejas y los factores químicos del plasma seminal solo lo respalden. Aun así, las señales químicas no son lo suficientemente fuertes como para inducir la ovulación por sí mismas. En nuestro estudio, utilizamos un macho vasectomizado para el apareamiento, por lo que el efecto del estímulo físico del servicio natural y la potencial señalización química del plasma seminal, actuaron en conjunto. Para poder independizar ambos efectos, futuros estudios, deberán incluir la administración intravaginal de plasma seminal de gato por una parte y la estimulación vaginal artificial por otra. En este sentido, la estimulación vaginal

artificial para inducir la ovulación fue descrita por primera vez por Greulich en 1934 (Greulich, 1934) y solo fue replicado recientemente por Mandalain y col. (Malandain y col., 2011). Los últimos autores mejoraron la técnica descrita por Greulich e indujeron la ovulación en gatas mediante estimulación vaginal con un hisopo de algodón. Fueron necesarias cinco estimulaciones vaginales consecutivas cada 30 minutos para inducir la ovulación de manera eficaz (Malandain y col., 2011).

Nuestra hipótesis fue parcialmente aceptada, ya que tanto el plasma seminal de gato como el β -NGF purificado de llama, administrado por vía parenteral, indujeron la ovulación en algunas gatas. La respuesta al tratamiento con el plasma seminal de gato administrado de manera subcutánea indica que el plasma seminal induce la ovulación. En este sentido, la composición química del OIF del gato podría estar involucrada en la efectividad de la vía de administración. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar la presencia de un OIF en el plasma seminal de gato y el efecto de la vía de administración de β -NGF. Nuestros resultados mostraron una alta variabilidad en la duración del estro y probablemente en el crecimiento folicular entre las gatas. Estudios previos demostraron que un solo servicio puede inducir eficazmente la ovulación cuando la maduración folicular es la adecuada y las concentraciones de estradiol sérico se encuentran elevadas (Glover y col., 1985; Tsutsui y col., 2009). Por lo tanto, estudios posteriores podrían considerar el uso de ecografía para determinar el crecimiento folicular y evaluar el día de tratamiento en lugar de realizarlo a tiempo fijo.

Podemos concluir que en nuestro estudio, el apareamiento natural indujo la ovulación en todas las gatas, mientras que el tratamiento con el plasma seminal de gato fue eficaz en el 67% de las hembras y con el β -NGF solo en el 17%. Por lo tanto, el plasma seminal del gato puede contener algunas moléculas de OIF que producen la ovulación en las gatas. Sin embargo, aún debe revelarse el posible papel del β -NGF como

factor mediador en el proceso de ovulación. La identificación de esas moléculas permitirá mejorar el conocimiento de la fisiología reproductiva de las gatas. Además, podría ofrecer una alternativa fisiológica para inducir la ovulación en gatas cuando se utilice alguna biotecnología reproductiva.

CONCLUSIONES GENERALES

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se puede concluir que en los felinos domésticos las características bioquímicas del plasma seminal tienen influencia sobre la calidad del semen y la cantidad de espermatozoides sin alteraciones ultramicroscópicas. Según nuestras observaciones las concentraciones de colesterol y triacilglicerolos del plasma seminal fueron significativamente mayores en los eyaculados de buena calidad seminal en comparación con los de mala calidad seminal. Además, los eyaculados de mala calidad seminal observados al MET, presentaron un porcentaje mayor de morfoanomalías principalmente localizadas en la cabeza y pieza intermedia por lo que podría influir en el proceso de fecundación y comprometer a la fertilidad.

Asimismo, los eyaculados con mayor concentración de colesterol y triacilgliceridos soportaron mejor la congelación. También pudo observarse que el semen felino con 35 a 40 % de anormalidades espermáticas no afectó la supervivencia del semen al descongelado. Esta información resultaría interesante para la selección de reproductores felinos, así como para el desarrollo de diluyentes de congelación que permitan disminuir el efecto deletéreo inducido proceso de congelación a fin de mejorar la respuesta al descongelado. Por otra parte, brinda nuevas alternativas para aplicar en felinos silvestres en riesgo de extinción.

Pudimos determinar que el peso molecular de las proteínas del plasma seminal está relacionado con la calidad seminal. Los eyaculados con buena calidad seminal presentaron una banda proteica extra de 14,4 kDa, lo que podría representar un marcador valioso de calidad seminal; sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar el papel de dicha banda proteica, así como su grado de implicancia para predecir la fertilidad en gatos. Por otra parte, también sería interesante orientar futuros estudios a la

caracterización de la banda proteica de 14,4 kDa a fin de identificar si β -NGF es un componente del plasma seminal felino, o si el plasma seminal de gato posee un factor inductor de ovulación diferente al identificado en camélidos. Según nuestras observaciones el plasma seminal del gato contiene algunas moléculas con funciones OIF capaces de inducir la ovulación en algunas gatas. La identificación de estas moléculas, brindarían una alternativa fisiológica para inducir la ovulación en gatas cuando se requiera la utilización de biotecnologías reproductivas

BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Haila A, Tulsiani D. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. Archives of biochemistry and biophysics. 2009; 485:72-81.
2. Adams G, Ratto M, Silva M, Carrasco R. Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: a review and update. Reproduction in Domestic Animals. 2016; 51: 4-17.
3. Adams G, Ratto M. Ovulation-inducing factor in seminal plasma: a review. Animal reproduction science. 2013; 136: 148-156.
4. Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. Biol Reprod. 2005; 73:452-457.
5. Aloia RC. Lipid domains and the relationship to membrane function. En: Curtain CC, Gordon LM Advances in Membrane Fluidity. Vol. 2. New York, Estados Unidos, Wiley, 1988. p 301.
6. Amorim E, Graham J, Spizziri B, Meyers M, Torres C. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology. 2009; 58: 210-4.
7. Argov N, Sklan D, Zeron Y, Roth Z. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. Theriogenology. 2007; 67: 878–885.
8. Asadpour R, Alavi-Shoushtari S, Asri Rezaii S, Ansari M. 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Animal Reproduction Science. 2007; 102: 308-313.
9. Axner E y Linde Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. Reprod Domest Anim. 2007; 42: 282-291.
10. Axner E, Linde-Fosberg C, Einarsson S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. Theriogenology. 1999; 52: 767-778.
11. Axner E, Linde-Fosberg C. Mating and artificial insemination. En: Simpson GC, England G y Harvey M. Manual of Small animal reproduction and neonatology. Cheltenham, UK, BSAVA, 1998, p.105-111.

12. Axner E, Strom B, Linde-Forsberg C, Gustavsson I, Lindblad K, Wallgren M. Reproductive disorders in 10 domestic male cats. J Small Anim Pract. 1996; 37: 394-401.
13. Axner E, Ström-Holst B, Linde-Fosberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. Theriogenology.1998; 50: 973-9.
14. Axner E. Sperm morphology and maturation in the domestic cat (*Felis Silvestris Catus*), with special reference to the morphology and function of the epididymis. Acta Univ Agric Suec. 2000; 60: 9-39.
15. Bailey J, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. Canadian journal of animal science. 2003; 83: 393-401.
16. Barrios B, R Pérez-Pé, M Gallego, A Tato, J Osada, T Muiño-Blanco. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biol Reprod. 2000; 63: 1531-1537.
17. Beer-Ljubić B, Aladrović J, Marenjak TS, Laškaj R, Majić'-Balić I, Milinković-Tur S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. Theriogenology. 2009; 72: 1132–1140.
18. Benet LZ, Massoud N, Gambertoglio JG. Pharmacokinetic basis for drug treatment, Raven Press, New York, Estados unidos, 1983.
19. Benoff S. Preliminaries to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. Hum Reprod.1993; 8: 2001–2006.
20. Berland MA, Ulloa-Leal C, Barria M, Wright H, Dissen GA, Silva ME, Ratto MH. Seminal plasma induces ovulation in llamas in the absence of a copulatory stimulus: role of nerve growth factor as an ovulation-inducing factor. Endocrinology. 2016; 157:3224-32.
21. Binder C, Aurich C, Reifinger M, Aurich J. Spontaneous ovulation in cats- Uterine findings and correlations with animal weight and age. Anim Reprod Sci. 2019; 209:106-167.
22. Blottner S y Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. Reprod Domest Anim. 2007; 42: 536-540.
23. Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. Anim Reprod Sci. 2001; 65: 75-88.

24. Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. Reproduction. 2011; 142:277-83.
25. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. Biology of reproduction. 2004; 70: 656-661.
26. Bonaura MC, Jurado S, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, Sarmiento P, Stornelli MA. Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Acta Microscópica. 2014; 23:1-8.
27. Bonaura MC, Jurado S, Nuñez Favre R; Praderio R; Tittarelli C; Stornelli MA. Alteraciones ultramicroscópicas observadas en espermatozoides felinos (*felis catus*) congelados-descongelados. Cs Morfológicas. 2013; 15: 25-33.
28. Bonaura MC. Efecto de la adición de disacáridos, detergentes y amidas a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2016.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976; 72:248-254.
30. Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. Theriogenology. 1999; 52: 863-873.
31. Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Macpherson ML, Varner DD. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. Animal reproduction science. 2007; 99: 65-71.
32. Brown JL. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. Theriogenology. 2006; 66:25-36.
33. Buranaamnuay K. Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: a review. Animal Reproduction Science. 2017;183: 56-65.
34. Cardozo JA, Fernandez-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Theriogenology. 2006; 66: 841–850.

35. Cevik M, Tuncer PB, Tasdemir U, Ozgurtas T. Comparison of Spermatological Characteristics and Biochemical Seminal Plasma Parameters of Normozoospermic and Oligoasthenozoospermic Bulls of Two Breeds. *Turk. J Vet Anim Sci.* 2007; 31: 381-387.
36. Chacur M. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Zebu Bulls (*Bos taurus indicus*). En: Kiumars Ghowsi *Electrophoresis*. London, Reino Unido, IntechOpen, 2012, p. 141-153.
37. Chandel KK y Pahadiya S. Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel. *Electrophoresis*. 2005; 173.
38. Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and bood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*. 1993; 30: 423-431.
39. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl.*2000; 21: 53–57.
40. Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, Lorizio R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*. 2010; 18:1-1.
41. Concannon PW, Lein DH. Feline reproduction. En: Kirk RW *Current veterinary therapy*. 8va Edición. Philadelphia, Estados Unidos, WB Saunders, 1983, p. 932-936.
42. Council NR. *Guide for the care and use of laboratory animals*. eighth ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
43. Crespilho AM, Landim-Alvarenga FC, Papa FO. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia electronica de trasmissao. *Ciencia rural*. 2006; 36:1507-1510.
44. Cross NL. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod.* 1996;54: 138–145.
45. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998; 59: 7–11.
46. Dadoune JP. Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1988; 3:311-8.
47. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the Cholesterol Content of Mammalian Spermatozoa on Susceptibility to Cold-Shock. *Criobol.* 1977; 14: 466-470.

48. Davis BK. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. Symposium on the Pharmacological Effect of Lipids. Champaign, IL: The American Oil Chemists Society, 1978, p 145.
49. De Neergaard R, Nielsen JE, Jørgensen A, Toft BG, Goetze JP, Jorgensen N. Positive association between cholesterol in human seminal plasma and sperm counts: results from a cross-sectional cohort study and immunohistochemical investigations. Andrology. 2018; 6: 817-828.
50. De Sousa Barbosa B, Rodrigues Silva HV, Evaristo de Almeida Tabosa B, Gothardo Pereira Nunes T, de Magalhães FF y Daniel Machado da Silva L. Caracterización morfológica y morfométrica de espermatozoides epididimarios de gatos domésticos. Reproducción en animales domésticos. 2019; 54:1630-1636.
51. De Souza FF, Barreto CS, Lopes MD. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. Theriogenology. 2007; 68: 100-106.
52. Dhami AJ, Sahni KN, Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5 °C) and thawing temperatures on the deep freezing of Bos Taurus and Bos bubalis semen. Theriogenology. 1992; 38: 565-574.
53. Díaz GB y Ojeda RA. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. SAREM. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Mendoza, Argentina, 2000, p. 1- 106.
54. Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sanchez E, Cesari A, Alberio R. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. Theriogenology. 2008; 69: 564–573.
55. Dooley MP, Pineda MH. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. Am J Vet Res. 1986; 47: 286-292.
56. England G y Ponzio P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology. 1996; 46: 165-171.
57. Erofeeva M, Alekseeva G, Sorokin A, Naidenko S. Effect of the Number of Mating Partners and Sperm Quality on Reproductive Success in the Domestic Cat (*Felis catus*). Biology Bulletin. 2018; 45: 756-765.
58. Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ. Applied pharmacokinetics: Principles of therapeutic drug monitoring (3th edition), Applied Therapeutics Inc, San Francisco, Estados Unidos, 1992.

59. Faisal F, Laplace R, Soto AT, Migliorisi AL, Gómez MV, Jurado SB. Ultraestructura del espermatozoide del macho cabrio enano africano (*Capra hircus*). Analecta Veterinaria. 2011; 31.
60. 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.
61. Flowers WL. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. Swine News. 2001; 6: 1-4.
62. Flowers WL. Selection for boar fertility and semen quality – the way ahead. Soc Reprod Fertil Suppl. 2009; 66: 67-78.
63. Fontbonne A, Charbonnier M, Santos N, Maenhoudt C, Borges P, Leblond E. Ovulation in the domestic cat: induced, spontaneous or both? Proceedings 8th International Symposium for Canine and Feline Reproduction, 2016, p. 64, Paris, Francia.
64. Furthner E, Cordonnier N, Le Dudal M, Fontbonne A, Freiche V. Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study. Theriogenology. 2018; 119: 69-75.
65. Gallagher SR. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 2012; 6: 7-3.
66. Gao DY, Liu J, Liu C, Mcgann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mzur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Andrology: Hum Reprod. 1995; 10:1109-22.
67. García H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ Diag. 2000; 1: 31-41.
68. Garcia MF, Nunez Favre R, Stornelli MC, Rearte R, Garcia Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli, MA. Relationship between semen quality and seminal plasma cholesterol, triacylglycerols and proteins in the domestic cat. J Feline Med Surg. 2020; 22:882-889.
69. Garcia-Garcia RM, Masdeu MdM, Sanchez Rodriguez A, Millan P, Arias-Alvarez M, Sakr OG, Rebollar PG. β -nerve growth factor identification in male rabbit genital tract and seminal plasma and its role in ovulation induction in rabbit does. Italian Journal of Animal Science. 2018; 17:442-453.

70. Garolla A, Sabovic I, Tescari S, De Toni L, Menegazzo M, Cosci I, Foresta C. Impaired sperm function in infertile men relies on the membrane sterol pattern. Andrology. 2018; 6: 325–334.
71. Gilbert SF. *Biología del desarrollo*. 7ma. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana, 2005.
72. Gimenez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Dorna IV, de la Sota RL, Stornelli, MA. Suppression of estrus in cats with melatonin implants. Theriogenology. 2009; 72:493-499.
73. Glover TE, Watson PF, Bonney RC. Observations on variability in LH release and fertility during oestrus in the domestic cat (*Felis catus*). J Reprod Fertil. 1985; 75:145-152.
74. Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. Theriogenology. 2000; 54:1117-1131.
75. Greulich WW. Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). The Anatomical Record. 1934; 58: 217-224.
76. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J Androl. 1990; 11:73-88.
77. Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. J Reprod Fert, Suppl. 1993; 47:297-305.
78. Heise A, Thompson PN, y Gerber D. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. Animal reproduction science. 2011; 123: 192-201.
79. Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo J, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Visconti P. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. J Biol Chem. 2006; 281: 5623–5633.
80. Hidalgo M, Portero JM, Demyda-Peyrás S, Ortiz I, Dorado J. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. Veterinary Record. 2014; 175: 20-20.
81. 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.
82. Huffmeyer AA, Pukazhenthil BS, Wayne RK. Differential gene expression patterns in spermatozoa from teratospermic and normospermic domestic cats. Animal Reproduction Science. 2021; 226:106698.
83. Iborra A, Companyó M, Martínez P, y Morros A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. Biology of reproduction. 2000; 62:378-383.
84. Jewgenow K, Amelkina O, Painer J, Goritz F, Dehnhard M. Life cycle of feline corpora lutea: histological and intraluteal hormone analysis. Reproduction in Domestic Animals. 2012; 47:25-29.
85. Jewgenow K, Neubauer K, Blottner S, Schön J, Wildt DE, y Pukazhenthil BS. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. Journal of andrology. 2009; 30: 460-468.
86. Jobim M, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Theriogenology. 2004; 61: 255–266.
87. Jobim M, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Theriogenology. 2011; 76: 765–771.
88. Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. Theriogenology. 2005; 63: 2053-2062.
89. Johnston SD, O’Callaghan P, Nilsson K, Tzipori G, Curlewis JD. Semen-induced luteal phase and identification of a LH surge in the koala (*Phascolarctos cinereus*). Reproduction. 2004; 128:629-34.
90. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Semen Collection and Evaluation in the Cat. En: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, W. B. Saunders Company, R. Kersey, 2001, p. 287-306.
91. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Sexual differentiation and normal anatomy of the tom cat. En: Kersey R. Canine and feline Theriogenology. Philadelphia, W.B. Saunders Company, Ltd, 2001, p. 592.

92. Johnstone I. Electroejaculation in the domestic cat. Australian Veterinary Journal. 1984; 61: 155-158.
93. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Analecta Veterinaria. 2008; 28: 7-14.
94. Kacel A y Iguer-Ouada M. Effects of olive oil dietary supplementation on sperm quality and seminal biochemical parameters in rooster. J Anim Physiol Anim Nutr. 2018; 102:1608–1614.
95. Kalthur G, Adiga S, Upadhya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. Fertility and Sterility. 2008; 89: 1723-1727.
96. Kao SH, Chao H y Wei Y. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod. 1998; 4: 657–666.
97. Kareskoski M y Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. Anim. Reprod. Sci. 2008; 107: 249 – 256.
98. Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S y Hoshi K. Relación entre potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides, motilidad de los espermatozoides y fertilidad potencial. Asian J. Androl. 2002; 4: 97-103.
99. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Arangasamy A, Kastelic JP. Sperm and seminal plasma proteomics of high-versus low-fertility Holstein bulls. Theriogenology. 2019; 126: 41-48.
100. Katila T, Kareskoski M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. Pferdeheilkund. 2006; 22: 193 – 200.
101. Kauffman AS, Rissman EF. Neuroendocrine control of mating-induced ovulation. En: Neill JD, editor. Knobil and neill's physiology of reproduction. Third ed. Academic Press; 2006, p. 2283-2326.
102. Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J, Maxwell WM. Beta-Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. Reprod Fertil Dev. 2012; 24:1093-7.
103. Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. Biol Reprod. 1993; 49:1202-1207.
104. Laemmli, UK. SDS-page Laemmli method. Nature. 1970; 227: 680 – 685.

105. Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). Reprod Nutr Dev. 1993; 33: 349–360.
106. Leahy T y De Graaf SP. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. Reproduction in domestic animals. 2012; 47: 207-213.
107. Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell WMC. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen–thawed ram spermatozoa. Animal Reproduction Science. 2010; 119: 147-153.
108. Leahy, T, Gadella, BM. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. Asian J Androl. 2015; 17: 561–567.
109. Leivo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. En: Gagnon C The male gamete: from basic science to clinical applications. Ed Cache River Press, Vienna, Austria, 1999, p. 501-516.
110. Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. Theriogenology. 1996 ;46: 293-305.
111. Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. Biol Reprod. 1996; 54:638-46.
112. Longobardi V, Albero G, De Canditiis C, Salzano A, Natale A, Balestrieri A, y Gasparrini B. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. Theriogenology. 2017; 89: 359-364.
113. Longobardi, Kosior, Pagano, Fatone, Staropoli, Vasseti, Vinale, Campanile, Gasparrini. Changes in Bull Semen Metabolome in Relation to Cryopreservation and Fertility. Animals. 2020; 10:1065- 1065.
114. Luvoni GC, Kalchschmidt E, Marinoni G. Conservation of feline semen: Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. Journal of feline medicine and surgery. 2003; 5: 257-263.
115. Malandain E, Rault D, Froment E, Baudon S, Desquilbet L, Begon D, Chastant-Maillard S. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. Theriogenology. 2011; 76:1337- 1346.

116. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology. 2005; 63: 411-421.
117. Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2006; 65: 217-228.
118. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. J Reprod Immunol. 2002; 53: 109-119.
119. Manns JM. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. Current protocols in microbiology. 2011; 22: A-3M.
120. Martinez MN. Factors influencing the use and interpretation of animal models in the development of parenteral drug delivery systems. The AAPS journal. 2011; 13: 632-49.
121. Martínez-Soto JC, Landeras J, Gadea J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. Andrology. 2013; 1: 365-375.
122. Matsumoto H, Haniu H, y Komori N. Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. En: Kurien BT, Scofield RH. Electrophoretic Separation of Proteins. New York, Estados Unidos, Humana Press, 2019, p. 101-105.
123. Maxwell W, Johnson L. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. Theriogenology. 1999; 52: 1353-1362.
124. Mazur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EH, Hanna MG, Smith LH. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. En: Wolstenholme GEW, O'Connor M The Frozen Cell. London, UK, Wiley, 1970, p 69-88.
125. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. J Reprod Fertil. 1992; 95: 755-763.
126. Mesa A, Henao G. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. MVZ Córdoba. 2012; 17: 2908-2915.
127. Meseguer M, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents,

- and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. J Assist Reprod Genet.2004; 21: 445–451.
128. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology. 2005; 51:241-9.
 129. Moura PP, Franco MM, de Souza Nascimento Silva TA, Rocha TL, Leal DR, Passos PI, Neves JP. Characterization of seminal plasma proteins and its relationship with quality parameters of frozen semen in ram. Ciencia Rural, Santa María. 2010; 40: 1154-1159.
 130. Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod Domes Anim. 2008; 43:18-31.
 131. Muñoz Sarmiento ST. Criopreservación de espermatozoides: citoesqueleto, balsas lipídicas e integridad nucleoproteica. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, Universidad Antonio Nariño de Colombia. 2021
 132. Naresh, S. Effect of cooling (4 °C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. Cryobiology. 2016; 72: 7–13.
 133. Naseer Z, Ahmad E, Aksoy M. Cholesterol efflux from sperm: approaches and applications. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2014; 38: 653-659.
 134. Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze–thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology. 2003; 59: 1693-1705.
 135. Neubauer K, Jewgenow K, Blottner S, Wildt DE, y Pukazhenthii BS. Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Biology of reproduction. 2004; 71: 1517-1524.
 136. Novak S, Ruiz-Sánchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. Journal of Andrology. 2010a; 31: 188-200.
 137. Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. Theriogenology. 2010b; 74: 956-967.
 138. Nuñez Favre R, Bonaura M, Tittarelli C, Mansilla-Hermann D, de la Sota R, Stornelli M. Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and

- Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*). Reprod Domest Anim. 2012a; 47: 232-234.
139. Nuñez Favre R, Bonaura M, Tittarelli C, Stornelli M, de la Sota RL. Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. Reprod Domest Anim. 2012b; 47: 235-237.
140. Nuñez Favre R, Bonaura MC, García MF, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Influencia del fotoperiodo natural sobre la morfología espermática en el gato doméstico (*felis silvestris catus*). Revista de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. 2015; 17: 10-15.
141. O'connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human reproduction. 2002; 17: 704-709.
142. Ojeda R, Chillo V y Diaz Isenrath G. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. Mendoza, Argentina, SAREM (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos), 2000.
143. Ortiz I, Dorado J, Acha D, Gálvez MJ, Urbano M, Hidalgo M. (2015). Colloid single-layer centrifugation improves post-thaw donkey (*Equus asinus*) sperm quality and is related to ejaculate freezability. Reproduction, Fertility and Development. 2015; 27: 332-340.
144. Paape SR, Shille VM, Seto H, Stabenfeldt GH. Luteal activity in the pseudopregnant cat. Biol Reprod. 1975; 13:470-474.
145. Park YJ, Kwon WS, Oh SA, Pang MG. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. Journal of proteome research. 2012; 11: 4162-4168.
146. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology. 1992; 29:255-266.
147. Patterson EE, Goel V, Cloyd JC, O'Brien TD, Fisher JE, Dunn AW, Leppik IE. Intramuscular, intravenous and oral levetiracetam in dogs: safety and pharmacokinetics. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 2008; 31:253-8.
148. Pedersen H, Fawcett DW. Functional anatomy of the human spermatozoon. En: Hafez ESE Human semen and fertility regulation in men. Ed Mosby, St Louis, Estados Unidos, 1976.

149. Pérez-Chabela MD, Soriano-Santos J, Ponce-Alquicira E, Díaz-Tenorio LM. Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review. Nacameh. 2015; 9: 77-96.
150. Perez-Pe R, Barrios B, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 2001; 760: 113–121.
151. Petersen A. Reproductive physiology of the female cat. Sveriges lantbruksuniversitet Swedish University of Agricultural Sciences; 2015.
152. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. Genome Biol. 2006; 7: 1-10.
153. Pineda MH, Dooley MP, Martin PA. Long term study on the effects of electroejaculation o seminal characteristics of the domestic cat. Am J Vet Res. 1984; 45:1038–40.
154. Pineda MH, Dooley MP. Effect of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. Am J Vet Res. 1984; 45 :1520-1525.
155. Platz CC, Wildt DE, Seager SW. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. J Reprod Fertil. 1978; 52:279–82.
156. Ponglowhapan KTS. Evaluation of two cryopreservation protocols on cauda epididymal spermatozoa characteristics in domestic cats. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 2018; 48:1-7.
157. Prochowska S, Nizański W, Partyka A, Kochan J, Młodawska W, Nowak A y Pałys M. Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the results of ICSI in domestic cats. Theriogenology. 2019; 131: 140-145.
158. Prochowska S, Nizański W, Partyka A. Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). Theriogenology. 2016; 86:2063-2072.
159. Pukazhenth B, Laroe D, Crosier A, Busch ML, Spindler R, Pelican KM, Busch M, Howard JG, Wildt DE. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. Theriogenology. 2006b; 66:1790-1796.

160. Pukazhenthil B, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt D. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. Theriogenology.2006a; 66: 112-121.
161. Pukazhenthil B, Pelican K, Wildt D, Howard J. Sensitivity of Domestic Cat (*Felis catus*) sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced Acrosomal Damage. Biol Reprod. 1999; 61:135-141.
162. Pukazhenthil B, Noiles E, Pelican K, Donoghue A, Wildt D, Howard J. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. Cryobiology. 2000; 40: 139– 150.
163. Pukazhenthil B, Wildt D, Howard J. The phenomenon and significance of teratospermia in felids Reprod. Journal of reproduction and fertility.2001; 57: 423-433.
164. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology. 2004; 48: 36-45.
165. Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. Reproductive Biology and Endocrinology. 2011; 9: 1-8.
166. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. Theriogenology. 2006; 66:1102-6.
167. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. Reprod Biol Endocrinol. 2005; 3:29.
168. Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, Van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, Adams GP. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109: 15042-15047.
169. Rego JP, Martins JM, Wolf CA, Van Tilburg M, Moreno F, Monteiro-Moreira AC, Moura AA. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls. Journal of Animal Science. 2016; 94: 5308-5320.
170. Restrepo G, Rojano B, y Usuga A. Relationship of cysteine-rich secretory protein-3 gene and protein with semen quality in stallions. Reproduction in Domestic Animals. 2019; 54: 39-45.

171. Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio de la concentración espermática testicular en diferentes estaciones del año en el gato doméstico. X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas, 2006, Resumen, Tandil, Buenos Aires.
172. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. J Reprod Fertil. 1993; 47: 279-285.
173. Rowlison T, Cleland TP, Ottinger MA, Comizzoli P. Novel proteomic profiling of epididymal extracellular vesicles in the domestic Cat reveals proteins related to sequential sperm maturation with differences observed between normospermic and teratospermic individuals. Molecular & Cellular Proteomics. 2020; 19: 2090-2104.
174. Saacke RG, Almquist JO. Ultrastructure of bovine spermatozoa I. The head of normal, ejaculated sperm. Am. J Anat. 1964; 115: 143-161.
175. SAS®. SAS software 9.4. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.; 2013.
176. Seager SWJ. Electroejaculation of cats (domestic and captive wild felids). En: WR Klemm Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology. Springfield, Estados Unidos, CC Thomas, 1976, p. 410-418.
177. Serna MC, Cardozo J, Lombana HA, Pérez JA, Blanco MT. Sperm quality and seminal plasma proteins in three sheep breeds under high altitude and tropical conditions. Spanish journal of agricultural research. 2018; 16: 10-10.
178. Sharma L, Pandey V, Nigam R, Singh P, Saxena A, Swain DK. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo. Reprod Domest Anim. 2014; 49: 387-391.
179. Shille VM, Stabenfeldt GH. Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and after treatment with prostaglandin F2 alpha. Biol Reprod. 1979; 21:1217-23.
180. Siemieniuch MJ, Jursza E, Szostek AZ, Skarzynski DJ, Boos A, Kowalewski MP. Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. Reprod Biol Endocrinol. 2012;10: 89.
181. Silva Balbin, Villaverde AI, Marini Melo C, Martin I, Henriques Ferreira T, Ozanam Papa F, Taconeli CA, Lopes MD. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis*

- catus*). Artificial insemination in domestic cats. *Anim Reprod Sci.* 2009; 114: 434-442.
182. Silva M, Nino A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP, y Ratto, MH. Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits?. *Anim Reprod Sci.* 2011; 127:213-221.
183. Slatter D. Textbook of small animal surgery (2da edición), Elsevier Health Sciences, Philadelphia, Estados Unidos, 2003, p. 1285.
184. Sojka NJ, Jemings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). *Lab Anim Care.* 1970; 20:198-204.
185. Somashekar L, Selvaraju S, Parthipan S, Patil SK, Binsila BK, Venkataswamy MM, Ravindra JP. Comparative sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. *Andrology.* 2017; 5: 1032-1051.
186. Stival C, Molina LD, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization.* 2016; 93-106.
187. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nunez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 287-290.
188. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Reyna JC, de la Sota RL. Influencia del fotoperiodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos, 2004a, Libro de resúmenes, p. 19-20, Corrientes, Argentina.
189. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. *Brazilian J. Anim. Reprod.* 2007; 31: 135-140.
190. Stornelli MA. Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2004.
191. Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación, criopreservación de semen e inseminación artificial en el gato doméstico. En: Anuario Asociación Argentina de Medicina Felina. Buenos Aires, Argentina, 2002a, p. 87-90.
192. Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria.* 2005; 25: 28-35.

193. Stout TAE, Morris LHA, Li X, Allen WR. The effect of seminal plasma on the motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. European Equine Gamete Group (eegg). 2000; 5.
194. Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. Dose-response of female llamas to ovulation-inducing factor from seminal plasma. Biol Reprod. 2011; 85:452-6.
195. Tebet JM, de Souza FF, Martins MIM, Chirinéa VH, de Carvalho JC, Papa FO, Lopes MD. Assessment of thawed sperm quality from feline species: Ocelot (*Leopardus pardalis*) and oncilla (*Leopardus gutullus*). Theriogenology. 2021; 177: 56-62.
196. Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. Theriogenology. 2006; 66: 1629-32.
197. Terrell KA, Wildt DE, Anthony NM, Bavister BD, Leibo SP, Penfold LM, Crosier AE. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. Cryobiology. 2012; 64: 110-117.
198. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. Biology of reproduction. 1999; 61: 590-598.
199. Thiangtum K, Pinyopummin A, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Effect of catalase and superoxide dismutase on motility, viability and acrosomal integrity of frozen-thawed cat spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals. 2009; 44: 369-372.
200. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la Sota RL. Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. Theriogenology. 2006; 66:1637-1640.
201. Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA, Stornelli MC, Desmarás E, de la Sota RL. Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en diferentes épocas del año. VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal, 2004, vol 106, La Pampa. Argentina.
202. Töpfer-Petersen E, EkhlasiHundrieser M, Tsoлова M, Leeb T, Kirchhoff C, Müller P. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. Andrologia. 2005; 37: 202-204.

203. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the national academy of sciences. 1979; 76 :4350-4.
204. Trein CR, Zirkler H, Bustamante-Filho IC, Malschitzky E, Jobim MIM, Sieme H, Mattos RC. Equine seminal plasma proteins related with semen freezability. Animal Reproduction Science. 2008; 107: 352-352.
205. Troedsson MH, Desvovuges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Buhi WC. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. Ani Reprod Sci. 2005; 89: 171-186.
206. Tsutsui T, Higuchi C, Soeta M, Oba H, Mizutani T, Hori T. Plasma LH, ovulation and conception rates in cats mated once or three times on different days of oestrus. Reprod Domest Anim. 2009; 44:76-78.
207. Tsutsui T, Stabenfeldt GH. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1993; 47:29-35.
208. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2011; 50:600-13.
209. Ugur MR, Dinh T, Hitit M, Kaya A, Topper E, Didion B, y Memili E. Amino acids of seminal plasma associated with freezability of bull sperm. Frontiers in cell and developmental biology. 2020; 7: 347.
210. Usuga A, Rojano B, Restrepo G. Effect of seminal plasma components on the quality of fresh and cryopreserved stallion semen. Journal of Equine Veterinary Science. 2017; 58: 103-111.
211. Usuga A, Rojano BA, y Restrepo G. (2018). Association of the cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) and some of its polymorphisms with the quality of cryopreserved stallion semen. Reproduction, Fertility and Development. 2018; 30: 563-569.
212. Usuga Suárez A. Factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en el Caballo Criollo Colombiano y su relación con la calidad de semen criopreservado. Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia. 2017.
213. Valencia J, Yeste M, Quintero-Moreno A, Henao FJ. A new test based on the hypotonic resistance and functional competence to evaluate the sperm quality,

- cryotolerance and in vitro fertilizing ability in pigs. Theriogenology. 2019; 140: 84–92.
214. Valiente C, de la Sota PE, Arauz S, Gobello C. Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. Journal of feline medicine and surgery. 2014; 16: 312-316.
215. Verhage HG, Beamer NB, Brenner RM. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. Biol Reprod. 1976; 14:579-585.
216. Vieira LA, Matás C, Torrecillas A, Saez F, y Gadea J. (2021). Seminal plasma components from fertile stallions involved in the epididymal sperm freezability. Andrology. 2021; 9: 728-743
217. Villaverde AIS, Fioratti EG, Ramos RS, Neves RC, Ferreira JCP, Cardoso GS, Lopes MD. Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to sperm quality and testicular biometry in domestic cats. Animal reproduction science. 2014; 150: 50-55.
218. Villaverde AISB, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MR, Tsunemi MH, Papa FO, Lopes MD. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. Theriogenology. 2013a; 80: 730-737.
219. Villaverde AISB, Fioratti EG, Ramos RS, Neves RC, Cardoso GS, Landim-Alvarenga FC, Lopes MD. High incidence of ‘Dag-like’ sperm defect in the domestic cat. Journal of feline medicine and surgery. 2013b; 15: 317-322.
220. Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen–thawed semen in domestic cat (*Felis catus*): Artificial insemination in domestic cats. Animal reproduction science. 2009; 114: 434-442.
221. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. Reproductive Biology and Endocrinology. 2003; 39: 39-50.
222. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. (2006). Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. Reproduction. 2006; 131; 887-894.
223. Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology. 1988; 25:131-42.

224. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev. 1995; 7: 871-91.
225. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000; 60: 481-492.
226. White LG, Darin-Bennett. The lipids of sperm in relation to cold shock. Proc. VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1976; p. 951-954, Krakow, Polonia.
227. Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. Biol Reprod. 1981; 25:15-28.
228. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Anim Reprod Sci. 2007; 102:181–193.
229. Yeste, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. Theriogenology. 2016; 85: 47–64.
230. Yue W, Shi L, Bai Z, Ren Y, Zhao Y. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. Animal Reproduction Science. 2009; 116: 386-391.
231. Zambelli D, Caneppele B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. Reprod Domest Anim. 2002; 37: 310-313.
232. Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: Techniques and análisis. Theriogenology. 2006; 66 :159-165.
233. 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; 74:1396-402.
234. Zamboni L. Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: the role of electron microscopy. J Electron Microsc Tech. 1991; 17:412-36.

235. Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy on the evaluation of semen quality. Fertile Steril. 1987; 48:711-34.
236. Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Koster S, Jewgenow K, Braun BC. Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2014; 144: 373-381.

BIOGRAFÍA PERSONAL

La Médica Veterinaria María Florencia García nació en La Plata el 16 de julio de 1987. Realizó sus estudios secundarios en la Escuela María Auxiliadora de La Plata graduándose en el año 2005 con Diploma de Honor otorgado al mejor promedio de Quinto año del Secundario. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la UNLP en marzo de 2006 y obtuvo el título de Médico Veterinario en diciembre de 2014.

En el año 2013 ingresó como colaboradora en la Cátedra y Servicio de Reproducción Animal en el Área de Pequeños Animales, y luego a partir de su graduación pasó a ser Ayudante Adscripta a la docencia. Durante su paso por la UNLP también desempeñó funciones docentes en la Cátedra de Medicina Operatoria como ayudante alumno *ad honorem* y como Jefe de Residente Alumno del Hospital Escuela de la FCV. Actualmente se desempeña como Ayudante Diplomado *ad honorem* en el Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal en el Hospital de Pequeños Animales de la UNLP, en el área de Clínica Reproductiva y como Ayudante Diplomado, dedicación simple en la Cátedra de Bioquímica.

En el año 2013 fue becada por concurso de la UNLP para iniciar tareas de investigación en una beca para alumnos universitarios continuando, en el año 2014 con una Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas para alumnos universitarios. En el año 2015 fue becada por concurso de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires-CIC para continuar con sus primeros pasos en la investigación a través de una Beca de Entrenamiento para alumnos. Más tarde, en el año 2016, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) le otorgó una Beca interna Doctoral para comenzar sus estudios de posgrado e iniciar así el Doctorado en Ciencias Veterinarias en el área de Reproducción de Pequeños Animales. Comenzando a

desarrollar su Tesis Doctoral en esta Facultad bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Stornelli. y la codirección de la Dra. Romina Nuñez Favre en la Cátedra y Servicio de Reproducción Animal. A partir de entonces ha desarrollado tareas de investigación y docencia publicando varios trabajos científicos y de divulgación técnica en diversos tópicos relacionados con la reproducción, aplicación de biotecnologías reproductivas y control reproductivo en animales de compañía. Una vez finalizada la tesis, planea continuar con su labor en docencia e investigación con una beca Posdoctoral de CONICET.

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS DEL PLASMA SEMINAL

MEDIANTE ELECTROFORESIS

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- **Soluciones stock**

A) Acrilamida- Bis acrilamida (30-08)

Acrilamida	30 g
Bis acrilamida	0,8 g
Agua c.s.p.	100 ml

Preparar en vaso de precipitado o Erlenmeyer graduado; agitar hasta disolución, retirar el imán y completar el volumen. Guardar a 4° C protegida de la luz.

B) Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (Solución B)

Tris	8,15 g
HCl c.s.p.	pH 8,8
Agua c.s.p.	100 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua. Ajustar el pH con HCl puro, retirar el imán y completar el nivel de agua indicado. Guardar en frascos rotulados a 4°C.

C) Buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (Solución C)

Tris	3 g
HCl c.s.p.	pH 6,8
Agua c.s.p.	50 ml

Disolver el Tris en la mitad del volumen final de agua en un Erlenmeyer o vaso de precipitado con imán. Ajustar el pH al valor indicado, retirar el imán y completar el volumen con agua. Guardar en frasco rotulado a 4° C.

D) SDS al 10 %

Disolver 10 g de SDS en 50 ml de agua en Erlenmeyer con agitación, y si es necesario en Baño María a 50° C aproximadamente. Completar el volumen con agua. Guardar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

E) APS al 10%

Se prepara en el momento de usar. Se disuelven 0,02 g de Persulfato de Amonio en 200 µl de agua. La droga pura se guarda en heladera.

F) Buffer para reservorios de corrida, concentración 10x

Tris	30,2 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Agua c.s.p	1000 ml

Solución de trabajo: Utilizar diluida la solución madre en una proporción 1:10 para su uso en la electroforesis (100 ml solución 10X + agua c.s.p. 1000ml)

G) Azul de bromofenol 0,10 %

10 mg de la droga en 10 ml de agua

H) Buffer de siembra

Para condiciones reducidas:

Tris- ClH 1 M pH 6,8	6,25 ml
SDS	2,3 g
2- mercaptoetanol	5 ml
Glicerina	10 ml
Azul de Bromofenol 0,3 %	1 ml
Agua destilada c.s.p	50 ml

Conservar en heladera. Utilizar 1:1 o 1:5 con la muestra. Si se desean condiciones no reducidas se reemplaza el 2- mercaptoetanol por agua.

- **Geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)**

Gel de corrida 15%

Agua ultra pura	2,5 mL
Solución B (Tris ClH pH 8,8)	2,7 mL
Acrilamida-Bisacrilamida (30-08)	5 mL
TEMED	10 µL
APS 30%	50 µL

Gel de siembra	4%	
Agua ultra pura		3 mL
Solución C (Tris CLH pH 6,8)		1,30 mL
Acrilamida-Bisacrilamida (30-08)		0,66 mL
TEMED		5 μ L
APS 30%		20 μ L

Técnica de electroforesis:

Primero preparar el gel de corrida (poliacrilamida al 15%) añadiendo en un vaso de precipitado agua ultra pura, la solución B y la mezcla de acrilamida-bis acrilamida al 30%; la polimerización del gel se inicia al agregar el persulfato amónico (APS 30%) que es un generador de radicales libres, y el reactivo de TEMED, un catalizador de la polimerización. Homogeneizar suavemente y colocar entre los vidrios ocupando dos terceras partes del volumen total, posteriormente añadir agua con el fin de evitar el contacto de la mezcla con el aire favoreciendo así la polimerización. La polimerización del gel se consigue aproximadamente en 20 minutos. Luego preparar el gel de siembra (poliacrilamida al 4%) siguiendo los pasos descritos para el gel de corrida con las indicaciones del gel de siembra y colocarlo entre los vidrios sobre el gel de corrida. Finalmente ubicar el peine, permitiendo dar forma de calles. Una vez gelificado (20 minutos), retirar el peine y limpiar las calles con diferentes tamaños de pipetas para descartar cualquier posible partícula de gel suelta. De esta manera queda el gel de corrida en la parte inferior y el de siembra en la parte superior de los vidrios. Colocar los vidrios conteniendo los geles en la cuba de electroforesis, la cual se llena con el buffer de corrida.

Posteriormente mezclar el plasma seminal (5 μ l por muestra) y el marcador de peso molecular (5 μ l; LMW-SDS Kit; GE Healthcare Life Sciences) con 7 μ l del buffer de

siembra. La mezcla se desnaturaliza a 95°C durante 5 min y luego se centrifuga durante 1 min a 3000 g. El marcador de peso molecular se carga en la primera calle y a continuación las muestras de PS. Una vez finalizada la siembra, conectar el sistema electroforético a una fuente de poder con voltaje constante de 150V por 90 minutos para iniciar de esta manera la electroforesis.

- **Transblot (transferencia a membranas PVDF)**

Buffer de transferencia

Tris base	1,45 g
Glicina	0,7325 g
Metanol	50 ml
Agua destilada c.s.p.	250 ml

Solución de tinción con tinta china

Ácido acético 60,05 g / mol	5 ml
Tinta para pluma fuente Pelikan (Pelikan 17 negro)	0,5 ml
Solución buffer fosfato (1 X)	500 ml
Tween 20	0,05%

Incorporar a la solución salina la tinta china y el tween 20, una vez integrados agregar el ácido acético. Conservar en frasco color caramelo a temperatura ambiente. Agitar antes de usar.

Técnica

Separar el gel de electroforesis de los vidrios, y humedecer con buffer de transferencia. Posteriormente realizar la activación de la membrana de PVDF exponiéndola en metanol, agua destilada y por último en buffer de transferencia (aniónico). Mojar los filtros de papel con el mismo buffer. Luego colocar en el transblot húmedo horizontal (Trans-Blot semi seco, Bio-Rad) los papeles de filtro, el gel, la membrana de PVDF y nuevamente papeles de filtro. Posteriormente conectar a la fuente de poder con voltaje constante de 120 V durante 90 minutos para transferir de esta manera las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF. Una vez transcurrido el tiempo de transferencia, retirar las membranas y dejar secar al aire libre cubriéndolas de la luz.

Por último, observar las bandas de proteína al exponer a las membranas a la tinción con tinta china durante 5 horas.