

Efeitos da sazonalidade sobre espermatozóides epididimários e ejaculados

Efectos de la estacionalidad sobre espermatozoides epididimales y eyaculados

María Alejandra Stornelli

Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; B1900AVW La Plata, Argentina

Resumo

Algumas espécies de animais como equinos, pequenos ruminantes, alguns roedores e os caninos e felinos selvagens apresentam um período de repouso sexual sazonal de duração e intensidade variáveis. Essa sazonalidade está diretamente relacionada às horas diárias de luz (fotoperíodo) a que os animais são submetidos e é evidenciada em localizações geográficas onde ocorrem variações marcantes na duração do dia durante o ano. No felino doméstico (*Felis silvestris catus*) a sazonalidade ovulatória e estral da fêmea é bem documentada e ocorre em dias com mais de 12 horas de luz (primavera-verão). No entanto, a sazonalidade reprodutiva do gato foi definida posteriormente, quando foi observado que, embora os gatos produzam espermatozoides ao longo do ano, a produção de espermatozoides é maior na estação reprodutiva, acompanhando a sazonalidade da fêmea. A utilização desses conhecimentos possibilitaram o controle da reprodução e aplicação da biotecnologia em felinos domésticos. Da mesma forma, tomando o gato doméstico como modelo, os conhecimentos obtidos podem ser aplicados aos gatos selvagens.

Palavras-chave: Sazonalidade reprodutiva, fotoperíodo, gato doméstico

Resumen

Algunas especies de animales como equinos, pequeños rumiantes, algunos roedores y caninos y felinos silvestres presentan un período de reposo sexual estacional de duración e intensidad variable. Esta estacionalidad está directamente relacionada con las horas luz diarias (fotoperíodo) a las que se hallan sometidos los animales y se evidencia en las localizaciones geográficas en las que existen marcadas variaciones en la duración del día durante el año. En el felino doméstico (*Felis silvestris catus*) la estacionalidad ovulatoria y estral de la hembra se halla bien documentada y ocurre durante los días que presentan más de 12 horas de luz (primavera-verano). Sin embargo, la estacionalidad reproductiva del gato ha sido definida más tarde. Es así que se ha observado que, si bien los gatos producen espermatozoides todo el año, la producción espermática es mayor en la estación reproductiva acompañando la estacionalidad de la hembra. Estos hallazgos han permitido utilizar estos conocimientos para el control de la reproducción y aplicación de biotecnología en felinos domésticos. Asimismo, los conocimientos obtenidos pueden ser aplicados a felinos silvestres tomando al gato doméstico como modelo.

Palabras clave: Estacionalidad reproductiva, fotoperíodo, gato doméstico.

Estacionalidad reproductiva:

Influencia del medio ambiente y regulación endocrina

Los diferentes ambientes en los que habitan los animales están sometidos a fluctuaciones climáticas y variaciones en las horas de luz diaria. Es así que los animales que habitan regiones con diferencias marcadas en la cantidad de horas luz diarias a lo largo del año muestran cambios cílicos en su fisiología y comportamiento. El principal cambio adaptativo se observa en la función reproductiva, la cual se presenta en el momento del año en el cual es posible a posteriori cubrir las demandas energéticas más altas (fines de la gestación, parto, lactancia y destete). En zonas templadas, las mencionadas condiciones medioambientales ocurren en primavera y principios de verano. En tanto, en regiones tropicales y áridas estas condiciones están asociadas principalmente a la temporada de lluvia.

¹Correspondência: astornel@fcv.unlp.edu.ar
Recebido: 15 de outubro de 2021

ACEITO: 28 de dezembro de 2021

La influencia de los factores ambientales sobre la regulación de la actividad sexual de mamíferos ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se sabe que la estacionalidad reproductiva en especies que habitan zonas templadas, está regida por el fotoperiodo, es decir por la variación en la cantidad de horas luz diarias a través del año. Es así, que los animales presentan períodos de actividad sexual seguidos por períodos de reposo, de duración e intensidad variable regulados por el fotoperiodo. Se ha comprobado que el mecanismo por el cual el fotoperiodo regula la actividad reproductiva en animales de zonas templadas se encuentra relacionado estrechamente con la secreción de melatonina por la glándula pineal. De esta forma la cantidad de horas de luz diaria es captada a nivel ocular y determina el ciclo diario de secreción de melatonina desde la glándula pineal. La secreción nocturna de esta hormona refleja la duración de la noche, regulando así la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) desde el hipotálamo. Así mismo las variaciones en la secreción de GnRH inducen variaciones en la secreción de hormona luteinizante (LH) responsable de la presencia o ausencia de ovulación en la hembra, y de variaciones en la producción espermática en el macho. Un cambio en la duración del tiempo de liberación de melatonina durante la noche, relacionado con la estación del año, estimula o frena el pulso de GnRH, la cual activa o suprime la liberación de LH y hormona folículo estimulante (FSH) hipofisarias, según la especie sea fotoperiodica positiva o negativa. La estimulación o inhibición en la liberación de gonadotrofinas está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo con sus productos finales de secreción (inhibina y testosterona) (Bronson 1909, Claustre 2005, Malpaux 2006, Malpaux 1996, Vieytes 1995).

Si bien la estacionalidad reproductiva se encuentra claramente definida en la hembra felina desde hace décadas, hace relativamente pocos años que algunos investigadores sugirieron la influencia del fotoperiodo sobre la fisiología reproductiva de los machos (Axner 2007, Blottner 2007, da Silva 2006, Reyna 2006, Stornelli 2007). A fines de la década de los noventa, algunos autores comunicaron la ausencia de estacionalidad reproductiva en el gato (Spindler 1999, Tsutsui 2009, 1990). Sin embargo, estudios posteriores sugirieron una producción espermática estacional en machos felino (Axner 2007, Blottner 2007, Stornelli 2007).

Así como ocurre en otras especies fotoperiodicas, los felinos domésticos muestran espermatoformación y desarrollo de la hilera seminal durante todo el año. Sin embargo, el porcentaje de túbulos con desarrollo completo de la hilera seminal varía en relación al fotoperiodo, hecho que se refleja en variaciones de los parámetros seminales (Stornelli 2009, Nuñez Favre 2012). Ya en la década del 80, Johnstone observó un aumento en el volumen seminal en eyaculados realizados durante la temporada reproductiva (Johnstone 1984). Veinte años más tarde, la estacionalidad reproductiva en el gato doméstico fue sugerida por algunos autores quienes comunicaron que la cantidad y calidad de espermatozoides epididimales fue significativamente mayor en muestras provenientes de epidídimo de gatos castrados en días de más de 11 horas luz (Tittarelli 2004, Stornelli 2004). Dos años más tarde Reyna et al mostraron la ocurrencia de variaciones en la cantidad de espermatozoides testiculares en relación con la época del año y el fotoperiodo. En concordancia con estos resultados, Blottner observó que, si bien en todas las estaciones se mantiene la capacidad de producir semen, existieron variaciones en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides obtenidas en cada testículo en animales castrados durante la primavera comparado con animales castrados en otoño-invierno. Conjuntamente se encontraron diferencias en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales (Blottner 2007). En concordancia un estudio retrospectivo sobre morfología espermática realizado en Suecia, evidenció que el porcentaje de espermatozoides normales fue mayor en muestras seminales de gatos tomadas en ascenso lumínico (Axner 2007). Similares resultados fueron hallados en Argentina, en donde también se observaron variaciones estacionales en el desarrollo de la hilera seminal en gatos adultos castrados durante diferentes épocas del año, encontrándose un mayor porcentaje de túbulos con desarrollo completo de la hilera seminal durante los meses con mayor cantidad de horas luz diaria (Stornelli 2009).

La estacionalidad reproductiva conjuntamente con el alto porcentaje de morfo anomalías espermáticas presentes en gatos sanos y fértiles ha complicado la definición de los parámetros seminales del espermograma normal (Axner 2007, Wildt 1983, Howard 1990). Algunos autores han encontrado alrededor de 40% de espermatozoides morfológicamente normales en gatos mestizos (Axner 2007, Howard 1990). Además, existe gran variabilidad entre diferentes gatos y entre muestras del mismo animal cuando se utiliza electroeyaculación (Pineda 1984, Zambelli 2006). Este hecho adquiere gran importancia al estimar los parámetros seminales normales para cada animal en particular, habiendo sido sugeridas al menos cinco evaluaciones repetidas en el tiempo para evaluar la fertilidad de un gato (Johnstone 1984).

Un estudio reciente realizado con 43 gatos castrados en las últimas dos semanas de cada estación del año ha mostrado que los animales castrados en épocas con días en ascenso lumínico (invierno-

primavera) presentaron un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de membrana plasmática íntegra significativamente mayor a los gatos castrados en descenso lumínico (verano-otoño; Nuñez Favre 2012 Nuñez Favre 2015). En concordancia, los animales castrados en ascenso lumínico mostraron una tendencia a tener un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y una mayor cantidad de espermatozoides totales comparados con aquellos castrados en descenso lumínico (Nuñez Favre 2012).

En estudios realizados en la última década, las variaciones observadas en la calidad de los espermatozoides recuperados a través del año mostraron acompañar cambios histológicos testiculares (Nuñez Favre 2012, Stornelli 2009). Si bien en todas las estaciones se evidenciaron túbulos seminíferos con diferentes grados de maduración, los animales castrados durante ascenso lumínico mostraron una mayor proporción de túbulos con espermátides maduras en comparación con los animales castrados en días con descenso lumínico (Stornelli 2009)- De manera inversa, en épocas con descenso lumínico se encontró una mayor proporción de túbulos con espermátides inmaduras (Stornelli 2009). Así mismo, los animales castrados durante ascenso lumínico presentaron una mayor cantidad de células intersticiales de Leydig por campo, en comparación con los animales castrados en descenso lumínico. Sin embargo, la concentración de testosterona sérica no mostró variaciones en los períodos evaluados (Stornelli 2009).

En el gato doméstico se ha demostrado que la producción diaria de espermatozoides por gramo de testículo es de 16 millones y el peso promedio de cada testículo es de 1,2 gramos (Franca 2003). En el epidídimo se produce la maduración espermática, y el almacenado en la cola del epidídimo de los espermatozoides maduros para ser eyaculados (Axner 2006). Durante el pasaje por el epidídimo, la mayor parte del fluido testicular, rico en Na-Cl es reabsorbido e intercambiado por K con el fin de deshidratar y estabilizar la membrana del espermatozoide, ya que las altas concentraciones de Na promueven la capacitación y la reacción acrosómica (Axner 2006). Las células epididimales también producen y secretan fosfatasa alcalina, la cual puede utilizarse para identificar un eyaculado incompleto, conteniendo solo fluido proveniente de las glándulas accesorias, diferente de un eyaculado completo, que contiene fluido epididimal (Axner 2006, Valiente 2014). El epidídimo presenta un epitelio seudoestratificado en el cual pueden observarse tres tipos celulares (células principales, apicales y basales). En el gato doméstico, las células principales se dividen en células claras y oscuras (Reyna 2008). En invierno, se ha evidenciado una menor proporción de células oscuras y mayor de células claras, mientras que la situación inversa se observó durante los días de verano-otoño (Reyna 2008). Este hecho sugiere una mayor actividad celular epididimal, relacionada con la producción de factores implicados en la maduración espermática, en la etapa de mayor producción de espermatozoide (Reyna 2008). En concordancia con este hecho, se ha observado que epidídimos de animales castrados durante los meses de primavera y verano presentaron un mayor porcentaje de células PAS positivas (Savignone 2007). Estos hallazgos muestran una mayor producción de mucopolisacáridos en la estación del año con días más largos sugiriendo una mayor actividad secretora del epidídimo en concordancia con la época de mayor producción espermática (Savignone 2007).

Refractariedad al estímulo lumínico:

En algunos animales fotoperiodicos como ovinos y caprinos además de estacionalidad en la actividad reproductiva también se ha evidenciado un fenómeno de insensibilidad al estímulo lumínico constante denominado foto-refractariedad (Chemineau 1992, Aisen 2004). El mismo, se manifiesta luego de mantener a los animales durante períodos prolongados a una cantidad fija de horas luz diaria. La alternancia mensual entre días cortos y largos es usada en carneros y chivos en centros de inseminación artificial, para inhibir el efecto foto-refractario obteniendo semen todo el año sin variaciones en la calidad espermática ni en la fertilidad (Almeida 1984, Chemineau 1992). Este fenómeno de foto-refractariedad se ha observado también en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*; Stetson 1977, Stetson 1981, Stetson 1983) El fenómeno foto-refractario comunicado en otras especies fue observado también en gatos machos. Se ha demostrado que gatos mantenidos durante 18 meses con fotoperiodo estimuladorio (12 horas Luz-12 horas Oscuridad) mostraron el fenómeno de foto-refractariedad (Nuñez Favre 2012). En el mencionado estudio pudo observarse una disminución en la calidad seminal en todos los parámetros evaluados (motilidad, vigor, volumen, concentración espermática, cantidad de espermatozoides totales, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) manteniendo los animales una producción espermática basal. Estos animales fueron sometidos a fotoperíodo corto (8 horas de luz diarias) durante 2 meses después de los cuales retornaron a fotoperíodo largo. Con este manejo lumínico todos los animales

mostraron una significativa mejora de los parámetros seminales evaluados. De esta forma al igual que en otras especies estacionales la disminución en la calidad seminal inducida por un prolongado periodo estimulatorio pudo ser revertida por el cambio a días cortos. Esto indica que para mantener una buena calidad seminal en gatos es necesario realizar un manejo lumínico adecuado para inhibir el efecto foto-refractario (Nuñez Favre 2012).

La relación entre la fisiología reproductiva y el fotoperiodo en felinos ha llevado a la administración exógena de melatonina para el control reproductivo. El uso de implantes de melatonina de 18 mg logró suprimir de forma reversible la ocurrencia de celo en la gata, no afectando la fertilidad posterior. En machos un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg, produjo disminución de los parámetros seminales, no observándose diferencias en la concentración sérica de testosterona (Nuñez Favre 2014). Se redujo la producción espermática, en forma similar a la disminución en la producción y calidad espermática durante la temporada no reproductiva. Impulsados por los estudios realizados sobre calidad seminal y fotoperiodo, recientemente se han realizados trabajos que han mostrado que las concentraciones de colesterol y triglicéridos del plasma seminal se correlacionan con la calidad del semen (García 2019). El semen de mejor calidad mostró concentraciones significativamente más altas de colesterol y triglicéridos. Asimismo, se ha identificado una proteína de 14,4 kDa en el plasma seminal de eyaculados de buena calidad no presente en el plasma seminal de eyaculados de mala calidad lo cual podría ser un valioso marcador de calidad seminal (García 2019). Por otra parte la proteína de 14.4 kDa podría estar relacionada con la presencia de β -NGF en plasma seminal de gato, factor ya descripto en otras especies de ovuladores inducidos (García 2019, Ratto 2012). En relación con estos hallazgos se comunicó el efecto ovulatorio del plasma seminal felino administrado por vía parenteral lo cual sugiere que el semen del gato doméstico presentaría un factor inductor de la ovulación (Nuñez favre 2021). Los estudios realizados en los últimos años han permitido aclarar los conocimientos sobre la fisiología reproductiva en felinos machos y han abierto nuevas perspectivas en el manejo productivo y reproductivo felino.

Bibliografía

- Aisen EG.** Reproducción Ovina y Caprina, 1º. Inter-Médica. Buenos Aires, p.1-10, 2004.
- Almeida OF, Lincoln, GA.** Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. *Biol Reprod*, 30(1), p.143-58, 1984.
- Axner E. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66 (1), p.14-24, 2006
- Axner E, Linde Forsberg C.** Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Domest Anim*, 42 (3), p.282-91, 2007.
- Blottner S, Jewgenow K.** Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim*; 42 (5), p.536-40, 2007.
- Bronson F.** Mammalian Reproductive Biology, The University of Chicago Press. Chicago, 1989
- Chemineau PB, Malpaux, et al.** Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci* (30), p.157-184, 1992.
- Claustrat B, Brun J,Chazot G.** The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*; 9 (1), 11-24, 2005.
- da Silva TF, da Silva LD, Uchoa DC, Monteiro CL, de Aguiar Thomaz L.** Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. *Theriogenology*, 66 (6-7), p.1476-81, 2006.
- Franca LR, Godinho CL.** Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*, 68(5), p.1554-61, 2003.
- García MF, Nuñez Favre N, Stornelli MC, Rearte R, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA.** Relationship between semen quality and seminal plasma cholesterol, triacylglycerols and proteins in the domestic cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Noviembre 2019 <https://doi.org/10.1177/1098612X19889072>
- 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*, 11(3), p.204-15, 1990.
- Johnstone I.** Electroejaculation in the domestic cat. *Aust Vet J* 1984; 61 (5): 155-8.
- Malpaux B, Viguie C, Thiery J, Chemineau P.** Controle photopériodique de la reproduction. in INRA Prod. Anim, 1996.
- Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P.** Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*, 39 (3), p.355-66, 1999.

- Malpaux B.** Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third. Elsevier Inc. USA, p.2231-2282, 2006.
- 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*, 47 Suppl 6, p.232-4, 2012.
- 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*, 47 Suppl 6, p.235-7, 2012.
- Nuñez Favre R, Bonaura MC, Praderio R, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA.** Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Theriogenology*, 82, p.851-856, 2014.
- 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*, 17(2), 10-15, 2015.
- Nunez Favre R, García MF, Ratto MH, Rearte R, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA.** Effect of cat seminal plasma and purified llama ovulation-inducing factor (b-NGF) on ovarian function in queens. *Theriogenology*, 169 p.29-35, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.008>
- Pineda MH, Dooley, MP, et al.** Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res*, 45(5), p.1038-1041, 1984.
- Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, et al.** The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, p.15042-15047, 2012.
- 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. in X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas. 2006 Tandil, Buenos Aires.
- Reyna JC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Guzzetti J, García Mitacek MC, Stornelli MA.** Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico. in IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. 2008 Santa Fe.
- Savignone CA, Reyna JC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA.** Presencia de mucopolisacaridos en el epitelio epididimal del gato doméstico en diferentes épocas del año. in XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 2007.
- Spindler RE, Wildt DE.** Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. *Biol Reprod*, 61 (1), p.188-94, 1999.
- Stornelli MA.** Basic and advanced evaluation of cat's semen. *Brazilian J Anim Reprod*, (31), p.135-140, 2007.
- Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Reyna JC, de la Sota RL.** Influencia del fotoperíodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. in I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos. 2004 Corrientes.
- 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*, 44, Suppl 2, p.287-90, 2009.
- Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Matt KS.** Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements. *J Exp Zool*, 202 (1), p.81-8, 1977.
- Stetson MH, Tate-Ostroff B.** Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of golden hamsters. *Gen Comp Endocrinol*, 45 (3), p.329-44, 1981.
- Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Tate-Ostroff B.** Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters. *Biol Reprod*, 29 (3), p.689-96, 1983.
- 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. in VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal. 2004 La Pampa.
- Tsutsui T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A, Stabenfeldt GH.** Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. *Nippon Juigaku Zasshi*, 52 (4), 801-6, 1990.
- Tsutsui T, Onodera F, Oba H, Mizutani T, Hori T.** Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, p.291-3, 2009.
- Valiente C, de la Sota P, Arauz S, Gobello MC.** Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. *Journal of Feline Medicine*



- and Surgery, 16 (4), p.312-316, 2014.
- Vieytes M.** Fisiología veterinaria, 1. Interamericana McGraw-Hill. Nueva York, p.696-706, 1995.
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ.** Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. Biol Reprod, 29 (4), p.1019-25, 1983.
- Zambelli D, Cunto M.** Semen collection in cats: techniques and analysis. Theriogenology, 66 (2), p.159-65, 2006.
-