

## EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FLUIDO PROSTÁTICO AUTÓLOGO Y HETERÓLOGO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN CANINO

### EFFECT OF ADDING AUTOLOGOUS OR HETEROLOGOUS PROSTATIC FLUID ON CANINE SPERM QUALITY

Alfonso Sánchez R.<sup>1,2</sup>, Cristóbal Bravo V.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la adición de fluido prostático autólogo o heterólogo al semen canino incubado a 38 °C (termorresistencia) sobre la motilidad y vigor espermático. Se colectaron 15 eyaculados de perros Bulldog inglés adultos, mediante manipulación digital, recuperando por separado la fracción espermática y las fracciones prostáticas. Estas últimas fueron procesadas y conservadas a -18 °C. Se hizo un espermiograma a cada eyaculado y se fraccionaron en tres partes de 0.5 ml, agregándoseles 1 ml de fluido prostático autólogo, fluido prostático heterólogo o suero fisiológico. Las muestras fueron incubadas a 38 °C por 60 minutos, haciendo mediciones de motilidad progresiva y vigor espermático a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados mostraron una disminución lineal de ambos parámetros con el tiempo de incubación en los tres medios, sin haber diferencia estadística entre medios o entre tiempos de incubación. Se concluye que la motilidad progresiva y el vigor espermático de semen canino diluido con fluido prostático autólogo o heterólogo fueron similares al semen diluido con suero fisiológico.

**Palabras clave:** semen canino, fluido prostático, termorresistencia espermática

#### ABSTRACT

The effect of adding autologous or heterologous prostatic fluid in canine sperm and incubated at 38 °C (thermoreistance) on sperm motility and spermatoc vigor was evaluated. Fifteen ejaculates were collected from mature English bulldog by digital manipulation. The sperm fraction and the prostatic fractions were kept separated during the collection. Prostatic fluids were processed and stored at -18 °C. An spermiogram was done for each

<sup>1</sup> Hospital Clínico Veterinario, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Viña del Mar, Chile

<sup>2</sup> E-mail: profesanchez@gmail.com

Recibido: 14 de marzo de 2013

Aceptado para publicación: 27 de mayo de 2013

ejaculate and then distributed in three aliquots of 0.5 ml and added 1 ml of autologous prostatic fluid, heterologous prostatic fluid or saline solution. The samples were incubated at 38 °C for 60 minutes measuring the progressive motility and spermatic vigor at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes. The results showed a lineal decreased for both parameters during the evaluation period, and without statistical difference between treatments or times of incubation. It is concluded that the progressive motility and spermatic vigor of canine semen diluted with prostatic fluid either analogous or heterologous were similar to those on saline solution.

**Key words:** canine semen, prostatic fluid, spermatic thermal resistance

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, dado que la crianza de perros es una afición y mercado de distribución mundial, la adecuada evaluación de los reproductores y del semen, la preservación del esperma y la inseminación artificial (IA) se han constituido en temas de alto interés, tanto para médicos veterinarios como para criadores.

En la mayoría de especies de interés zootécnico, la IA es una biotecnología empleada fundamentalmente para acelerar el mejoramiento genético; sin embargo, en la reproducción canina tiene, además, una serie de aplicaciones clínicas, destacándose como una herramienta para la solución de problemas físicos en el apareamiento, característicos de razas tales como el Bulldog Inglés (Sánchez *et al.*, 2006). La IA se ha convertido en una práctica habitual en el manejo reproductivo canino, reportándose que alrededor del 65% de las inseminaciones se realizan con semen recién recolectado y depositado con un catéter a nivel vaginal (Linde-Forsberg, 2006).

El volumen del eyaculado canino varía de acuerdo al tamaño de los reproductores, y fluctúa entre 1 y 40 ml. Presenta tres fracciones, siendo la primera y la tercera de origen prostático y la segunda es la fracción rica o espermática que contiene a los espermatozoides. Hasta el 90% del volumen total del eyaculado puede estar constituido por fluido prostático (Farstad, 2010).

El volumen de semen apropiado para realizar la IA se encuentra entre 2 y 8 ml. En aquellos casos en que el volumen seminal sea pequeño, como puede ocurrir con razas pequeñas o en machos con alteraciones prostáticas, se recomienda incorporar un diluyente seminal o fluido prostático a la segunda fracción del eyaculado (Linde-Forsberg, 2006).

En la clínica reproductiva, especialmente en la valoración andrológica y para la IA, se debe evaluar la calidad seminal para determinar la fertilidad potencial de los reproductores. En el caso del canino, al igual que en otras especies, se consideran parámetros tales como motilidad progresiva, morfología espermática y concentración espermática (Root Kustritz, 2007). No obstante, uno de los desafíos para el trabajo de terreno o en la clínica diaria es la búsqueda de técnicas simples de evaluación. Una prueba sencilla y de bajo costo es la prueba de termorresistencia espermática, desarrollada por Dimitropulus (1967) para la valoración de la fertilidad potencial de espermatozoides bovinos.

Considerando la posibilidad de aumentar el volumen de las dosis de semen sin alterar la calidad espermática, el presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de la adición de fluido prostático autólogo, fluido prostático heterólogo y suero fisiológico al semen canino incubado a 38 °C (termorresistencia) sobre la motilidad espermática.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de Semen

El estudio se realizó en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Santo Tomás, Sede Viña del Mar, Chile. Se utilizaron cinco canes machos adultos de la raza Bulldog Inglés, clínicamente sanos. Los canes tenían entre 1.5 a 3.5 años y  $25.7 \pm 2.7$  kg de peso corporal.

Se colectó un total de 15 eyaculados. El semen se recolectó mediante el método de manipulación digital en un vaso temperado a 38 °C. La fracción espermática y el fluido prostático fueron recuperados en vasos colectores distintos.

### Espermiograma

Los eyaculados fueron evaluados según el procedimiento descrito por England y Allen (1989) y Sánchez *et al.* (2006), registrándose volumen, color, pH, motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides con movimiento de avance progresivo), vigor espermático (intensidad del movimiento, medido en una escala de 0 a 5, donde 0: sin movimiento, 5: fuerte movimiento de avance), vitalidad espermática, concentración y morfología espermática.

### Fluido Prostático

Se hicieron colectas previas de semen para la obtención de fluido prostático, obteniéndose de la tercera fracción del eyaculado entre 3 y 5 ml de cada macho. Una vez colectado, el fluido prostático fue depositado en tubos plásticos estériles y centrifugados a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó a través de un filtro de membrana para jeringa de 25 mm de diámetro y poros de 0.45  $\mu$ m. El filtrado se transfirió en volúmenes de 1 ml a microtubos y se almacenó a -18 °C (Nöthling y Volkmann, 1993).

Para los fines de este estudio, se considera como fluido prostático autólogo (FPA) aquel que corresponde al mismo dador de la fracción espermática y fluido prostático heterólogo (FPH) aquel que corresponde a un dador distinto al de la fracción espermática.

### Preparación de las Muestras

Previo a la obtención de cada eyaculado se descongeló un vial de FPA y otro de FPH. Para esto, los viales fueron puestos en baño maría a temperatura controlada de 37 °C por 5 min.

Cada fracción espermática colectada ( $n=15$ ) se dividió en tres alícuotas de 0.5 ml cada una y depositadas en tubos de microcentrifugado. Se agregó 1 ml de FPA, FPH o suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9 %) en las alícuotas correspondientes. La concentración espermática en cada muestra diluida a incubar (1.5 ml) fluctuó entre  $125 \times 10^6$  y  $175 \times 10^6$  espermatozoides.

### Prueba de Termorresistencia Espermática

Las muestras fueron incubadas por una hora en un baño controlado a 38 °C, adaptando la técnica original (Dimitropulus, 1967). La motilidad progresiva y el vigor espermático fueron evaluados inmediatamente después de realizada la dilución de la fracción espermática (tiempo 0) y a los 15, 30, 45 y 60 minutos. La evaluación de la motilidad se realizó en forma paralela en cada tiempo para las tres muestras de cada eyaculado, tomando una gota de cada dilución y colocándola sobre un portaobjeto temperado a 38 °C. Las muestras fueron observadas en un microscopio de campo claro, con objetivos de 40X y 100X y un ocular de 10X.

### Análisis Estadístico

Los datos fueron transformados a valores angulares (ángulo =  $\arccos(x)$ ) para llevarlos a la distribución normal (Zar, 1999).

Se empleó el análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas en la motilidad espermática según el tiempo de incubación (0, 15, 30, 45 y 60 min) y la prueba de Tukey para determinar diferencias entre tratamientos. Asimismo, se hizo el análisis de correlación de Pearson para la comparación en los tiempos de evaluación. Se trabajó con el programa estadístico Prism® v. 3.0.

## RESULTADOS

Los machos respondieron satisfactoriamente al método de extracción de semen y las variables seminales se ubicaron dentro de los rangos descritos como normales para la especie (Cuadro 1) (England y Allen, 1989; Root Kustritz, 2007).

En la prueba de termorresistencia espermática, la motilidad progresiva y el vigor espermático mostraron una disminución lineal según el tiempo de incubación en los tres medios utilizados como dilutores ( $p < 0.05$ ), sin haber diferencia significativa entre dilutores (Cuadros 2 y 3). No obstante, cabe destacar que la motilidad progresiva en los esper-

matozoides incubados con suero fisiológico fue levemente superior a la motilidad observada con fluido prostático en todos los tiempos de incubación (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

La prueba de termorresistencia espermática tiene por principio la exposición de los espermatozoides a las condiciones fisiológicas de temperatura del tracto genital femenino, a fin de estimar su capacidad de mantener la motilidad espermática (Dimitropulus, 1967). La temperatura intravaginal canina fluctúa entre 37.5 y 38.5 °C (Maeder *et al.*, 2012). En la deposición del semen a través de la monta natural o inseminación intravaginal tradicional, los espermatozoides se encuentran expuestos a dichas temperaturas hasta que ocurra la migración hacia las porciones anteriores del tracto genital (England *et al.*, 2006). En este proceso, el fluido prostático como componente del plasma seminal tiene, entre otras funciones, facilitar el avance de los espermatozoides y protegerlos de las condiciones adversas del ambiente vaginal (Farstad, 2010).

Cuadro 1. Características de semen fresco (n=15 eyaculados) de cinco perros Bulldog Inglés sexualmente activos

Variable seminal	Promedio	Desviación estándar
Volumen (ml)	2.6	0.5
pH	6.5	0.3
Concentración espermática ( $\times 10^6$ /ml)	328	30.7
Espermatozoides totales ( $\times 10^6$ )	626	158.2
Motilidad progresiva (%)	85	5.1
Vigor espermático (0-5)	4.6	0.5
Espermatozoides vivos (%)	92.9	1.8
Espermatozoides normales (%)	85.1	3.6

Cuadro 2. Motilidad progresiva (%) (media  $\pm$  d.e.) de espermatozoides caninos diluidos en suero fisiológico, fluido prostático autólogo o heterólogo e incubados a 38 °C (n=15 eyaculados)

Tiempo de incubación (minutos)	Suero fisiológico	Fluido prostático autólogo	Fluido prostático heterólogo
0	85.4 $\pm$ 4.8	85.2 $\pm$ 5.8	85.0 $\pm$ 5.0
15	79.0 $\pm$ 7.9	78.5 $\pm$ 8.1	76.2 $\pm$ 8.5
30	70.0 $\pm$ 10.2	68.7 $\pm$ 10.8	65.1 $\pm$ 11.0
45	60.1 $\pm$ 12.4	57.8 $\pm$ 13.1	52.4 $\pm$ 12.8
60	50.3 $\pm$ 14.2	48.8 $\pm$ 15.3	46.5 $\pm$ 16.0

Cuadro 3. Vigor espermático<sup>1</sup> (media  $\pm$  d.e.) de espermatozoides caninos diluidos en suero fisiológico, fluido prostático autólogo o heterólogo e incubados a 38 °C (n=15 eyaculados)

Tiempo de incubación (minutos)	Suero fisiológico	Fluido prostático autólogo	Fluido prostático heterólogo
0	4.5 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.5
15	4.2 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.6
30	3.6 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.5
45	3.2 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.4
60	2.7 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6

<sup>1</sup> Intensidad del movimiento espermático individual (0-5). 0: sin movimiento, 1: movimiento de flagelo sin avance, 2: movimiento en círculo, 3: avance sinuoso y lento, 4: avance moderado, 5: avance fuerte

Los medios empleados en el presente estudio fueron ensayados para comparar su capacidad de favorecer o proteger a los espermatozoides en el tracto genital femenino y proponerlos como opción para aumentar el volumen de las dosis de semen en la IA. Los resultados mostraron un comportamiento similar de los tres medios durante los 60 minutos de la prueba de termorresistencia, indicando la ausencia de un efecto positivo sobre la motilidad progresiva y el vigor espermático del fluido prostático adicional que fuera empleado como diluyente. Por otro lado,

la disminución de estos parámetros durante el proceso de incubación podría atribuirse a un rápido agotamiento del oxígeno disponible dado el metabolismo aeróbico de los espermatozoides (O'Connell *et al.*, 2002).

En la práctica de la IA con semen fresco es habitual coleccionar la fracción espermática y parte de la tercera fracción del eyaculado con el propósito de aumentar el volumen de las dosis de semen (Linde-Forsberg, 2006). En el presente estudio, la adición de un mayor volumen de fluido prostático, autólogo o

heterólogo, no mejoró la motilidad ni el vigor espermático en comparación con el uso de suero fisiológico.

La función precisa del fluido prostático canino en el tracto reproductor de la hembra es una interrogante y además, motivo de controversia (England *et al.*, 2012). Es poco lo que se conoce sobre el efecto del fluido prostático en la función espermática, tanto en semen fresco como en semen refrigerado o congelado (Farstad, 2010). England (1993) y Rota *et al.* (1995) describen un detrimento significativo de la motilidad progresiva de espermatozoides almacenados con fluido prostático en condiciones de congelación y refrigeración, respectivamente, recomendando el fraccionamiento y centrifugación del semen a fin de eliminar el plasma seminal. Sin embargo, Nöthling y Volkmann (1993) y Nöthling *et al.* (2005) destacan que la incorporación de fluido prostático autólogo al semen congelado-descongelado mejora las características de motilidad progresiva y la fertilidad del mismo. Asimismo, Hori *et al.* (2009) trabajando con espermatozoides epididimarios caninos recuperados con fluido prostático y England *et al.* (2012) utilizando fluido prostático en semen descongelado para inseminaciones transcervicales describen un efecto positivo sobre la calidad espermática y la fertilidad.

## CONCLUSIONES

La motilidad progresiva y el vigor espermático de semen canino diluido con fluido prostático autólogo o heterólogo fueron similares al semen diluido con suero fisiológico en la prueba de termoresistencia.

## LITERATURA CITADA

1. **Dimitropulus E. 1967.** La signification du test de la thermoresistance dans l'application de la valeur fecondante du sperme congelé. *Ann Med Vet* 4: 215-224.
2. **England G. 1993.** Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert (Suppl 47)*: 243-255.
3. **England G, Allen W. 1989.** Seminal characteristics and fertility in the dog. *Vet Rec*: 125: 399.
4. **England G, Burgess C, Freeman S, Pacey A. 2006.** Relationship between the fertile periods and sperm transport in the bitch. *Theriogenology* 66: 1410-1418.
5. **England G, Moxon R, Freeman S. 2012.** Stimulation of mating-induced contractions in the bitch and their modification and enhancement of fertility by prostatic fluid. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl 6): 1-5.
6. **Farstad W. 2010.** Artificial insemination in dogs. In: England G, von Heimendahl A (eds). *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology*. 2<sup>nd</sup> ed. England: British Small Animal Veterinary Association. p 80-88.
7. **Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T. 2009.** Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci* 7: 811-815.
8. **Linde-Forsberg C. 2006.** Inseminación artificial. En: Wanke M, Gobello C (eds). *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Buenos Aires: Inter-Médica. p 175-194.
9. **Maeder B, Arlt S, Burfeind O, Hewieser W. 2012.** Application of vaginal temperature measurement in bitches. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl 6): 359-361.
10. **Nöthling J, Volkmann D. 1993.** Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J Reprod Fert (Suppl 47)*: 329-333.
11. **Nöthling J, Shuttleworth R, de Haas K, Thompson P. 2005.** Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology* 64: 975-991.

12. **O'Connell M, McClure N, Lewis S. 2002.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17: 704-709.
13. **Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. 1995.** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44: 885-900.
14. **Root Kustritz M. 2007.** The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 68: 329-337.
15. **Sánchez A, Cartagena A, Berland M. 2006.** Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet Perú* 17: 1-7.
16. **Zar J. 1999.** *Biostatistical analysis*. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall. 929 p.