

Miglioramento dei parametri seminali in cani ipo- e normo-fertili in seguito a supplementazione alimentare con L-arginina

RIASSUNTO

Tra le numerose cause alla base dell'ipofertilità maschile, le carenze aminoacidiche e vitaminico-minerali costituiscono riconosciute cause di alterazioni spermatiche sia nella specie umana che in medicina veterinaria. La motilità degli spermatozoi costituisce un importante presupposto per la loro funzionalità, tanto che, in condizioni fisiologiche, la motilità e la capacità fecondante risultano strettamente correlate. Diversi studi hanno dimostrato l'effetto positivo della supplementazione dietetica con L-arginina sulla motilità degli spermatozoi in diverse specie animali. Lo scopo di questo studio è stato valutare il possibile effetto della supplementazione alimentare con L-arginina sulle caratteristiche seminali in cani adulti con sospetta ipofertilità da oligo/asteno/teratozoospermia e in cani di provata fertilità con spermogramma normale. La supplementazione dietetica con L-arginina per 62 giorni ha portato a un significativo ($p < 0,0001$) miglioramento della motilità (da 44% a 58%) e della morfologia spermatica (da 40% a 69%) nel gruppo di cani ipo-fertili e un significativo aumento ($p < 0,001$) della motilità nei cani normo-fertili con spermogramma normale. L'ottenuto miglioramento di alcuni parametri seminali rende la supplementazione con L-arginina un promettente strumento per la gestione dell'ipofertilità maschile nel cane, anche se l'indagine andrebbe approfondita tenendo in considerazione anche l'eventuale effetto legato alla razza e all'età dei soggetti trattati.

**M.C. Pisu¹, A. Rota²,
M. Cavestro³, M.C. Veronesi⁴**

¹ Vierreci, Torino

² Ambulatorio Associato Pellegrini-Rota, Almenno San Bartolomeo (BG)

³ Marpet s.r.l. Albaredo D'Adige (VR)

⁴ Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE

Negli animali domestici, come nell'uomo, il successo del processo riproduttivo dipende da fattori legati alla coppia, dove risulta essenziale la fertilità non solo della femmina, ma anche del maschio.

Nell'uomo l'infertilità maschile costituisce un problema in continuo aumento, almeno nei paesi più industrializzati, dove interessa circa il 7,5% della popolazione maschile con un frequente riscontro di una scadente qualità del seme. In circa il 60% dei casi l'ipofertilità è idiopatica o attribuibile a forme di oligo-asteno-teratozoospermia¹.

Tra le numerose cause dell'ipofertilità maschile, le carenze aminoacidiche e vitaminico-minerali costituiscono un riconosciuto motivo di alterazioni spermatiche sia nella specie umana che in medicina veterinaria. Gli spermatozoi sono cellule altamente specializzate, la cui motilità costituisce un importante presupposto per la loro funzionalità, tanto che, in condizioni fisiologiche, la motilità e la capacità fecondante risultano strettamente correlate.

La valutazione della motilità spermatica rappresenta quindi uno dei più importanti parametri per la determinazione delle qualità seminali.

La motilità spermatica, così come la spermatogenesi e il processo di maturazione degli spermatozoi, è regolata da numerosi fattori tra cui le disponibilità energetiche e un corretto metabolismo cellulare. Tra i tanti fattori coinvolti nella regolazione della motilità e del metabolismo spermatico, l'effetto della supplementazione alimentare con L-arginina sulla motilità è stato studiato in alcune specie di animali domestici e nell'uomo. Alcuni studi eseguiti *in vitro* hanno dimostrato che la supplementazione con L-arginina stimola l'attività metabolica spermatica nella capra² e la motilità nel coniglio³ e nell'uomo⁴. È stato inoltre dimostrato che la L-arginina rappresenta anche una fonte di ossido nitrico, utile per il processo di capacitazione e per la reazione acrosomiale degli spermatozoi di toro⁵. Nel 2010 Srivastava e Agarwal⁶ hanno documentato l'effetto positivo della L-arginina sulla motilità degli spermatozoi umani, in presenza di un efficiente sistema di trasporto anionico. Un miglioramento della motilità spermatica e l'assenza di effetti indesiderati, a seguito della somministrazione orale di L-arginina, sono stati anche riportati in uno studio clinico eseguito su uomini affetti da asteno-zoospermia⁷.

L'effetto positivo della supplementazione alimentare sulle qualità seminali riveste quindi un ruolo determinante nella gestione dei pazienti ipo-fertili, la cui reale efficacia clinica è stata oggetto di numerosi studi, soprattutto nella specie umana.

Nella specie canina, la riproduzione di soggetti di valore talvolta è condizionata dall'ipofertilità maschile, che, tra le svariate cause, annovera

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 19/02/2014 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 28/04/2014”.

I risultati preliminari di questo studio sono stati presentati al 17th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Bologna, 11-14 Settembre 2013.

anche qualità seminali non soddisfacenti, come l'oligozoospermia, l'astenozoospermia e la teratozoospermia.

Lo spermioγραμμα rappresenta quindi una prima insostituibile tappa nella valutazione della fertilità maschile anche nel cane, i cui valori di normalità sono⁸: volume dell'eiaculato, che varia da 1 a 80 ml, in funzione della presenza o meno della terza frazione; concentrazione spermatica, che varia da 4 milioni a 400 milioni/ml; numero totale di spermatozoi per eiaculato, che deve essere superiore ai 300 milioni; motilità spermatica e morfologia spermatica che devono essere in percentuale superiore al 70%.

Sempre secondo Johnston⁸, l'eiaculato canino deve essere considerato di qualità scadente quando il numero totale di spermatozoi/eiaculato è <200 milioni, la motilità <60% e la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali <60%.

Sebbene nella specie umana il sospetto di infertilità si fonda sul mancato concepimento in coppie stabili da almeno 6 mesi e con rapporti sessuali non protetti, nel cane mancano dati oggettivi per poter sospettare i casi di infertilità. Insuccessi riproduttivi dopo accoppiamenti correttamente gestiti in termini tecnici e temporali con cagne di provata fertilità permettono solo di sospettare situazioni di ipofertilità maschile.

Lo scopo di questo studio è stato valutare il possibile effetto della supplementazione alimentare con l-arginina sulle caratteristiche seminali di cani adulti con sospetta ipofertilità, ipotizzata su base anamnestica e confermata dal riscontro di oligo/asteno/teratozoospermia, e di cani con provata fertilità e con spermioγραμμα normale.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto, previo consenso informato dei proprietari, su 21 cani, di razze diverse, di 2-5 anni. In 13 soggetti l'anamnesi riproduttiva riferiva una sospetta ipofertilità, intesa come almeno un insuccesso riproduttivo in accoppiamenti o fecondazioni artificiali con seme fresco con cagne di provata fertilità e con una corretta gestione dei calori e degli accoppiamenti/fecondazioni. Gli altri 8 soggetti erano invece riproduttori in attività e di provata fertilità, confermata dalla nascita di prole a seguito di accoppiamenti o fecondazioni artificiali.

All'esame obiettivo generale tutti i soggetti risultavano in buone condizioni generali, alla visita andrologica che comprendeva l'ispezione e la palpazione dello scroto e del suo contenuto, del prepuzio e del pene che risultavano esenti da anomalie conclamate.

Trattandosi di riproduttori, il piano alimentare, con cibi commerciali, era adeguato alla razza e all'attività.

Una volta arruolati nello studio, i soggetti, a riposo sessuale da almeno 2 mesi, sono stati sottoposti a una prima raccolta del seme, finalizzata allo svuotamento delle riserve epididimali e per uniformare i tempi di riposo sessuale. Dopo 7 giorni i soggetti sono stati sottoposti a un'ulteriore raccolta del seme per lo spermioγραμμα, considerato come primo prelievo "basale", cioè eseguito prima di qualsiasi integrazione, seguito da un successivo prelievo a distanza di 15 giorni, considerato come secondo prelievo "basale". I dati dello spermioγραμμα dei due prelievi basali sono serviti per definire i valori medi di "partenza" (T0) delle caratteristiche seminali dei soggetti prima dell'inizio della supplementazione dietetica. Dal giorno successivo al secondo prelievo seminale basale, tutti i soggetti hanno iniziato la supplementazione dietetica quotidiana con l-arginina (Riprofert[®] Marpet, Italia) per 62 giorni, secondo il seguente schema posologico: mezza compressa/die per cani di peso corporeo fino a 5 kg, 1 compressa/die per cani di peso corporeo tra 6 e 30 kg, di 1,5 compresse/die per cani di peso corporeo compreso tra 30 e 40 kg e di 2 compresse/die per cani di peso superiore a 40 kg.

I cani, mantenuti a riposo sessuale, sono stati sottoposti a prelievo ed esame dell'eiaculato 31 (T31) e 62 (T62) giorni dopo l'inizio della supplementazione.

La raccolta del seme è avvenuta mediante manipolazione digitale, in assenza di femmine in estro, ma con l'esposizione dei maschi a un batuffolo di ovatta impregnato di flussi vaginali di cagna in estro. In tutti i casi è stata effettuata la raccolta, in contenitori graduati, sterili e mantenuti a 38°C, solo della prima e seconda frazione dell'eiaculato, che è stato immediatamente sottoposto a spermioγραμμα. La motilità è stata valutata mediante osservazione microscopica a 100x di 10 µl di seme posto su un vetrino mantenuto a 38°C mediante l'utilizzo di un tavolino portaoggetti termostato. Il numero totale degli spermatozoi è stato calcolato dopo valutazione della concentrazione spermatica, in rapporto al volume dell'eiaculato raccolto. La concentrazione spermatica unitaria (ml) è stata determinata mediante camera contaglobuli di Burkner, previa diluizione 1:100; la morfologia è stata valutata con obiettivo ad immersione su almeno 200 spermatozoi per vetrino dopo colorazione con eosina/nigrosina.

Analisi statistica

I dati relativi al volume dell'eiaculato, al numero totale degli spermatozoi, alla motilità e alla morfologia spermatica, registrati a T0, a T31 e a T62, sono stati confrontati statisticamente, all'interno dei tempi mediante test Anova per misure ripetute e test di Tukey per confronti multipli (SAS 9.0). La significatività statistica è stata considerata per $p < 0,05$.

RISULTATI

In accordo con i criteri riportati da Johnston⁸ per la valutazione del seme canino, lo spermioγραμμα basale (T0) ha permesso di evidenziare, tra i 13 riproduttori con sospetta ipofertilità, un caso di oligo-asteno-teratozoospermia, 4 di asteno-teratozoospermia, 2 di teratozoospermia, 2 di asteno-zoospermia e un caso di azoospermia. I restanti tre soggetti presentavano, invece, caratteristiche seminali compatibili con uno spermioγραμμα normale. Degli 8 riproduttori con anamnesi di normale fertilità, l'analisi del seme a T0 ha rilevato un soggetto con oligo-azoospermia e due soggetti con asteno-azoospermia.

Pertanto, sulla scorta dello spermioγραμμα, sono stati inseriti nel gruppo "ipofertile" (IPO) solo 10 dei 13 cani con anamnesi di ipofertilità e nel gruppo "normale" (NORM) solo 5 degli 8 riproduttori ritenuti anamnesticamente fertili.

I dati relativi alle caratteristiche seminali a T0, T31 e T62 dei 10 soggetti del gruppo IPO e dei 5 soggetti del gruppo NORM sono riportati in Tabella 1 e 2, rispettivamente.

Il volume della prima e della seconda frazione dell'eiaculato non presentava differenze significative all'interno dei gruppi durante il periodo di studio (Tabella 1, 2).

Per quanto riguarda il numero totale di spermatozoi per eiaculato, nel gruppo di cani ipo-fertili, il soggetto caratterizzato da azoospermia sia a T0 che a T31, presentava un miglioramento a T62 (11 milioni di spermatozoi), senza però raggiungere la

normalità. Il soggetto con oligo-azoospermia (numero totale di spermatozoi a T0 = 90.000), mostrava un trend di miglioramento (17.420 milioni di spermatozoi a T31 e 107.410 milioni a T62) pur mantenendosi oligo-azoospermico fino al termine dello studio. Negli altri 8 cani ipo-fertili il numero totale di spermatozoi già a T0 era nella norma (318-1582 milioni) e non presentava differenze significative per tutta la durata del periodo di osservazione (Tabella 1).

Prendendo in considerazione il parametro motilità, dei 7 cani del gruppo IPO con motilità insufficiente a T0 (20-55%) e pressoché invariata a T31, 3 raggiungevano i valori di 60-75% a T62, mentre i restanti 4, pur mostrando un miglioramento, non normalità superavano il 55%. Nel gruppo di cani normo-fertili, tutti i 5 soggetti presentavano a T62 un incremento significativo ($p < 0,001$) della motilità media spermatica (Tabella 2).

Nel gruppo di cani ipo-fertili, tutti i 7 soggetti con teratozoospermia a T0 mostravano un miglioramento della morfologia spermatica già a T31 (raggiungendo il 60-75% in 3 soggetti), che si confermava a T62, con l'ulteriore incremento nei soggetti precedentemente migliorati (65-80%) e con il raggiungimento del 65-80% in altri 2 soggetti.

Due dei 7 cani con teratozoospermia iniziale presentavano quindi una morfologia spermatica normale (80%) al termine dello studio. Anche nel gruppo di cani normo-fertili si assisteva al miglioramento della morfologia in 3/5 soggetti già a T31, mantenuta invariata a T62.

TABELLA 1
Dati dello spermioγραμμα (media \pm DS) a T0, T31 e a T62 dei 10 soggetti ipo-fertili

Parametro	T0	T31	T62
Volume (ml)*	3,75 \pm 1,76	3,62 \pm 1,78	4,00 \pm 1,53
Numero totale spermatozoi (10^6)	726 \pm 554	739 \pm 565	747 \pm 540
Motilità (%)	44,00 \pm 21,6 ^a	47,00 \pm 22,75 ^a	58,00 \pm 14,18 ^b
Morfologia normale (%)	40,00 \pm 20,88 ^a	52,00 \pm 21,76 ^a	69,00 \pm 10,55 ^b

*Il valore si riferisce alla raccolta della prima e seconda frazione dell'eiaculato.
a,b = $p < 0,0001$.

TABELLA 2
Dati dello spermioγραμμα (media \pm DS) a T0, T31 e T62 dei 5 soggetti normo-fertili

Parametro	T0	T31	T62
Volume (ml)*	3,50 \pm 1,20	3,60 \pm 1,03	3,80 \pm 1,45
Numero totale spermatozoi (10^6)	1,304 \pm 342	1,376 \pm 296	1,366 \pm 167
Motilità (%)	77,00 \pm 2,74 ^a	79,00 \pm 4,18 ^a	85,00 \pm 3,53 ^b
Morfologia normale (%)	80,00 \pm 7,07	80,00 \pm 5,00	81,00 \pm 6,56

*Il valore si riferisce alla raccolta della prima e seconda frazione dell'eiaculato.
a,b = $p < 0,0001$.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio, seppur ottenuti su un numero contenuto di soggetti, documentano un miglioramento delle qualità seminali in seguito a supplementazione alimentare con l-arginina sia in soggetti ipo-fertili con problemi di oligozoospermia, di astenozoospermia, di teratozoospermia o di asteno-teratozoospermia, sia in soggetti normo-fertili con spermogramma normale. In particolare, nei soggetti ipo-fertili si è assistito a un netto ($p < 0,0001$) miglioramento sia della motilità che della morfologia spermatica. Infatti, nonostante il trend di miglioramento fosse osservabile già 31 giorni dopo l'inizio della supplementazione, l'effetto significativamente positivo si è evidenziato dopo 62 giorni di integrazione con l-arginina sia nei confronti della motilità che della morfologia, in comparazione sia ai valori rilevati all'inizio dello studio, sia dei valori registrati *in itinere* a 31 giorni. Nella media, la motilità spermatica, valutata all'inizio dello studio attorno al 44%, migliorava (58%) al termine della prova senza però raggiungere valori normali (>70%); Valutando singolarmente i soggetti dopo la supplementazione con l-arginina, 3/10 cani ipo-fertili registravano una motilità spermatica $\geq 60\%$, di cui 1 oltrepassava addirittura la soglia di normalità.

La percentuale media di spermatozoi con morfologia normale è aumentata nel corso della prova, avvicinandosi moltissimo al termine dello studio ai valori di normalità (69%) e raggiungendo l'80% in 2 soggetti.

È interessante notare che anche nei soggetti normo-fertili la supplementazione con l-arginina ha comportato un incremento statisticamente significativo ($p < 0,001$) della motilità spermatica (da 70% a 79%), mentre la morfologia non ha mostrato variazioni significative.

L'effetto positivo della l-arginina sull'apparato genitale maschile e per la risoluzione di alcune patologie riproduttive è stata documentata in altre specie animali. Precedenti studi hanno dimostrato l'effetto positivo della l-arginina sia sulla motilità che sul tasso metabolico degli spermatozoi nella capra, nel bovino, nel topo e nell'uomo^{6,9}.

Scibona et al.⁷, hanno dimostrato che il trattamento per via orale con l-arginina, protratto per 6 mesi, in uomini con ridotta motilità spermatica, ha comportato un incremento significativo della motilità, senza alcun effetto indesiderato. Questo effetto positivo sulla motilità potrebbe essere ascrivibile al ruolo di precursore della l-arginina nella sintesi di poliamine, quali la putrescina, la spermidina e la spermina, considerate iniziatrici dei processi di motilità spermatica¹⁰.

Secondo Srivastava e Agarwal⁶, l'effetto positivo dalla l-arginina sulla motilità e sul metabolismo degli spermatozoi, esercitati attraverso l'induzione

della sintesi di ossido nitrico, sarebbe tuttavia possibile solo in presenza di un sistema attivo di trasporto ionico.

Nel presente studio la durata di 62 giorni della supplementazione orale con l-arginina è stata stabilita in funzione della durata della spermatogenesi nella specie canina¹¹, d'altro canto il progressivo miglioramento dello spermogramma è divenuto statisticamente significativo proprio al termine del trattamento. La mancanza di spermogrammi dopo la fine del trattamento non permette di definire né la durata né il trend di efficacia dell'effetto positivo sulle qualità seminali dopo il termine della supplementazione. Sulla base dei risultati ottenuti nell'uomo⁷, sarebbe pertanto interessante prevedere un trattamento di più lunga durata, allo scopo di verificare la persistenza del trend di miglioramento ed eventualmente il raggiungimento dei valori di uno spermogramma normale.

Inoltre, dato l'effetto positivo osservato soprattutto nei confronti della motilità spermatica, sia nei cani ipo-fertili sia in quelli normali, sarebbe interessante affiancare all'esame del seme eseguito di routine indagini più approfondite relative allo studio della motilità e alle caratteristiche cinetiche degli spermatozoi, oltre che indagini mirate allo studio del metabolismo spermatico, similmente a quanto studiato nella specie umana.

Resta interessante anche indagare l'effetto della l-arginina sulle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi. In questo studio 8/10 cani ipo-fertili hanno avuto un miglioramento della morfologia spermatica oltre il limite soglia del 60% e, tra questi, 4 hanno addirittura oltrepassato il valore del 70%. Inoltre, 3 dei 4 soggetti con iniziale asteno-teratozoospermia hanno mostrato un miglioramento di entrambi i parametri seminali. Questo riscontro sembra confermare quanto riferito da Shafer et al (1997)¹², che riportano come la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e la motilità progressiva siano correlate positivamente.

A tale riguardo appare utile la prosecuzione dell'indagine mediante una valutazione più accurata e più dettagliata della morfologia per poter meglio distinguere verso quale tratto anatomico dello spermatozoo (testa, tratto intermedio, coda) si espliciti l'effetto migliorativo e per meglio comprendere il possibile effetto sulla fertilità.

Non sorprende che la supplementazione con l-arginina non abbia comportato variazioni significative del numero totale di spermatozoi, nonostante il miglioramento osservato in due soggetti oligozoospermici. Entrambi i soggetti, oligozoospermici al termine dello studio, si mantenevano anche astenozoospermici, ma in un caso si assisteva al netto miglioramento della morfologia spermatica (>75% a T62). A conoscenza degli autori, in letteratura non è descritta l'efficacia della l-ar-

ginina sul miglioramento delle condizioni di oligo/azoospermia nell'uomo o in altre specie animali; il miglioramento osservato in questo studio deve quindi essere considerato con cautela.

Infine, visto che il fine ultimo del miglioramento delle qualità seminali in soggetti ipo-fertili resta la possibilità di generare prole, sarà interessante osservare se, accanto al netto miglioramento dello spermogramma, la supplementazione orale con L-arginina comporti anche la restituzione della fertilità.

Un'ultima considerazione spetta all'aumento della motilità nel gruppo di cani normo-fertili con spermogramma normale. Sebbene meno importante, è comunque interessante l'effetto migliorativo della L-arginina sulla motilità spermatica. Questo riscontro potrebbe essere utile, per esempio, nei soggetti i cui eiaculati siano destinati alla conservazione attraverso refrigerazione o congelamento, nei quali sarebbe da verificare l'eventuale effetto della L-arginina sulla motilità post conservazione.

In conclusione è possibile affermare che la supplementazione alimentare con L-arginina ha comportato un significativo miglioramento dello spermogramma in cani ipo-fertili e un significativo incremento della motilità in cani di provata fertilità. Restano tuttavia da indagare i fini meccanismi attraverso i quali si esercita questo effetto migliorativo, così come l'impatto sulla fertilità dei soggetti ipo-fertili.

Parole chiave

Cane, ipofertilità maschile, spermogramma, L-arginina.

■ Improvement of seminal characteristics in sub-fertile and fertile stud dogs supplemented orally with L-arginine

Summary

Among several causes of male subfertility, deficiency of aminoacids, vitamins and minerals are recognized as possible causes of sperm abnormalities both in human and veterinary medicine. Sperm motility represents an important functional prerequisite, and, under physiologic conditions, motility and fertility are closely correlated. Several studies showed the efficacy of L-arginine supplementation on sperm motility in some species. The aim of the present study was to assess the possible efficacy of L-arginine oral supplementation on seminal characteristics in adult stud dogs with suspected subfertility and oligo/astheno/teratozoospermia and in dogs of proven fertility and with normal spermogram. L-arginine supplementation for 62 days improved ($p < 0.0001$) sperm motility (from 44% to 58%) and morphology (from 40% to 69%) in the group of sub-fertile dogs and a significant increase ($p < 0.001$) of sperm motility in the fertile dogs with normal semen characteristics. Obtained results showed that L-arginine supplementation could be useful for the treatment of male dog sub-fertility. However, the study may benefit of further investigations, considering also the possible influence of breed and age on the response to treatment.

Key words

Dog, male subfertility, semen analysis, L-arginine.

BIBLIOGRAFIA

1. Baker HWG, Burger HG, de Krester DM, et al. Relative incidence of etiological disorders for male infertility, in: Santen RJ, Swerdloff RS. Ed. Male Reproductive Dysfunction. Marcel Dekker, New York, 1986, p. 350.
2. Patel AB, Srivastava S, Phadke RS, et al. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. Biophysical Journal 75:1522-1528, 1998.
3. Randany EW, Atherton RW. Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility. Arch Androl 7:351-355, 1981.
4. Keller DW, Polakoski KL. L-Arginine stimulation of human sperm motility in vitro. Biol Reprod 13:154-157, 1975.
5. O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. Biochim Biophys Acta 1674:215-221, 2004.
6. Srivastava S, Agarwal A. Effect of anion channel blockers on L-arginine action in spermatozoa from asthenospermic men. Andrologia 42(2):76-82, 2010.
7. Scibona M, Meschini P, Capparelli S, et al. L-arginine and male infertility. Minerva Urol Nefrol 46: 251-253, 1994.
8. Johnston SD, Root Kustritz M, Olson PNS: Canine and Feline Theriogenology, Philadelphia: WB Saunders Co, 2001.
9. Morgante G, Scolaro V, Tosti C, et al. Il trattamento con carnitina, acetilcarnitina, L-arginina e ginseng migliora la motilità spermatica e la salute sessuale negli uomini con astenozoospermia. Minerva Urol Nefrol. 62(3):213-218, 2010.
10. Méndez JD, Hernández MP. Effect of L-arginine and polyamines on sperm motility. Minerva Urol Nefrol. 46(4):251-253, 1994.
11. Soares JM, Avelar GF, França LR. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (Canis familiaris). J Anat. 215(4):462-471, 2009.
12. Schafer S, Holzmann A, Arbiter K. The influence of frequent semen collection on the semen quality of beagle-dogs. Deutsche tierärztliche wochenschrift, 104(1): 26-29, 1997.