

Efeito de meios diluidores na congelabilidade do semen canino**Effect of diluting media on canine semen freezability**

DOI:10.34117/bjdv5n9-153

Recebimento dos originais: 20/08/2019

Aceitação para publicação: 23/09/2019

Jonathan Soares de Lima

Mestre em Ciência Animal, com ênfase em produtos bioativos, pela Universidade Paranaense, Umuarama, PR.

Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR

Endereço: Estrada Bonfim, 560 - Parque Industrial II, Umuarama - PR, 87502-970, Brasil

E-mail: jonathansoaresdelima@gmail.com

Carlos Renato de Freitas Guaitolini

Doutor em Biotecnologia Animal, na área de Reprodução Animal, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP

Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR

Endereço: Estrada Bonfim, 560 - Parque Industrial II, Umuarama - PR, 87502-970, Brasil

E-mail: carlosrfg@hotmail.com

André Maciel Crespilho

Doutor em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP

Instituição: Universidade Santo Amaro – UNISA

Endereço: R. José Portolano, 57 - Jardim das Imbuías, São Paulo - SP, 04829-320, Brasil.

E-mail: andremacc@yahoo.com.br

Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Doutora em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal, pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Unesp, Botucatu.

Endereço: R. Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n - Unesp Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618-681, Brasil.

E-mail: camila.freitas-dellaqua@unesp.br

Maria Isabel Mello Martins

Pós doutora na École Nationale Vétérinaire d'Alfort, França

Instituição: Universidade Estadual de Londrina - UEL

Endereço: Av. Olávo García Ferreira da Silva, s/n - Campus Universitário, Londrina - PR, 86051-990, Brasil.

E-mail: imartins@uel.br

Renata Patricia Rigoto

Graduanda do curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense, Umuarama, PR.
Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR
Endereço: Estrada Bonfim, 560 - Parque Industrial II, Umuarama - PR, 87502-970, Brasil
E-mail: renatarigoto@gmail.com

Ana Beatriz Marques

Mestranda na Universidade Estadual de Londrina, PR
Instituição: Universidade Estadual de Londrina - UEL
Endereço: Av. Olávio García Ferreira da Silva, s/n - Campus Universitário, Londrina - PR,
86051-990, Brasil.
E-mail: biamarquesvet30@gmail.com

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo

Mestranda na Universidade Estadual de Londrina, PR
Instituição: Universidade Estadual de Londrina - UEL
Endereço: Av. Olávio García Ferreira da Silva, s/n - Campus Universitário, Londrina - PR,
86051-990, Brasil.
E-mail: myrian.hid@gmail.com

Rosiára Rosária Dias Maziero

Doutora em Biotecnologia Animal, na área de Reprodução Animal, pela Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP
Instituição: Universidade Paranaense - UNIPAR
Endereço: Estrada Bonfim, 560 - Parque Industrial II, Umuarama - PR, 87502-970, Brasil
E-mail: rosiaramaziero@prof.unipar.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de dois meios diluentes de congelação, para sêmen canino. Para tanto, foram utilizados 3 machos, adultos, de diferentes raças, com idades entre 2 a 5 anos e fertilidade comprovada. Realizaram-se 4 colheitas de sêmen de cada animal, pelo método de manipulação digital do bulbo peniano, priorizando a segunda fração do ejaculado. As amostras colhidas foram divididas em 2 grupos, com concentração de 80×10^6 espermatozoides por mL. As amostras foram centrifugadas a 600g por 10 minutos e em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em meio de congelação. No grupo 1, foram diluídas em meio de TRIS-gema e no grupo 2, diluídas em meio de congelação comercial Botudog® (Botupharma Biotecnologia Animal). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL na concentração de 40×10^6 espermatozoides viáveis. Em seguida, as amostras permaneceram por 1 hora em estabilização a 5°C. Logo após, transferidas para o vapor de nitrogênio durante 20 minutos, e por fim, mergulhadas em nitrogênio e armazenadas em botijão criogênico. As palhetas foram descongeladas a 46°C por 15 segundos e avaliados os parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal (IMPA, %). Os parâmetros de motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP; $\mu\text{m/s}$), linearidade (%), percentagem de espermatozoides rápidos (%), integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliados por citometria de fluxo foram superiores no grupo 2 (TRIS-gema). Desta forma, concluímos que o protocolo de congelação de sêmen canino, utilizando o diluente Botudog® apresenta melhores parâmetros

de cinética e viabilidade espermática pós descongelação, quando comparados ao meio TRIS-gema.

Palavras-chave: Análises espermáticas. Cães. Congelamento. Diluidores.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy of two freezing diluent media for canine semen. To this end, 3 adult males of different races, aged 2 to 5 years and proven fertility were used. Four semen collections of each animal were performed by the digital manipulation method of the penile bulb, prioritizing the second fraction of the ejaculate. The collected samples were divided into 2 groups, with a concentration of 80×10^6 sperm per mL. The samples were centrifuged at 600g for 10 minutes and then the pellet was resuspended in freezing medium. In group 1, they were diluted in TRIS-gema medium and in group 2, diluted in commercial freezing Botudog® medium (Botupharma Animal Biotechnology). The samples were packed in 0.25 mL straws at a concentration of 40×10^6 viable sperm. Then, the samples remained for 1 hour in stabilization at 5°C. Afterwards, they were transferred to the nitrogen vapor for 20 minutes, and finally, dipped in nitrogen and stored in cryogenic cylinder. The straws were thawed at 46°C for 15 seconds and the parameters of sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity (IMPA,%) were evaluated. The parameters of total motility (%), progressive motility (%), progressive linear velocity (VSL; $\mu\text{m} / \text{s}$), mean path velocity (VAP; $\mu\text{m} / \text{s}$), linearity (%), percentage of rapid sperm (%) , plasma and acrosomal membrane integrity assessed by flow cytometry were higher in group 2 (TRIS-gema). Thus, we concluded that the canine semen freezing protocol, using the Botudog® diluent, presents better parameters of kinetics and sperm viability after thawing when compared to TRIS-gema medium.

keywords: Sperm analysis. Dogs Freezing. Medium.

1 INTRODUÇÃO

O setor que representa serviços e produtos para cães e gatos tem crescido solidamente, e em 2018 movimentou mais de R\$ 25 bilhões na economia brasileira, com crescimento de 7 % em relação ao ano de 2016 (Infomoney, 2018).

Dados mais recentes do IBGE mostram que a população de cães é de 53 milhões (MAPA - IBGE, 2013). O Brasil possui a quarta maior população de animais de estimação do mundo e ocupa a terceira maior posição em faturamento, ou 5 % da fatia mundial (Euromonitor, 2018).

Diante do exposto, a presença de animais com alto valor zootécnico, exige que as biotécnicas de reprodução ganhem espaço, sendo a criopreservação de sêmen canino, uma das mais promissoras na área de Reprodução Animal. Adicionalmente, esta biotecnologia permite a conservação de material genético de animais, das espécies ameaçadas de extinção e o transporte de gametas a longas distâncias (Dobrinski et al., 1993; Cardoso et al., 2003; Varesi et al., 2014; Corcini et al., 2016).

Entretanto, o processo de criopreservação interfere na qualidade e viabilidade dos espermatozoides. As etapas do processo, as quais incluem a diluição, refrigeração, congelamento e descongelamento, diminuem a capacidade de fertilização dos espermatozoides utilizados para a inseminação artificial - IA (Lecewicz et al. 2018).

Diluidores a base de TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometano), por exemplo, o TRIS-glucose-ácido cítrico tem sido utilizado para preservar espermatozoides caninos, mas sua eficácia depende de todo o processo de congelamento adotado (Sharma et al., 1997; Katkov & Mazur, 1998). Outro componente presente no meio diluidor, com ação crioprotetora, é a gema de ovo. Esta protege contra o choque pelo frio durante a refrigeração dos espermatozoides. Este efeito é atribuído à sua composição de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual adere à membrana espermática, causando o influxo de fosfolípidios e colesterol pela membrana plasmática. Além disso, o LDL forma complexos com proteínas plasmáticas que entram em contato com o espermatozoide durante a ejaculação, evitando o efluxo de fosfolípidios e colesterol da membrana espermática (Corcini et al., 2016). Deste modo, a gema de ovo é considerada crioprotetor não penetrante, o qual reduz o ponto de congelamento do meio e diminui a formação de cristais de gelo extracelular (Farstad, 2000).

Entretanto, apesar das vantagens da utilização da gema de ovo, existem argumentos contra seu uso, principalmente devido à variabilidade na composição e sua propensão à contaminação com patógenos animais. Assim, estudos com sua substituição pela lecitina de soja, vêm aumentando na criopreservação de espermatozoides caninos (Beccaglia et al. 2009; Axner & Lagerson, 2016; Sánchez-Calabuig et al. 2017). Assim como a gema de ovo, a lecitina de soja contém fosfolípidios, ricos em gordura insaturada, as quais aumentam a fluidez da membrana plasmática e a resistência ao choque frio (Parks & Mohanty, 1992).

Além destes componentes, outros são estudados e utilizados com sucesso na criopreservação de sêmen canino, como água de coco *in natura* (Cardoso et al., 2002) e em pó ACP-106 (Cardoso et al., 2007). Este diluidor apresenta características como atoxicidade, isotonicidade, além de componentes necessários para manutenção do metabolismo dos espermatozoides (Cardoso et al., 2007).

Deste modo, tendo em vista os benefícios da criopreservação de sêmen e a sua baixa utilização em cães, este trabalho tem por objetivo avaliar a eficácia do diluente comercial Botudog e do meio diluidor Tris-gema na cinética e viabilidade de espermatozoides caninos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes usados neste estudo foram adquiridos da Sigma Aldrich, St. Louis, USA, exceto para as especificadas no texto.

2.1 PREPARO DA SOLUÇÃO TRIS-GEMA

Para o preparo da solução TRIS-gema frutose 8 % glicerol conforme descrito por Chirinéa et al. (2006).

2.2 ANIMAIS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O experimento foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimental Animal Institucional, número de protocolo 34604/2018, aprovado em 21 de Março de 2018.

As atividades de colheitas e avaliação do sêmen fresco foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da UNIPAR, município de Umuarama, estado do Paraná, Brasil.

As avaliações de cinética espermática foram realizadas utilizando o sistema CASA na Universidade Estadual de Londrina – UEL, no Laboratório de Andrologia do Departamento de Clínicas Veterinárias, localizado na cidade de Londrina, estado do Paraná, Brasil.

A avaliação de viabilidade espermática foi realizada por citometria de fluxo na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, localizada na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil.

Foram realizadas quatro colheitas de sêmen, pelo método de manipulação digital do bulbo peniano, com intervalos semanais, de três animais, de diferentes raças, sexualmente maduros, com idade entre 2 a 5 anos, totalizando 12 colheitas.

Após a colheita de sêmen, as amostras foram avaliadas subjetivamente, em microscópio óptico, quanto à motilidade total (MT; %) e vigor espermático (1-5). Em seguida, foi avaliada a concentração espermática em câmara de Neubauer na diluição de 10 μ L do ejaculado, em 190 μ L de solução formol salina, a 10 %.

Os cães considerados aptos ao experimento apresentaram motilidade total ≥ 90 %, vigor 3 (classificação de 1-5) e concentração espermática $\geq 200 \times 10^6$ de espermatozoides por ejaculado.

Após a triagem inicial cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas, cada uma deles:

1) Grupo TRIS-gema: meio diluidor padrão, composto por 2,4 g de TRIS; 1,4 g de Ácido Cítrico; 0,8 g de Frutose; 0,02 g de Sulfato de Amicacina; 8 mL de Glicerol; 20mL de Gema de Ovo; 1 mL de OEP e Água Destilada.

2) Grupo BD: meio diluidor comercial Botudog® (Botupharma Biotecnologia Animal).

Todos os ejaculados foram centrifugados a uma velocidade de 600 g por 10 minutos, o sobrenadante desnatado e o *pellet* obtido, foi diluído em cada grupo experimental.

A concentração espermática nas amostras diluídas, foi ajustada para 80 milhões de espermatozoides totais por mL de diluidor e envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL (IMV® Technologies L'Aigle Cedex, France), previamente identificadas com nome do animal e número da colheita. Assim, cada palheta continha um total de 40×10^6 de espermatozoides.

As amostras foram destinadas a refrigeração, dispostas em uma caixa de isopor (Botuflex®, Botupharma Biotecnologia Animal), previamente refrigerada a 5 °C e permaneceram durante o período de 1 hora na temperatura de 5 °C. Em seguida, a curva de congelamento foi realizada sobre o vapor de nitrogênio líquido (N₂L) pelo acondicionamento das palhetas em caixa de isopor convencional, de 40 litros a uma distância fixa de 6 cm do nível do N₂L, sendo que a coluna do N₂L era de 4 cm, permanecendo por um período de 20 minutos. Decorrido este período, as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido sendo congeladas e após isso, raqueadas para o acondicionamento em botijões criobiológicos.

Para a padronização das análises pós-descongelação, as análises foram iniciadas após um período mínimo de 3 dias de estocagem (Crespilho et al. 2014).

2.3 ANÁLISES ESPERMÁTICAS PÓS-DESCONGELAÇÃO

Para todas as análises, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 46 °C por 15 segundos, sendo utilizada uma palheta de cada ejaculado por tratamento para avaliação pós-descongelação. Alguns autores relatam que a descongelação do sêmen canino em altas temperaturas e curtos períodos de exposição proporciona melhores resultados de viabilidade e fertilidade; devido à diminuição dos riscos de recristalização dos micros cristais intracelulares que podem ocorrer durante um processo de descongelação lenta (Olar, 1984; Ivanova-Kicheva et al., 1995; Peña, 2000).

Foram realizadas análises pós-descongelação de cinética espermática pelo sistema CASA, utilizando equipamento (HTM-IVOS 12, Hamilton ThorneResearch, Beverly, MA,

USA) e avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

2.4 CINÉTICA ESPERMÁTICA

Para a avaliação da cinética espermática foram analisados cinco campos para cada amostra, com o auxílio do sistema CASA (HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA).

Os parâmetros avaliados foram: motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), velocidade linear progressiva (VSL, %), velocidade curvilínea (VCL, %), porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), porcentagem de espermatozoides com movimento médio (MED, %), porcentagem de espermatozoides com movimento lento (SLOW, %). O *setup* do CASA utilizado neste experimento está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Setup da análise computadorizada sistema (CASA) da cinética espermática de cães.

Analysis setup: Cão	
Apply Sort:	0
Frames Acquired:	50
Frame Rate:	30 Hz
Minimum Contrast:	40
Minimum Cell Size:	6 Pixels
Minimum Static Contrast:	30
Straightness (STR), Threshold:	70.0 %
Vap Cutoff:	30.0 $\mu\text{m/s}$
Prog. Min VAP:	60.0 $\mu\text{m/s}$
VSL Cutoff:	20.0 $\mu\text{m/s}$
Cell Size:	6 Pixels
Cell Intensity:	45
Static Head Size:	0.36 to 2.49
Static Head Intensity:	0.38 to 1.35
Static Elongation:	0 to 100
Slow Cells Motile:	NO

Magnification:	1.89
Video Frequency:	60
Bright Field:	NO
LED Illumination Intensity:	2252
IDENT Illumination Intensity:	3000
Temperature, Set:	37.0 °C
Chamber type:	CellVU
Field Selection Mode:	SELECT
IDENT Fluorescent Option:	OFF
Integrating Time:	1 Frames

2.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para as análises de citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488- nm, 100 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Os dados foram avaliados pelos programas BD FACSDiva™ software v6.1 e WinList 6.0 (Verify software house).

As amostras foram analisadas a uma taxa de aquisição de 800 eventos /segundo, com 10.000 células por amostra. Os debris celulares e partículas foram excluídos da aquisição e análise pelos ajustes no *threshold* e pela marcação com Hoescht 33342 (100µg/mL) excitado pelo laser violeta.

2.6 AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL

Foram utilizadas a associação das sondas iodeto de propídio (P4170 – Sigma aldrich), FITC-PSA (L0770 – Sigma aldrich) e Hoescht 33342 (14533 – Sigma aldrich). Para cada amostra de 200 µL de sêmen diluído em TALP-PVA na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 5 µL de H3342 (100µg/mL), 5 µL de IP (50µg/mL) e 1 µL de FITC-PSA (100µg/mL), e então homogeneizados e incubados por 15 minutos ao abrigo da luz à 37°C.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistical Analyses System (SAS, Institute Inc., 1999; Cary, USA). Primeiramente, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk

(Proc-Univariate) para análise normalidade dos dados e o teste Qui-Quadrado (Proc-GLM) para a análise de homogeneidade das variações. Médias e desvio padrão dos grupos experimentais e suas relações com os grupos de estudo foram feitas utilizando análise de variância (Proc-GLM) adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ESPERMÁTICA

Após o processo de congelação/descongelação do meio diluidor Tris-gema e comercial Botudog, foram avaliados os parâmetros de motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), velocidade linear progressiva (VSL, %), velocidade curvilínia (VCL, %), porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), porcentagem de espermatozoides com movimento médio (MED, %), porcentagem de espermatozoides com movimento lento (SLOW, %), os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), velocidade linear progressiva (VSL, %), velocidade curvilínia (VCL, %), porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), porcentagem de espermatozoides com movimento médio (MED, %), porcentagem de espermatozoides com movimento lento (SLOW, %), do meio diluidor padrão (TRIS) e meio diluidor comercial (BOTUDOG).

	TRIS	BD
MT (%)	27,86 \pm 7,47 ^a	47,79 \pm 18,4 ^b
MP (%)	15,64 \pm 4,6 ^a	32,93 \pm 13,2 ^b
LIN (%)	66,57 \pm 7,6 ^a	75,07 \pm 8,4 ^b
VAP $\mu\text{m/s}$	73,24 \pm 7,5 ^a	83,61 \pm 9,5 ^b
VCL $\mu\text{m/s}$	98,92 \pm 12,8	100,5 \pm 12,1
VSL $\mu\text{m/s}$	63,69 \pm 7,8 ^a	74,79 \pm 8,6 ^b
RAP (%)	18,00 \pm 5,4 ^a	38,57 \pm 17,0 ^b
MED (%)	9,64 \pm 4,8	9,21 \pm 3,7
SLOW (%)	32,64 \pm 13,6	27,93 \pm 8,4

TRIS = TRIS-gema e BD = BOTUDOG. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Conforme os dados apresentados na Tabela 2, não foi observado diferença no parâmetro de VCL, entre os grupos estudados. Entretanto os parâmetros de MT, MP, VAP, LIN, VSL, RAP foram superiores no grupo BOTUDOG ($p < 0,05$).

Os parâmetros de porcentagem de espermatozoides médios (MED) e lentos (SLOW) foram inferiores no grupo BOTUDOG, quando comparado ao grupo TRIS-gema ($p < 0,05$).

3.2 VIABILIDADE ESPERMÁTICA

Para a avaliação da viabilidade celular dos grupos avaliados utilizou-se o parâmetro de integridade de membrana plasmática e acrossomal. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Verificou-se que o grupo BOTUDOG apresentou maior porcentagem de células íntegras, comparado ao grupo TRIS-gema ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da porcentagem de membranas plasmática e acrossomal íntegras (MPAI, %) nos grupos TRIS-gema e BOTUDOG (BD).

	TRIS-gema	BD
MPAI (%)	9,2 ± 5,6 ^a	47,7 ± 3,8 ^b

TRIS = TRIS-gema e BD = BOTUDOG. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A criopreservação de sêmen canino possibilita o melhor aproveitamento de ejaculados oriundos de um mesmo reprodutor, facilitando a propagação e conservação de seu material genético, além de possibilitar a manutenção da capacidade fecundante por um tempo indeterminado (Silva et al., 2001).

Entretanto, o processo de criopreservação acarreta danos às células espermáticas, principalmente a membrana plasmática, que resulta na diminuição da fertilidade do sêmen (Maziero et al., 2009). Estudos mostram que vários meios diluentes são utilizados para criopreservar os espermatozoides caninos, porém com resultados variáveis (Chirinea 2004; Corcini et al. 2016; Sánchez-Calabuig et al. 2017; Lecewicz et al. 2018).

No presente estudo, ao utilizarmos o meio Tris-gema verificamos que a MT foi de 27,86 % e o com o uso de BOTUDOG a MT foi de 47,79 %. Outros autores mostram resultados variáveis de MT usando glicerol como crioprotetor, com valores de MT variando entre 30 a

70% (Foote, 1964, Platz e Seager, 1977, Province et al., 1984, Hay et al., 1997). Diversos autores citam resultados diferentes ao observado no nosso estudo, no grupo TRIS-gema. Santos et al. (2003) ao testarem a concentração de glicerol no meio Tris-gema, para congelação de espermatozoides caninos, verificaram que a adição de 8%, o parâmetro de MT foi de 58 %.

Em estudo realizado por Chirinéa et al. (2006) a utilização de meio Tris-gema a 8 % glicerol, a MT encontrada foi de 67 %. Já em trabalho realizado por Mota et al. (2014), o uso de meio Tris-gema mostrou que a MT foi de 50,7%. Todos estes trabalhos apresentaram resultados de MT superiores ao estudo. Um dos motivos para valores inferiores de MT, com o uso do TRIS-gema pode ser pela leitura dos detritos de gema de ovo, como espermatozoides imóveis, assim como relatado por Mota et al. (2014). É importante destacar que os resultados de cinética e viabilidade espermáticas apresentadas neste presente trabalho possuem diferenças relacionadas aos componentes do diluidor e aos métodos de congelação e descongelação, o que dificultam as comparações exatas entre os resultados obtidos. Outro fato importante é que não existem na literatura resultados utilizando diluidor comercial BOTUDOG.

O parâmetro de MP observado no presente estudo apresentou diferença entre os grupos. Para o grupo Tris-gema observamos MP de 15,64% e para o grupo BOTUDOG 32,93%, diferindo de trabalhos realizados por Acipreste et al. (2014), em que a utilização do meio Tris-gema apresentou 67,3% de MP. Entretanto, Castro et al. (2007) verificaram que a MP utilizando meio Tris-gema foi de 44,45%. Outro trabalho realizado por Yu (2014) observou-se que com o uso de meio Tris-gema a MP foi de 42%.

No parâmetro de integridade de membrana plasmática e acrossomal (IMPA) realizado por citometria de fluxo, verificamos que o meio TRIS-gema resultou em 9,2% e no grupo BOTUDOG foi de 47,7%. Entretanto, Acipreste et al. (2014) utilizando o Tris-gema com 4% de glicerol resultou em 64,2% de IMPA. Já no trabalho realizado por Costa et al. (2013), a integridade membrana plasmática dos espermatozoides utilizando o meio Tris-gema foi de 74,3%. Chirinéa et al. (2006) utilizando o Tris-gema com 8% glicerol encontrou IMPA de 33,3 %. Assim, apesar dos resultados utilizando o meio BOTUDOG ser superior ao meio Tris-gema verificamos resultados discrepantes na literatura, pela utilização de diferentes meios diluidores para a espécie canina, principalmente pela porcentagem variada de glicerol, tampões diversos e diferentes fontes de energia, o que impossibilita e dificulta uma comparação segura entre os resultados.

Os parâmetros de VAP, VSL e RAP do grupo Tris-gema realizados pela avaliação da cinética espermática foram superiores no grupo BOTUDOG. Entretanto, em trabalho realizado

por Chirinéa (2008), o uso de meio Tris-gema apresentou-se superior em comparação ao meio Tris-gema utilizado no presente estudo. Este autor verificou que os parâmetros de VAP foi 96 $\mu\text{m/s}$, VSL de 79 $\mu\text{m/s}$ e RAP 72 %.

A utilização do diluente Botudog® mostrou-se eficaz para manter os parâmetros de motilidade total, motilidade espermática progressiva, linearidade, velocidade de trajeto, velocidade linear progressiva e a porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos, superiores ao meio TRIS-gema. Além disto, o protocolo de congelação utilizado para sêmen canino, utilizando o diluente Botudog® trouxe melhores resultados de viabilidade espermática, comparado ao meio TRIS-gema.

AGRADECIMENTOS

Á UNIPAR pelo financiamento do projeto e a Capes pela concessão da bolsa PROSUPP.

REFERÊNCIAS

- Acipreste, A.C., Costa, E.P., Oliveira, F.A., Costa, S.L., Silva, T.F., Beretta, D.C. (2014). Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. *Ciência Animal Brasileira* 15(1):107-114.
- Axnér, E., Lagerson, E. (2016). Cryopreservation of dog semen in a Tris Extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk. *Reproduction in Domestic Animals* 51(2):262-8.
- Beccaglia, M., Anastasia, P., Luvoni, G.C. (2009). Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Veterinary Research Communications* 33(1):77-80.
- Castro, A.C.N., Pacheco, A., Silva, D.B., Gondim, D.S., Pinho, T.G. (2007). Viabilidade do sêmen submetido a criopreservação com glicerol e etileno-glicol. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 14(2):122-124.
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Silva, L.D.M., Chirinéa, V.H., Souza, F.F., Lopes, M.D. (2007). Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using in vitro sperm-oocyte Interaction Assay. *Reproduction in Domestic Animals* 42(1):11-6.
- Cardoso, R.C., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Da Silva, L.D. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 59(3-4):743-51.

- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R., Uchoa, D.C., Da Silva, L.D.M. (2002). Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. *Ciência Rural* 32(4):657-661.
- Chirinéa, V.H. (2004). Efeito do meio de congelação sobre as características morfofuncionais do sêmen canino. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Chirinéa, V.H., Martins, M.I.M., Souza, F.F., Tebet, J.M., Ozanan, F., Lopes, M.D. (2006). Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ciência Animal Brasileira* 7(4):407-415.
- Chirinéa, V.H. (2008). Inseminação artificial com sêmen congelado em cães. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- Crespilho, A.M., Nichi, M., Guasti, P.N., Freitas-dell'aqua, C.P., Sá Filho, M.F., Maziero, R.R.D., Dell'aqua jr, J.Á., Papa, F.O. (2014). Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science* 146(3-4):126-33.
- Corcini, C.D., Goularte, K.L., Bongalhardo, D.C., Lucia Jr. T., Jardim, R.D., Varela Junior, A.S. (2016). Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia* 48(1):114–5.
- Costa, L.L.M., Castelo, T.S., Souza, A.L.P., Lima, G.L., Silva, A.R. (2013). Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 37(1):53-58.
- Dobrinski, I., Lulai, C., Barth, A.D., Post, K. (1993). Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *Journal Reproduction Fertility Supplement* 47:291–6.
- Euromonitor, (2018). Acesso 20 de Abril de 2019. <https://www.euromonitor.com/pet-care-in-brazil/report>.
- Farstad, W. (2000). Assisted Reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53(1):175-86.
- Foote, R.H., Leonard, E.P. (1964). The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. *Cornell Vet* 54:78-89.
- Hay, M. A., King, W.A., Gartley, C. J., Leibo, S.P., Goodrowe, K.L. (1997). Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertility and Supplement* 51:99-108.

- IBGE, 2013. Acesso 20 de Abril de 2019. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-antiores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf>
- Infomoney, 2018. Acesso 20 de Abril de 2019. <https://www.infomoney.com.br/negocios/canal-do-empresario/noticia/7375940/sem-crise-mercado-pets-brasil-terceiro-mundo-faturamento>
- Ivanova-Kicheva, M.G.; Subev, M.S.; Bobadov, D.P.; Rouseva, I.A. (1995). Effects of thawng regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* 44:563-569.
- Katkov, I.I., Mazur, P. (1998). Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatotozoa. *Journal of Andrology* 19(2):232-41.
- Lecewicz, M., Strzezek, R., Kordan, W., Majewska, A. (2018). Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *Journal of Veterinaty Research* 62(2):221-227.
- Maziero, R.R.D., Crespilho, A.M., Freitas Dell'Aqua, C.P.F.; Dell'Aqua Junior, J.A., Papa, F.O. Análise do sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 6:5-10, 2009.
- Mota, F.A.C., Silva, H.V., Nunes, T.G., De Souza, M.B., De Freitas, L.A., De Araujo, A.A., Da Silva, L.D. (2014). Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology*. 69(1):17-21.
- Olar, T.T. (1984). Cryopreservation of dog semen. *PhD Thesis*, Colorado State University.
- Parks, J.E., Lynch, D.V. (1992). Lipid Composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29(2):255-66.
- Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1997). Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Laboratory Animal Science* 27:1013-1016.
- Peña, A., Linde-Forsberg, C. (2000). Effects of equex one or two dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54:859-875.
- Province, C. A.; Amann, R. P., Pickett, B.W., Squires, E.L. (1984). Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22:409 415.
- Sánchez-Calabuig, M.J., Mailló, V., Beltrán-Breña, P., Martínez, J.F., Galera-Carrillo, S., Pérez-Gutiérrez, J.F., Pérez-Cerezales, S. (2017). Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reproductive Biology* 17(3):233-238.

Santos, I.W., Lima, V.F.M.H., Binsfeld, L.C., Ribeiro, A.P.C. (2003). Congelamento do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Archives of Veterinary Science* 8(2):57-62.

Sharma, R.K., Vemulapalli, S., Kohn, S., Agarwal, A. (1997). Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. *Archives of Andrology* 39(1):33-8.

Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. (2001). Criopreservação do sêmen canino: Revisão. *Ciência Animal* 11(2):119-129.

Varesi, S., Vernocchi, V., Morselli, M.G., Luvoni, G.C. (2014). DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. *Reproductive Biology* 14(4):257-61.

Yu, I.J. (2014). Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free Tris. *Cryo letters* 35(2):101-7.