

Avaliação da Prolina como diluente para o aprimoramento da conservação do sêmen canino em baixas temperaturas

Evaluation of Prolina as diluent for the enhancement of conservation of canine semen in low temperatures

DOI:10.34117/bjdv8n12-013

Recebimento dos originais: 28/11/2022

Aceitação para publicação: 01/12/2022

Maria Eduarda Bicca Dode

Doutorado ciência animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: dudadode@hotmail.com

Carine Dahl Corcini

Doutorado biotecnologia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: corcinicd@gmail.com

Edenara Anastacio da Silva

Mestrado Ciência Animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: edenara_anastacio@hotmail.com

Stela Mari Meneghello Gheller

Doutorado Ciência Animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: dudadode@hotmail.com

Camila Ribeiro Carvalho de Brito

Doutorado ciência animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: camilarcb@gmail.com

Camila Amaral D'Avila

Doutorado Ciência Animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: dudadode@hotmail.com

Nathália Wacholz Knabah

Doutorado Ciência Animal

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Endereço: Campus Universitário, S/N, Capão do Leão - RS, CEP: 96160-000

E-mail: dudadode@hotmail.com

Antonio Sergio Varela Jr

Doutorado Ciências Animal

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

E-mail: dudadode@hotmail.com

RESUMO

Dode, M.E.D., Corcini, C. D., Silva, E. A., Gheller, S. M., Brito, C. R. C., D'Avila, C. A., Knabah, N. W., Varela Jr., A. S. Avaliação da prolina como diluente para o aprimoramento da conservação do sêmen canino em baixas temperaturas. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. A conservação do sêmen através da redução da temperatura promove alterações intracelulares capazes de interferir na viabilidade dos espermatozoides sendo essencial a adição de diluente que agrega diferentes mecanismos de proteção que podem preservar os danos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de prolina (P) na gema de ovo de Tris médio (TG) diluente sob os parâmetros seminal. Doze coleções foram realizadas, usando 4 cães sendo ejaculados com motilidade superior a 70% e vigor ≥ 3 . Foram testados com nove diferentes concentrações de P: 200mM, 100mM, 50mM, 40mM, 30mM, 20mM, 10mM, 5mM e 2.5mM. O TG foi utilizado como controle. Cada amostra foi avaliada (distância média percorrida, distância curvilínea, velocidade média, velocidade curvilínea, linearidade, oscilação de oscilação, deslocamento da cabeça lateral e frequência de batimento cruzado) em pelo menos 6-10 campos selecionados aleatoriamente, foram avaliados em cada campo os sorvetes 150-200 às 0, 24, 48 e 72h vezes. Após 72 h, nenhuma das amostras mostrou viabilidade quando adicionada a TG + 200mMP. A grande maioria dos parâmetros avaliados não diferiu em TG e diluentes contendo até 20 mM indicando que os diluentes com concentrações mais baixas são promissores para novos estudos de preservação do sêmen canino.

Palavras-chave: aminoácido, crioprotetor, *Canis familiaris*, esperma.

ABSTRACT

Dode, M.E.D., Corcini, C. D., Silva, E. A., Gheller, S. M., Brito, C. R. C., D'Avila, C. A., Knabah, N. W., Varela Jr., A. S. **Evaluation of proline as a diluent for the promotion of conservation of canine semen at low temperatures.** Brazilian Journal of Veterinary Medicine. The conservation of semen through the reduction of temperature promotes intracellular alterations capable of interfering in the viability of the spermatozoa being essential the addition of diluent that adds different mechanisms of protection being able to preserve of damages. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of proline (P) in the diluent medium Tris-egg yolk (TG) under the seminal parameters. Twelve collections were performed, using 4 dogs being ejaculated with motility higher than 70% and vigor ≥ 3 . Were tested with nine different concentrations of P: 200mM, 100mM, 50mM, 40mM, 30mM, 20mM, 10mM, 5mM and 2.5mM. TG was used as control. Each sample was evaluated (mean distance traveled, curvilinear distance, rectilinear distance, mean velocity, curvilinear velocity, linearity, wobble oscillation, lateral head displacement and cross beat frequency) in at least 6-10 randomly selected

fields, 150-200 spermatozoa were evaluated in each field at 0, 24, 48 and 72h times. After 72 h, none of the samples showed viability when added to TG + 200mMP. The great majority of the parameters evaluated did not differ in TG and diluents containing up to 20 mMP indicating that diluents with lower concentrations are promising for new studies of canine semen preservation.

Keywords: aminoacid, crioprotector, *Canis familiaris*, sperm.

1 INTRODUÇÃO

A cinofilia vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, gerando demandas para o aprimoramento das biotécnicas reprodutivas. Tais avanços são essenciais para o intercâmbio de material genético de alto valor zootécnico (Linde-Forsberg & Forsberg 1989). Além disso, essas técnicas podem ser utilizadas para espécies de canídeos ameaçados de extinção, como Lobo Vermelho (*Canis rufus*), o Lobo da Etiópia (*Canis simensis*), o Cão de Caça Africano (*Licaon pictus*) e espécies brasileiras, como: o Lobo Guará (*Chrysocyonbrachyurus*), a Raposinha do Campo (*Pseudalopex* sp.) e o Cachorro Vinagre (*Speothos venaticus*)(Silva et al. 2000).

A técnica de resfriamento de sêmen promove a preservação temporária de gametas em baixas temperaturas, sem que se atinja o estado de quiescência. Contudo, o processo predispõe alterações intracelulares nocivas que interferem na viabilidade dos espermatozoides (Iguer-Ouada 2001). A resistência térmica dos espermatozoides distingue-se entre as espécies, sendo os equinos, felinos, canídeos e humanos pouco sensíveis (Watson & Plummer 1985, Bwanga 1991), visto que o componente fosfolipídico da membrana celular dessas espécies proporciona uma maior estabilidade celular (Bouchard et al. 1990).

As manipulações no sêmen incluem resfriamento, congelamento e descongelamento dos espermatozoides e provocam mudanças na estrutura da bicamada lipídica da membrana, fazendo com que algumas proteínas livres possam se ligar a outras substâncias (Rodrigues-Martinez et al. 1993). Para obter sucesso no resfriamento é necessário que o meio de diluição previna danos, permita a manutenção do pH, mantenha potencial iônico e osmolaridade, e contenha fonte energética (England 1993).

Diluentes a base de Tris e de gema de ovo tem sido amplamente utilizados em espermatozoides caninos (Shahiduzzaman & Linde-Forsberg 2007). O Tris, muito utilizado na medicina, combate a acidose e auxilia na preservação da energia espermática. A gema, que é um crioprotetor não penetrante, contém lipoproteínas de baixa densidade

(LDL) que apresentam propriedades nutritivas e protetoras de membrana (Moussa et al. 2002). Os LDL são capazes de se aderir à superfície da membrana espermática restaurando a porção fosfolipídica (Farstard 1996).

O uso de diluentes com somente um mecanismo de crioproteção tem se mostrado de limitada eficiência indicando que a adição de outros componentes, tais como aminoácidos, poderiam melhorar motilidade e fertilidade do sêmen. Aminoácidos impermeáveis a membrana, como a Prolina, estão sendo amplamente testados por suas propriedades metabólicas, crioprotetoras, antioxidantes e osmorreguladoras, prevenindo a desnaturação de proteínas (Kundu et al. 2001). A utilização de aminoácidos (AA) no meio de resfriamento tem se mostrado eficiente para melhorar a motilidade de espermatozoides bovinos (Chen et al. 1993) e ovinos (Sánchez et al. 1997), porém existem poucos estudos relatando o efeito em caninos.

Nem todos os autores relataram o efeito positivo da adição de AA no meio de resfriamento de sêmen, altas concentrações tornam-se prejudiciais, pois induzem uma elevação da pressão osmótica causando danos celulares (Timeche et al. 1999).

Visto às diferenças relativas entre as espécies, é necessário para um maior aproveitamento do sêmen que as técnicas de conservação sejam estabelecidas e ajustadas ampliando as possibilidades de aplicação de biotécnicas reprodutivas de forma eficiente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito imediato da adição de meio diluidor com prolina sobre a motilidade espermática e seu efeito na longevidade e motilidade do sêmen canino diluído e resfriado através da análise das variáveis: motilidade total (MT) e progressiva (MP), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), velocidade média de percurso (VAP), velocidade curvilínea (VCL), = (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), wobble – oscilação (WOB), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF).

2 METODOLOGIA

Foram realizadas 12 ejaculados, 3 coletas para cada cão, utilizando 4 cães da raça Australian Cattle Dog (1 - 3 anos) de propriedade do Canil Sentinela Farrapo. Todos os animais estavam clinicamente saudáveis, mantidos com as mesmas condições de alimentação e manejo e, ainda, com fertilidade comprovada após monta natural e rotina de coleta seminal. No experimento apenas ejaculados que apresentassem motilidade superior a 70% e vigor ≥ 3 foram utilizados.

Todos os reagentes utilizados neste experimento foram provenientes da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e o diluente composto de Tris gema 20% (TG) (Varela Junior et al., 2009) sem aminoácidos foi utilizado como controle. Foram testados diluentes com nove concentrações diferentes de Prolina (P): TG + 200mM P (TG200P), TG + 100mM P (TG100P), TG + 50mM P (TG50P), TG + 40mM P (TG40P), TG + 30mM P (TG30P), TG + 20mM P (TG20P), TG + 10mM P (TG10P), TG + 5mM P (TG5P) e TG + 2,5mM P (TG2,5P).

As coletas de sêmen foram realizadas por manipulação digital e a frequência de coleta dos cães foi de duas vezes por semana. Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi avaliado para volume e concentração. Volume foi mensurado utilizando a micropipetadora monocanal volume variável. As concentrações foram determinadas através da câmara de Neubauer. Os ejaculados foram então fracionados nos 10 tratamentos e entre os quatro momentos de avaliações que seriam realizados (0h, 24h, 48h e 72h), e diluídos nos tratamentos a temperatura de 34 °C na concentração final de 10×10^7 de espermatozoides. mL⁻¹. A curva de resfriamento foi realizada em caixa condicionadora (Koolmate, Minitube, Ge), com taxa de resfriamento de 0,3-0,5 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 5 °C, permanecendo as amostras armazenadas durante 72h.

A motilidade espermática foi avaliada através sistema “Computerized-assisted sperm motility analysis” (CASA (SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha) em um microscópio óptico (Axio Scope A1®, Zeiss, Jena, Alemanha) a 200 X.). O sêmen previamente diluído nos tratamentos e refrigerado foi aquecido a 37 °C durante 10 minutos antes da análise de motilidade que utilizou uma alíquota de 10 µL de sêmen, avaliada entre lâmina e lamínula.

As variáveis analisadas pelo sistema CASA: MT, MP, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF. Cada amostra foi avaliada em pelo menos 6 - 10 campos escolhidos aleatoriamente, 150 - 200 espermatozoides foram avaliados em cada campo.

Foi realizada a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes, pelo teste de Shapiro-Wilk e realizada análise de variância com subsequente comparação entre as médias através do teste de Tukey. Os diferentes crioprotetores foram considerados variáveis independentes, os dados obtidos foram expressos em média ± erro padrão da média (S.E.M). As análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2010).

3 RESULTADOS

Nenhuma das amostras apresentou viabilidade quando foi acrescentado 200 mM de prolina ao diluente base Tris-gema após 72h. Os resultados referentes ao efeito da adição de prolina no diluente na motilidade do sêmen canino resfriado dos demais tratamentos são apresentados na Tabela 1. Os resultados médios obtidos após 72h de resfriamento não indicaram diferenças significativas entre a motilidade total observada no tratamento controle das obtidas nos diluentes contendo 10, 20 ou 30 mM de prolina. A motilidade total é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar diluentes embora a correlação entre motilidade e viabilidade funcional do espermatozóide em caninos não esteja totalmente estabelecida (IVANOVA-KICHEVA et al. 1997).

A manutenção da motilidade segundo Hay et al. (1997) esta relacionada ao movimento progressivo, os resultados da Tabela A indicam que houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos contendo 10, 20 ou 30 mM de prolina, sendo esses inferiores.

Peña e colaboradores 1998 realizaram estudo analisando o efeito da prolina no diluente utilizado em sêmen canino crioconservado a temperaturas ultrabaixas. Diluentes contendo de 10 a 40mM de prolina promoveram resultados significativamente superiores ao observado no controle quando analisados imediatamente após o descongelamento, mantendo-se com o maior valor absoluto o tratamento contendo 20 mM durante as análises realizadas até 4h. Estudos em diferentes espécies apresentam resultados amplamente variáveis quanto às concentrações mais adequadas (Tuck et al. 1970, Trimeche et al. 1999, Sexton 1971, Pena 2004).

Os resultados de linearidade apresentados na Tabela A indicam que valores 0-20 mM de prolina no diluente não reduzem significativamente esse parâmetro. Barratt et al. 1993, Irvine et al. 1994, em seus estudos relacionaram linearidade com fertilidade enquanto que a retilinearidade obtida em diluentes contendo 10 mM de prolina e controle foram superiores.

Os resultados descritos na Tabela A indicam que os tratamentos controle e contendo 5e 10mM de prolina não diferiram o VSL e o controle e 5mM de prolina para DCL. Estudos realizados por Freour e colaboradores, 2010 em humanos, relataram que motilidade e motilidade progressiva foram importantes parâmetros para o sucesso da fertilização enquanto VAP e VSL não apontaram relação.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de prolina em concentrações de até 20 mM são promissoras para uso em diluentes de sêmem canino visando minimizar danos celulares. Novos estudos serão realizados buscando estabelecer a relação entre os parâmetros avaliados e a eficiência funcional do sêmem canino.

REFERÊNCIAS

- Barratt, C.L.R., Tomlinson, M.J.; Cooke, I.D. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil. Steril.* ,60, 520–525, 1993.
- Bouchard, G. F.; Morris, J. K.; Sikes, J. D.; Youngquist, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, *Theriogenology*. 34:147- 157, 1990.
- Bwanga, C. O. Cryopreservation of boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32: 431-453, 1991.
- England, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47: 243-255, 1993.
- Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiol.* 30:421±431, 1993.
- Iguer-Ouada, M., Verstegen, J.P., Long-term conservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory-prepared extenders. *Theriogenology*. 55: 671-684. 2001.
- Ivanova-Kicheva, M. G.; Bobadov, N.; Somlev, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*. 48: 1.343-1.349, 1997.
- Irvine, D.S., Macleod, I.C., Templeton, A.A. et al. Prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum. Reprod.* 9: 2324–2334, 1994.
- Farstad, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*. 42:251-260, 1996.
- Freour, T., Jean, M., Miralliem S., Dubourdieu, S., Barrie, P. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *Service de Biologie du Développement et Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes France European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 149:186–189, 2010.
- Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*. 40:117–125, 2000.
- Hay, M.A.; King, W.A.; Gartley, C.J.; Leibo, S.P.; Goodrowe, K.L. Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* .48:1329-1342, 1997.
- Linde-Forsberg, C. & Forsberg, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl*. 39:299-310, 1989.

Moussa, M. & martinet, Vv.; trimeche, a. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57: 1695-1706, 2002.

Peña, A., Barrio, F., Quintela, L. and Herradón, P. Proline and Glycine Betaine in a Diluent for Freezing Canine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 33:5-9. doi:10.1111/j.1439-0531.1998.tb01307.x, 1998.

Peña-Martinez, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Scien.*, 82: 209-224, 2004.

Rodrigues-Martinez, H.; Ekwall, H.; Lindeforsberg, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 47, p.279-285, 1993.

Sexton, T.J., Amann, R.P., Flipse, R.J. Free amino acids and protein in rete testis fluid, vas deferens plasma, accessory sex gland fluid, and seminal plasma of the conscious bull. *J Dairy Sci*. 54:412416, 1971.

Silva, A. R.; cardoso, r. C. S.; silva, l. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores a base de Tris e água de coco. *Ciência Rural*. 6: 1021-1025, 2000.

Shahiduzzaman, A.K. & Linde-forsberg, C. Induced immobility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 68:920-933, 2007.

Sánchez-partida, L.G.; setchell, P.B.; maxwell, W.M. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 9.7.:689-96, 1997.

Tuck, R.R., Setchell, B.P., Waites, G.M.H., Young, J.A. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 318:225-243, 1970.

Trimeche, A., Yvon, J.M., Palmer, E., Magistrini, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 52:181-91, 1999.

Varela, Junior. A.S.; Corcini, C.D.; Ulguim, R.R., et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci*. 11: 323-327, 2009.
Watson, P. F. & Plummer, J. M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: International Conference on deep freezing boar semen, *Proceedings*. 1 : 113 – 127, 1985.

ANEXOS

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de prolina (0, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 100mM e 200mM), em amostras de sêmen canino, resfriados a 4°C por 72h sobre parâmetros motilidade espermática analisados no CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (média ± erro padrão da média).

	TG*	TG2.5P	TG5P	TG10P	TG20P	TG30P	TG40P	TG50P	TG100P
ALH**	3.9 ±0.12 ^A	3.43 ±0.12 ^B	3.82 ±0.1 ^A	3.74 ±0.08 ^A	3.35 ± 0.08 ^B	3.23 ±0.14 ^B	3.37±0.1 8 ^B	3.53 ±0.13 ^B	3.26 ±0.43 ^B
BCF	17.4 ±1.31 ^A	16.7 ±1.45 ^A	17.6±1.4 7 ^A	17.9 ±1.29 ^A	17.2 ±1.66 ^A	16.3±1.4 3 ^A	18.6 ±1.85 ^A	17.4 ±1.55 ^A	22.5±1.1 9 ^A
DAP	22.7 ±0.76 ^A	19.2± 0.75 ^{BC}	21.8± 0.82 ^A	21.9 ± 0.73 ^A	20 ± 0.72 ^B	19.6± 0.68 ^B	18.6 ± 0.77 ^{BC}	17.9 ± 0.68 ^C	13.8 ± 0.62 ^D
DCL	41.7 ± 1.53 ^A	34.2± 1.65 ^C	41.1± 1.68 ^A	38.8± 1.57 ^{AB}	37.0± 1.52 ^{BC}	36.0± 1.51 ^{BC}	34.7± 1.87 ^C	33.7± 1.85 ^C	29.4± 1.23 ^D
DSL	17.9 ± 0.65 ^A	14.8± 0.68 ^{BC}	16.9 ± 0.75 ^A	17.4± 0.64 ^A	15.5± 0.56 ^B	14.3± 0.56 ^B	13.8± 0.62 ^C	13.1± 0.49 ^C	7.3± 0.41 ^A
LIN	0.432 ± 0.0087 ^{Ab}	0.451 ± 0.0166 ^A B	0.416 ± 0.0111 ^A B	0.461±0. 0108 ^A	0.434±0. 0149 ^{AB}	0.410±0. 0143 ^B	0.431±0. 0232 ^B	0.423±0. 0204 ^B	0.243±0. 0240 ^B
STR	0.780 ± 0.0087 ^A	0.766 ± 0.0120 ^A B	0.767 ± 0.0101 ^A B	0.790 ± 0.0088 ^A	0.774 ± 0.0192 ^A B	0.728 ± 0.0113 ^B	0.742 ± 0.0137 ^A B	0.734 ± 0.0114 ^B	0.527± 0.0467 ^B
VAP	49.7 ± 1.5 ^A	42.7 ± 1.41 ^{BC}	47.2 ± 1.54 ^A	48.1 ± 1.43 ^A	44.2 ± 1.23 ^B	42.2 ± 1.29 ^{BC}	40.4 ± 1.46 ^C	41.1 ± 1.28 ^C	29 ± 1.59 ^D
VCL	90.8 ± 3 ^A	75.2± 3.21 ^C	88.6 ± 3.22 ^{AB}	84.6 ± 3.17 ^B	80.5± 2.71 ^{BC}	77.2± 2.96 ^C	74.5 ± 3.65 ^C	75.4 ± 3.47 ^C	61.8± 2.82 ^D
VSL	39.1 ± 1.3 ^A	33.1 ± 1.31 ^{BC}	36.7 ± 1.44 ^{ABC}	38.3 ± 1.26 ^{AB}	34.1 ± 0.98 ^{ABC}	31 ± 1.09 ^C	30.1 ± 1.26 ^C	30.2 ± 0.96 ^C	15.3 ± 0.84 ^C
WOB	0.549 ±0.0074 BC	0.582 ± 0.0146 ^A	0.536 ± 0.0096 ^B C	0.579 ±0.0090 A	0.554 ± 0.0129 ^B C	0.558±0. 0124 ^{ABC}	0.571±0. 0214 ^A	0.567 ±0.0201 AB	0.463 ±0.0219 D
MOT	23.8 ± 1.86 ^A	15.1 ± 0.71 ^C	17.1 ± 1.04 ^B	22± 1.38 ^A	20.7± 1.19 ^{AB}	20.6± 1.52 ^{AB}	13.8± 0.76 ^C	18.9± 1.27 ^B	8.1± 2.58 ^D
MOP	17.2± 1.71 ^A	6 ± 0.67 ^{CD}	7.5± 0.86 ^{CD}	12.4 ± 1.25 ^B	10.3 ± 0.99 ^B	10.6 ± 1.06 ^B	5.1 ± 0.6 ^D	7.2 ± 0.99 ^C	1.4± 0.26 ^E

*Tratamentos TG, TG2,5P, TG5P, TG10P, TG20P, TG30P, TG40P, TG50P, TG100P, TG200P são compostos pelo diluente Tris-gema contendo 0, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 100mM ou 200mM de prolina, respectivamente

**Deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), distância média percorrida (DAP), distância curvilínea (DCL), distância retilínea (DSL), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), velocidade média de percurso (VAP), velocidade curvilínea (VCL), (VSL), wobble- oscilação (WOB), motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP).

Letras distintas demonstram diferença estatística na comparação das médias