

Avaliação da adição de serina no diluente para aprimoramento da conservação de sêmen canino em baixas temperaturas

Evaluation of the addition of serine in the diluent for canine semen conservation improvement in low temperatures

Autor Maria Eduarda Bicca Dode^{1*}, Carine Dahl Corcini¹, Edenara Anastácio da Silva¹, Stela Meneghello Gheller¹, Antônio Sérgio Varela Jr².

RESUMO

A conservação de sêmen canino através da refrigeração promove alterações celulares capazes de interferir na viabilidade dos espermatozoides. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de serina no meio diluidor sobre a cinética espermática do sêmen canino resfriado. Foram realizadas 12 coletas, utilizando 4 cães da raça Australian Cattle Dog sendo ejaculados com motilidade superior a 60% e vigor ≥ 3 . Foram testados diluentes Tris gema 20% (TG) com adição nove concentrações diferentes de serina (S) de 2,5mM a 200mM de S. Um grupo sem aminoácido foi utilizado como controle (TG0). Foram analisados no "Computerized-assisted sperm motility analysis" dos parâmetros de cinética nas horas zero, 24, 48 e 72 de resfriamento a 4° C. A adição de serina em concentrações de até 5 mM são promissoras para uso em diluentes de sêmen canino visando manter os parâmetros de motilidade espermática, sendo o potencial protetor da adição de serina em diluentes sêmen canino é dose e tempo dependente.

Palavras-chave: Aminoácido 1; Cão 2; Resfriamento 3;

ABSTRACT

Canine semen conservation through refrigeration promotes cellular changes capable of interfering with sperm viability. The aim of this study was to evaluate the effect of adding serine to the extender medium on the sperm kinetics of cooled canine semen. Twelve collections were performed, using 4 Australian Cattle Dogs, which were ejaculated with motility greater than 60% and vigor ≥ 3 . 20% Tris yolk (TG) extenders were tested with the addition of nine different concentrations of serine (S) from 2.5mM to 200mM of S. A group without amino acid was used as a control (TG0). The kinetic parameters were analyzed in the "Computerized-assisted sperm motility analysis" at 0, 24, 48 and 72 hours of cooling at 4°C. The addition of serine in concentrations up to 5 mM are promising for use in canine semen extenders. aiming to maintain the parameters of sperm motility, being the protective potential of the addition of serine in canine semen extenders is dose and time dependent.

Keywords: Aminoacid 1; Dog 2; Cooling 3;

¹ Instituição de afiliação Universidade Federal de Pelotas.

*E-mail: dudadode@hotmail.com

² Instituição de afiliação Universidade Federal de Rio Grande.

INTRODUÇÃO

A cinofilia vem avançando e exigindo da medicina veterinária suporte científico e tecnológico capaz de suprir a crescente demanda de criadores e proprietários pelas biotecnologias reprodutivas. O aprimoramento de metodologias aplicáveis à caninos é o reflexo da relevância econômica e social dos cães na sociedade contemporânea pois além do valor zootécnico e de aptidões e habilidades específicas os cães podem ser utilizados como modelo experimental para outras espécies inclusive algumas ameaçadas de extinção (Pena, 2006), como Lobo Vermelho (*Canis rufus*), o Lobo da Etiópia (*Canis simensis*), o Cão de Caça Africano (*Licaon pictus*) bem como para 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).

Manipulações no semen 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). A redução da temperatura amplia o período de armazenamento do sêmen contribuindo para ampliar o período de viabilidade mas, ainda assim, há risco de alterações na estrutura e fisiologia celular devido ao choque térmico, danos mecânicos, estresses químicos e osmóticos do processo de conservação (Khalili, 2010). Acredita-se que a cada 10°C. de redução de temperatura, o metabolismo seja reduzido em 50%, sendo que a temperatura ideal para armazenamento a curto prazo é variável devido a composição dos lipídeos das membranas.

Para obter sucesso no resfriamento é necessário que o meio de diluição previna danos, permita a manutenção do pH, potencial iônico e osmolaridade, e contenha fonte energética (England, 1993). A manutenção da fertilidade do sêmen que sofreu choque

térmico ainda é fator limitante em ovinos, caprinos e caninos e se deve aos danos causados pelo choque térmico, exposição a temperaturas baixas, estresse osmótico e oxidativo de forma isolada ou combinada (BEHERA et al., 2015). Mesmo que se almeje apenas a conservação a curto prazo do semen sob refrigeração, meios diluidores adequados devem ser utilizados. (Santos et al., 2002).

Aminoácidos com cadeias laterais polares desprovidos de carga apresentam carga líquida igual a zero em pH neutro e assim como a treonina e a tirosina, a serina (Ser ou S) possui um grupamento hidroxila capaz de estabelecer pontes de hidrogênio. A cadeia lateral da serina participa como componente importante do sítio ativo em diversas enzimas (Champe et al., 2005; Nelson e COX, 2008).

A fosfatidil-serina é um fosfolípido de membrana que tem sua porção hidrofílica constituída por um grupamento fosfato ligado à serina. A fosfatidil-serina é necessária para a síntese das membranas celulares em mamíferos. A síntese de fosfatidil-serina ocorre através da troca de bases reversível, onde a etanolamina é substituída por serina livre (Champe et al, 2005). Nem todos os autores relataram o efeito positivo da adição de AA no meio de resfriamento de semen, altas concentrações tornam-se prejudiciais pois induzem uma elevação da pressão osmótica causando danos celulares (Uysal, O., Buck, M.N., 2007, Pena, 1998)

Visto às diferenças relativas a espécie e aos indivíduos, para um maior aproveitamento do sêmen é necessário 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 sistema "Computerized-assisted sperm motility analysis" (CASA (SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo os ejaculados utilizados foram obtidos de 12 coletas, realizadas em 4 cães da raça Australian Cattle Dog (1 - 3 anos), de propriedade do Canil Sentinela Farrapo, clinicamente saudáveis, com fertilidade comprovada após monta natural e rotina

de coleta seminal. Todos os animais foram mantidos com as mesmas condições de alimentação e manejo. No experimento apenas ejaculados que apresentassem motilidade superior a 70% e vigor ≥ 3 foram utilizados.

Para elaboração dos meios e diluentes todos os reagentes utilizados neste experimento foram provenientes da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e o diluente composto de Tris gema 20% (TG0) (Varela Junior et al., 2009) sem aminoácidos foi utilizado como controle. Foram testados diluentes com nove concentrações diferentes de Serina (S): TG+ 200mM S (TG200S), TG+ 100mM S (TG100S), TG+ 50mM S (TG50S), TG+ 40mM S (TG40S), TG+ 30mM S (TG30S), TG+ 20mM S (TG20S), TG+ 10mM S (TG10S), TG+ 5mM S (TG5S) e TG+ 2,5mM S (TG2,5S).

As coletas de semen foram realizadas por manipulação digital e a frequência de coleta dos cães foi de duas vezes por semana. Imediatamente após a coleta foi avaliado o volume e a concentração do ejaculado. Volume foi mensurado utilizando micropipetadora. Concentração foi determinada através da câmara de Neubauer. Os ejaculados foram então fracionados entre os 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 CASA 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 foram: Motilidade total (MT) e progressiva (MP), Distancia média percorrida (DAP), Distancia Curvilínea (DCL), distancia 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). Cada amostra foi avaliada em pelo menos 6 à 10 campos escolhidos aleatoriamente, 150 à 200

espermatozoides foram avaliados em cada campo. Foi realizada a análise estatística one-way anova no software Statistix 9.0 (2010).

RESULTADOS

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). Como resultado deste estudo encontrou-se diferença estatística significativa na análise da motilidade espermática sendo esta dependente da concentração de serina e do período de conservação sob resfriamento analisado (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	63,3 ^A	59,2 ^{AB}	61,1 ^A	57,7 ^{AB}	57,9 ^{AB}	51,6 ^{BC}	44,3 ^C	46,7 ^C	27,0 ^D	15,7 ^E
MP	57,6 ^A	52,3 ^{AB}	55,1 ^A	50,1 ^{AB}	50,5 ^{AB}	43,0 ^{BC}	35,5 ^C	35,6 ^C	16,2 ^D	7,8 ^D
DAP	28,9 ^{BC}	29,3 ^{AB}	31,3 ^A	28,8 ^{BC}	28,2 ^{BC}	26,6 ^{CD}	24,5 ^{DE}	22,2 ^E	17,6 ^E	15,3 ^F
DCL	48,9 ^B	49,1 ^B	54,2 ^A	48,7 ^B	49,2 ^B	47,1 ^B	41,6 ^C	38,8 ^C	30,0 ^D	26,4 ^D
DSL	23,4 ^B	24,6 ^{AB}	26,3 ^A	23,9 ^B	22,5 ^{BC}	21,1 ^{CD}	19,6 ^D	17,3 ^E	13,6 ^F	11,7 ^F
VAP	63,7 ^B	64,9 ^{AB}	69,8 ^A	64,3 ^B	62,8 ^{BC}	58,0 ^{CD}	54,4 ^{CD}	48,5 ^E	39,1 ^F	36,1 ^F
VCL	107,5 ^B	108,5 ^B	120,4 ^A	108,3 ^B	109,5 ^B	102,7 ^C	91,8 ^C	84,6 ^C	65,9 ^D	61,4 ^D
VSL	51,5 ^B	54,4 ^{AB}	58,4 ^A	53,2 ^B	50,1 ^{BC}	46,1 ^{CD}	43,7 ^D	37,8 ^E	30,4 ^F	27,6 ^F
STR	0,794 ^{BC}	0,830 ^A	0,831 ^A	0,816 ^{AB}	0,785 ^C	0,777 ^{CD}	0,792 ^C	0,758 ^E	0,777 ^{CD}	0,762 ^{CD}

LIN	0,473 ^{AB} _C	0,501 ^A	0,491 ^A	0,497 ^A	0,453 ^B _C	0,443 ^C	0,485 ^A _B	0,449 ^C	0,500 ^A	0,473 ^{AB} _C
WO B	0,591 ^{BC} _D	0,600 ^{AB} _C	0,585 ^{BC} _D	0,600 ^{AB} _C	0,573 ^A _B	0,564 ^D	0,608 ^A _B	0,588 ^{BC} _D	0,631 ^A	0,612 ^{AB}
ALH	4,17 ^{BCD}	4,24 ^{BC}	4,62 ^A	4,38 ^{AB}	4,40 ^{AB}	4,05 ^{CD}	3,85 ^{DE}	3,43 ^F	3,06 ^G	3,62 ^{EF}
BCF	20,5 ^A	17,7 ^{AB}	15,9 ^{BCD}	15,7 ^{BCD}	16,2 ^{BC} _D	16,3 ^{BC}	15,2 ^{BC} _D	15,3 ^{BCD}	13,3 ^{CD}	12,1 ^D

Tabela 1. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA na hora zero (Computer Assisted Sperm Analysis).

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$). Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$). Fonte: Dode et al (2022).

Tabela 2. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM,200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 24 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	64,2 ^A	55,9 ^B	51,7 ^B	40,5 ^C	28,8 ^D	39,7 ^C	29,8 ^D	28,8 ^D	20,6 ^E	18,9 ^E
MP	56,7 ^A	47,4 ^B	43,8 ^B	31,4 ^C	20,0 ^D	31,0 ^C	21,3 ^D	17,8 ^{DE}	10,9 ^E	11,5 ^E
DAP	30,6 ^A	28,9 ^{AB}	27,0 ^B	24,7 ^C	20,9 ^D	23,7 ^C	21,1 ^D	20,9 ^D	19,0 ^D	13,9 ^E
DCL	50,7 ^A	49,2 ^{AB}	45,5 ^{BC}	43,0 ^{CD}	35,1 ^F	40,8 ^{DE}	37,0 ^{EF}	36,6 ^F	34,5 ^F	20,5 ^G

DSL	25,7 ^A	24,2 ^{AB}	22,6 ^B	20,1 ^C	17,1 ^{DE}	19,0 ^{CD}	16,8 ^E	16,2 ^{EF}	14,4 ^F	11,6 ^G
VAP	67,1 ^A	64,4 ^A	59,9 ^B	54,8 ^C	47,2 ^D	53,5 ^C	46,4 ^D	46,0 ^D	42,7 ^D	33,0 ^E
VCL	111,1 ^A	109,1 ^{AB}	100,6 ^{BC}	94,8 ^{CD}	78,2 ^E	91,4 ^D	80,7 ^E	80,2 ^E	76,3 ^E	48,0 ^F
VSL	56,4 ^A	53,7 ^{AB}	50,0 ^B	44,4 ^C	38,8 ^D	43,1 ^C	37,2 ^D	35,8 ^{DE}	32,7 ^E	27,7 ^F
STR	0,831 ^A	0,826 ^{AB}	0,828 ^A	0,800 ^{BC}	0,820 ^A _B	0,800 ^{BC}	0,792 ^{CD}	0,770 ^D _E	0,763 ^E	0,846 ^A
LIN	0,501 ^B _C	0,491 ^{BCD} _E	0,496 ^{BC} _D	0,467 ^{CD} _E	0,525 ^B _C	0,479 ^{CD} _E	0,474 ^{CD} _E	0,459 ^E	0,460 ^{DE}	0,632 ^A
WO B	0,600 ^B _C	0,589 ^B	0,596 ^C	0,578 ^C	0,632 ^B	0,594 ^C	0,589 ^C	0,589 ^C	0,591 ^C	0,739 ^A
ALH	3,96 ^{AB}	4,25 ^A	3,95 ^{AB}	3,76 ^{BC}	3,65 ^{BC}	3,88 ^B	3,30 ^{DE}	3,54 ^{CD}	3,46 ^{CD}	3,02 ^E
BCF	23,4 ^A	17,2 ^B	18,0 ^B	16,7 ^B	13,0 ^{CD}	15,6 ^{BC}	17,0 ^B	16,7 ^B	15,2 ^{BC}	10,8 ^D

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$). Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$). Fonte: Dode et al (2022).

Tabela 3. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 48 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	38,1 ^B	36,7 ^B	47,8 ^A	39,0 ^B	25,3 ^C	28,3 ^C	23,9 ^C	23,7 ^C	10,3 ^D	9,2 ^D
MP	29,1 ^B	28,1 ^B	39,7 ^A	29,4 ^B	17,8 ^{CD}	19,5 ^C	13,2 ^D	11,8 ^D	2,6 ^E	0,9 ^E
DAP	24,5 ^{BC}	24,8 ^{ABC}	26,8 ^A	25,5 ^{AB}	22,8 ^{CD}	20,5 ^E	20,9 ^{DE}	19,6 ^E	16,8 ^F	13,1 ^E

DCL	42,9 ^{AB}	43,5 ^{AB}	45,6 ^A	43,9 ^{AB}	40,1 ^{BC}	35,3 ^D	37,0 ^{CD}	36,0 ^C	29,8 ^E	19,4 ^F
DSL	20,1 ^{BC}	20,4 ^B	22,1 ^A	21,1 ^C	18,5 ^C	16,4 ^D	16,5 ^D	14,4 ^E	12,3 ^{EF}	10,1 ^F
VAP	54,1 ^{BC}	55,2 ^B	60,1 ^A	56,8 ^{AB}	50,8 ^C	46,4 ^D	46,6 ^D	43,3 ^D	37,5 ^E	35,4 ^E
VCL	94,3 ^{AB}	96,7 ^A	101,9 ^A	97,4 ^A	88,5 ^{BC}	79,6 ^D	82,0 ^{CD}	78,7 ^D	65,5 ^E	50,7 ^F
VSL	44,3 ^{BC}	45,5 ^B	50,1 ^A	47,0 ^{AB}	41,3 ^C	37,3 ^D	36,8 ^D	31,8 ^E	27,4 ^E	27,5 ^E
STR	0,809 ^{AB}	0,812 ^{AB}	0,832 ^A	0,819 ^{AB}	0,808 ^{BC}	0,801 ^{BC}	0,782 ^D	0,726 ^E	0,735 ^E	0,787 ^C
LIN	0,466 ^{CD}	0,465 ^{CD}	0,504 ^{BC}	0,481 ^{BC}	0,481 ^{BC}	0,490 ^{AB}	0,453 ^D	0,404 ^E	0,455 ^C	0,577 ^A
WO B	0,572 ^{CD}	0,569 ^{DE}	0,601 ^{BC}	0,583 ^{BC}	0,589 ^{BC}	0,603 ^B	0,576 ^{BCD}	0,550 ^E	0,609 ^B	0,716 ^A
ALH	3,86 ^{CDE}	3,94 ^{BC}	4,17 ^{AB}	3,91 ^{CD}	3,92 ^{BC}	3,78 ^{CDE}	3,63 ^E	3,65 ^{DE}	3,68 ^{CDE}	4,38 ^A
BCF	15,7 ^A	17,1 ^A	16,5 ^A	16,8 ^A	16,3 ^A	14,6 ^A	16,9 ^A	16,2 ^A	13,2 ^A	6,2 ^B

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$). Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), reilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$). Fonte: Dode et al (2022).

Tabela 4. Efeito da adição diferentes concentrações de serina (0mM, 2,5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM) no diluente TG em amostras resfriadas de sêmen canino sobre parâmetros de motilidade espermática analisado pelo CASA nas 72 horas (Computer Assisted Sperm Analysis).

	TG0	TG2,5S	TG5S	TG10S	TG20S	TG30S	TG40S	TG50S	TG100S	TG200S
MT	23,8 ^B	27,7 ^A	21,6 ^B	15,5 ^C	15,4 ^C	13,8 ^C	16,3 ^C	15,9 ^C	15,8 ^C	11,9 ^C
MP	17,2 ^A	18,3 ^A	11,8 ^B	7,3 ^{CD}	5,0 ^{CD}	5,3 ^{CD}	8,2 ^C	6,3 ^{CD}	5,5 ^{CD}	1,2 ^D
DAP	22,7 ^A	23,4 ^A	22,3 ^A	22,3 ^A	18,6 ^B	17,5 ^B	19,5 ^B	18,8 ^B	17,1 ^B	7,8 ^C

DCL	41,7 ^A	42,1 ^A	41,4 ^A	40,8 ^A	32,2 ^B	30,4 ^{BC}	35,0 ^B	35,5 ^B	30,7 ^{BC}	10,2 ^D
DSL	17,9 ^A	18,7 ^A	17,8 ^A	17,3 ^A	14,2 ^B	13,1 ^B	14,6 ^B	13,7 ^B	12,6 ^B	6,5 ^C
VAP	49,7 ^{AB}	51,4 ^A	49,0 ^{AB}	47,5 ^B	41,3 ^C	39,2 ^C	43,2 ^C	40,7 ^C	39,1 ^C	16,1 ^D
VCL	90,8 ^A	92,2 ^A	90,4 ^A	86,6 ^A	70,4 ^{BC}	67,6 ^C	76,9 ^B	76,7 ^{BC}	68,4 ^{BC}	21,0 ^D
VSL	39,1 ^A	41,0 ^A	39,0 ^A	36,9 ^B	31,6 ^C	29,7 ^C	32,5 ^C	29,6 ^C	29,2 ^C	13,5 ^D
STR	0,781 ^A	0,792 ^A	0,788 ^A	0,765 ^{AB}	0,761 ^A _B	0,758 ^A _B	0,745 ^A _B	0,724 ^B	0,749 ^{AB}	0,838 ^A
LIN	0,432 ^A	0,442 ^A	0,435 ^A	0,426 ^{AB}	0,464 ^A _B	0,468 ^A _B	0,428 ^A _B	0,389 ^B	0,448 ^{AB}	0,680 ^A
WOB	0,549 ^C _D	0,554 ^C _D	0,549 ^C _D	0,554 ^C _D	0,601 ^B	0,610 ^B	0,568 ^C	0,535 ^D	0,588 ^{BC}	0,808 ^A
ALH	3,90 ^A	3,90 ^A	3,68 ^{AB}	3,35 ^C	3,43 ^{BC}	3,15 ^C	3,36 ^{BC}	3,07 ^C	3,63 ^{ABC}	0,67 ^D
BCF	17,4 ^A	16,7 ^A	18,0 ^A	17,8 ^A	13,9 ^{BC}	14,9 ^{ABC}	18,2 ^A	16,5 ^{AB}	19,6 ^A	9,2 ^C

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas ($P > 0.05$). Motilidade total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), Deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, μm), distância média percorrida (DAP, μm), distância curvilínea (DCL, μm), distância retilínea (DSL, μm), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (VSL, $\mu\text{m/s}$), wobble – oscilação (WOB, $\mu\text{m/s}$). Fonte: Dode et al (2022).

A manutenção da motilidade segundo HAY et al. (1997) esta relacionada ao movimento progressivo. Quando analisado pelo sistema Casa logo após a diluição (hora zero, Tabela 1), os resultados para motilidade total e progressiva nos tratamentos TG0 (63,3 e 57,6% respectivamente), TG2,5S (59,2 e 52,3%), TG5S (61,1 e 55,1%), TG10S (57,7 e 50,1%) e TG20S (57,9 e 50,5%) apresentaram resultados superiores aos demais tratamentos. Nos parâmetros DAP, DSL, VAP e VSL analisados resultados obtido nos tratamentos TG2,5S (29,3 e 24,6 μm , 64,9 e 54,4 $\mu\text{m/s}$ respectivamente) e TG5S (31,3 e 26,3 μm , 69,8 e 58,4 $\mu\text{m/s}$) foram superiores aos demais tratamentos.

Após 24 horas (Tabela 2) de resfriamento o tratamento controle apresentou motilidade total e progressiva superiores (64,2 e 56,7%) . Os parâmetros DAP, DCL, DSL, VAP, VCL e VSL nos tratamentos TG0 (30,6, 50,7 e 25,7 μm , 67,1, 111,11 e 56,4 $\mu\text{m/s}$) e TG2,5S (28,9, 49,2 e 24,2 μm , 64,4, 109,1 e 53,7 $\mu\text{m/s}$) foram significativamente superiores.

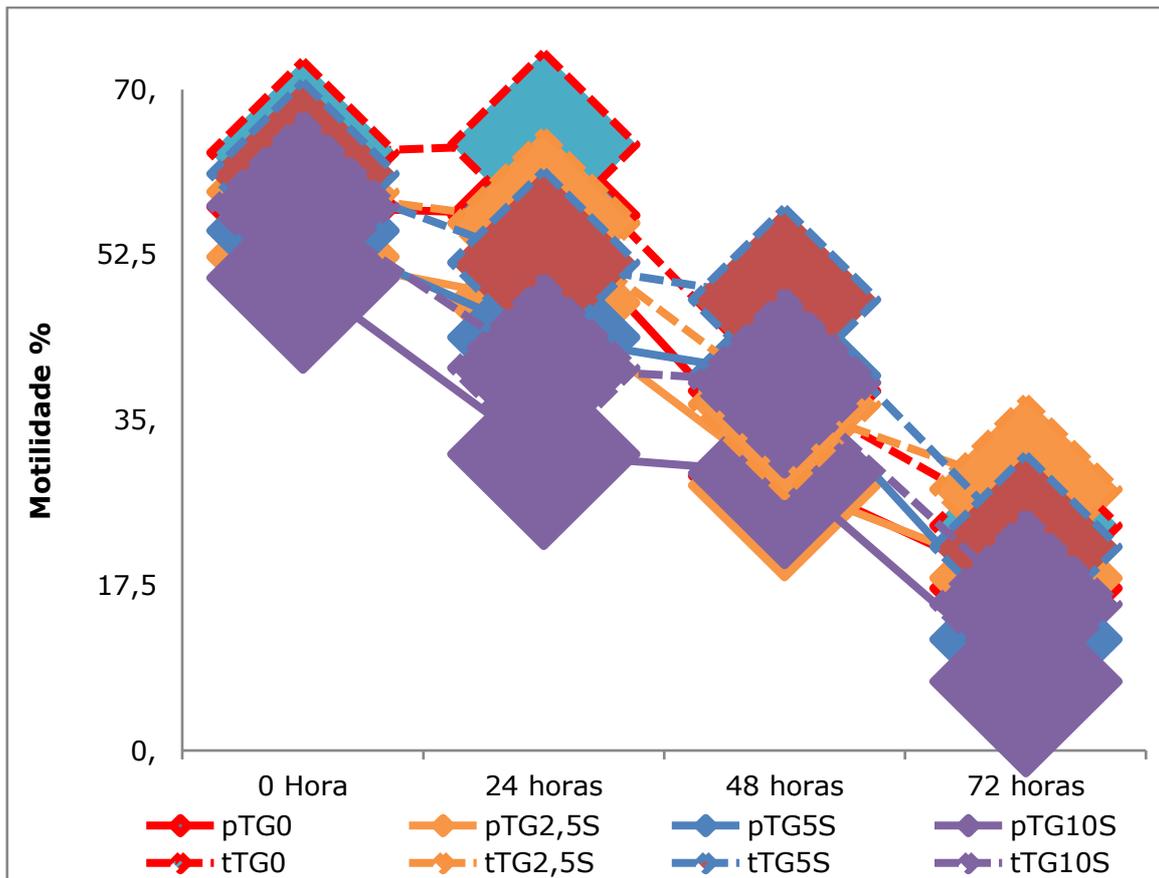
Mesmo após 48 horas (Tabela 3) de resfriamento, os parâmetros motilidade total e progressiva e DAP do tratamento contendo a concentração de serina de 5 mM (47,8 e

39,7%, 22,1 μ m respectivamente), demonstrou resultados superiores aos demais tratamentos. Nos parâmetros VAP e VSL, obtivemos resultados superiores nos tratamentos TG5S (60,1 e 50,1 μ m/s) e TG10S (56,8 e 47,0 μ m/s).

Após resfriamento de 72 horas (Tabela 4), na avaliação de motilidade total, o tratamento TG2,5S (27,7%) foi superior, já a motilidade progressiva não diferiu nos tratamentos TG2,5S (18,3%) e TG0 (17,2%) sendo esses superiores aos demais. Já os parâmetros DAP, DCL, DSL e VAP, nos tratamentos TG0 (22,7, 41,7 e 17,9 μ m e 90,8 μ m/s), TG2,5S (23,4, 42,1 e 18,7 μ m e 92,2 μ m/s), TG5S (22,3, 41,1 e 17,8 μ m e 90,4 μ m/s) e TG10S (22,3, 40,8 e 17,3 μ m e 86,6 μ m/s) foram os que apresentaram resultados superiores aos demais. Até mesmo após 72h, as amostras apresentaram viabilidade quando foi acrescentado 200mMol de serina ao diluente base Tris-gema (Tabela 4).

A Figura 1 representa visualmente as curvas de motilidade total e progressiva das amostras de semen canino resfriado, tratadas com diferentes doses de serina no meio diluente em relação ao controle (dose 0) durante 48h. No tempo 0, a presença do aminoácido até 10mM não altera o percentual de motilidade total e progressiva. Observa-se a mesma tendência de curva para motilidade total e progressiva no controle e no tratamento contendo 2,5mM de serina e para os tratamentos 5 e 10mM. Após 24h de tratamento, nas concentrações de 5 e 10mM observa-se um platô com menor perda de viabilidade apontando o efeito protetor de concentrações baixas da serina no meio de diluição durante o processo de refrigeração. Valores de motilidade total e progressiva obtidos no período de refrigeração de 48h no meio diluente contendo 5mM de serina foram superiores aos observados no controle indicando um efeito protetor enquanto que após 72h o meio contendo 2,5mM de serina apresentou motilidade total significativamente superior ao controle, indicando uma ampliação da viabilidade dos espermatozoides.

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de Serina (2,5 mM, 5 mM e 10 mM) e o controle (0), em amostras de sêmen canino, resfriados a 4°C por 72 horas sobre os parâmetros de motilidade espermática progressiva (p) e total (t) analisados no CASA (computer Assisted Sperm Analysis).



Fonte: Dode et al (2022).

Estudos em diferentes espécies apresentam resultados amplamente variáveis quanto aos aminoácidos a serem utilizados e as concentrações mais adequadas (Tuck et al., 1970; Trimeche et al., 1999; Sexton, 1971; Pena, 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de serina em concentrações de até 5 mM são promissoras para uso em diluentes de semen canino visando manter os parâmetros de motilidade espermática, sendo o potencial protetor da adição de serina em diluidores de semen canino é dose e tempo dependente. . Novos estudos serão realizados buscando estabelecer a relação entre os parâmetros avaliados a eficiência funcional do semen canino.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.1463p.
- BALL,B.A., MEDINA C., GRAVANCE, C.G.,BAUMER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, n.56, p.577-589, 2001.
- BEHERA, S., HARSHAN, H.M., BHAI, K.L., GHOSH, K.N.A. Effect of cholesterol supplementation on cryosurvivalof goat spermatozoa. **Veterinary World**, v.8, n.12, 1386-1391, 2015.
- 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 VeterinAry Scandinaviae*, 32: 431-453, 1991.England, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. 47: 243-255, 1993.
- CHAMPE. P., HARVEY, R.A., FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3a. Ed. Porto Alegre: Artmed. 544p. 2005
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. 47: 243-255, 1993.
- FARSHAD, A., HOSSEINI, Y. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on colled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. **Small Ruminant Research** n.114, p.258-263, 2013.
- 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.
- HOTTINSHEAD, F. Artificial insemination with canine semem. Disponível em:Acesso em 31 de janeiro de 2018.
- 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.
- KIERSSZENBAUM, A.L., **Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia**. 2.a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.667p

KHALILI, B., JAFAROGHLI, M., FARSHAD, A AND PARESH-KHIAVI, M. The Effects of Different Concentrations of Glycine and Cysteine on the Freezability of Moghani Ram Spermatozoa. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** Vol. 23, No. 3 : 318 - 325, 2010.

KUNDU, C.N., DAS, K., MAJUNDER, G.C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, n.41, p.21-27, 2001.

LI, Y., Si, W., ZHANG, W., DINNYES, A., JI, W., Effect of amino acids on cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. **American Journal of Primatology**, n.59. p.159-165, 2003.

MARTIN-BESSA, A., ROCHA, A., MAYENCO-AGUIRRE, A., Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Therionthology**. n.68, p.1088-1096, 2007.

MATOS, D.L., ARAÚJO, A.A., TONIOLLI, R.R. Análise computadorizada de espermatozóides: revisão de literatura. **Rev. Bras.Reprod. Animal**. Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 5a. Ed. Nova York: W.H. Freeman and Company, 2008. 1157p

OLLERO, M.; PEREZ-PE, T., MUINO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, A., Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Criobiology**. n.37, p.1-12, 1998.

PENA, A.I., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADON, P.G., Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reprod. Dom Anim**. n.33, p.5-9, 1998.

PENA, F.J., NÚÑEZ-MARTINEZ, I., MORÁN, J.M., Sêmen Technologies in dog breeding: an update. **Reprod.Dom. Anim**. s.2, p.21-29, 2006.

RENARD, P., GRIZARD, G., GRIVEAU, J.F., SION, B., BOUCHER, D., LANNOU, D. Improvement of motility and fertilization potential postthaw human sperm using glutamine. **Cryobiology**. n.33, p.311-319, 1996.

RODRIGUES-MARTINEZ, H.; EK WALL, 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.

SANTOS, M.R.C., ALMEIDA, L.E.F., QUEIROZ, F.J.R. Meio extensor para manutenção de sêmen canino resfriado em contêiner para transporte a longa distância. **R. Bras.Ci. Vet.**, v.9, n.2, p.83-85, 2002

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy & parturition**. 3rd. Ed. Redmon: Current Conceptions. Inc. 2012, 381p.

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. Congelamento 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.

UYSAL, Q., BUCAK, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet BRNO*, n.76, p.383-390, 2007.

TUCK, R.R., SETCHELL, B.P., WAITES, G.M.H., YOUNG, J.A. The composition of fluid collected by micropuncture and catherization 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.