

# DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO PARA MELHORIA DE SUA CINÉTICA E VIABILIDADE

Renata Patrícia Rigoto<sup>1</sup>  
 Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>2</sup>  
 André Maciel Crespillo<sup>3</sup>  
 Camila de Paula Freitas Dell'Aqua<sup>4</sup>  
 José Antônio Dell'Aqua Junior<sup>4</sup>  
 Rosiara Rosaria Dias Maziero<sup>5</sup>

RIGOTO, R. P.; GUAITOLINI, C. R. de F.; CRESPILO, A. M.; DELL'AGUA, C. de P. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; MAZIERO, R. R. D. Diferentes protocolos de congelação de sêmen canino para melhoria de sua cinética e viabilidade. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 22, n. 3, Anais do III Concivet 2019, p. 95-96, abr./jun. 2019.

**RESUMO:** A maioria dos protocolos utilizados para a criopreservação de sêmen canino, se baseiam em metodologias descritas para outras espécies. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar diferentes protocolos de congelação para sêmen desta espécie doméstica. Para tanto, foram utilizados 3 machos, adultos, da raça Bulldog Campeiro, com idades entre 2 a 5 anos e fertilidade comprovada. Foram realizadas 5 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  $100 \times 10^6$  espermatozoides por mL. No grupo 1, as amostras foram diluídas diretamente em meio de congelação comercial Botudog® (Botupharma Biotecnologia Animal). No grupo 2, as amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 minutos e em seguida, o pellet foi ressuscitado em meio de congelação comercial Botudog®. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL com concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides viáveis. Em seguida, as amostras permaneceram por 1 hora em estabilização a 5°C. Logo após, transferidas para o vapor de nitrogênio durante 10 minutos, e por fim, mergulhadas em nitrogênio e armazenadas em botijão criogênico. As palhetas foram descongeladas a 46°C por 15 segundos. Foram avaliados os parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal (IMPA, %). Verificou-se que os parâmetros de motilidade total (%), velocidade linear progressiva (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (%), percentagem de espermatozoides rápidos (%) e integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliados por citometria de fluxo foram superiores no grupo 1, em que as amostras não foram centrifugadas. Estes dados demonstram que, o protocolo para congelação de sêmen canino, utilizando o diluente Botudog®, não preconiza a centrifugação do ejaculado, previamente a congelação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análises espermáticas. Cães. Congelação.

## DIFFERENT CANINE SEMEN FREEZING PROTOCOLS TO IMPROVE KINETICS AND VIABILITY

**ABSTRACT:** Most protocols used for canine semen cryopreservation are based on methodologies described for other species. Thus, this study aims at evaluating different freezing protocols for semen of this domestic species. To this end, 3 adult Bulldog Campeiro males aged 2 to 5 years and proven fertility were used. Five semen samples were collected from each animal using the digital manipulation of the penile bulb method, prioritizing the second fraction of the ejaculate. The collected samples were divided into 2 groups, with a concentration of  $100 \times 10^6$  sperm per mL. In group 1, the samples were diluted directly into Botudog® commercial freezing medium (Botupharma Animal Biotechnology). In group 2, the samples were centrifuged at 600 g for 10 minutes and then the pellet was resuspended in commercial Botudog® freezing medium. The samples were packed in 0.5 mL straws with a concentration of  $50 \times 10^6$  viable sperm. Then, the samples remained for 1 hour in stabilization at 5°C. Afterwards, they were transferred to nitrogen vapor for 10 minutes, and finally, dipped in nitrogen and stored in cryogenic cylinder. The straws were thawed at 46°C for 15 seconds. Parameters for spermatoc kinetics, and plasma and acrosomal membrane integrity (IMPA, %) were evaluated. Total motility (%), progressive linear velocity (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), linearity (%), percentage of rapid sperm (%) and membrane integrity were found. Plasma and acrosomal samples evaluated by flow cytometry were higher in group 1, where samples were not centrifuged. These data demonstrate that the protocol for canine semen freezing using Botudog® diluent does not recommend centrifugation of the ejaculate prior to freezing.

**KEYWORDS:** Dogs. Freezing. Sperm analysis.

DOI: 10.25110/arqvet.v22i3.2019.7889

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense, UNIPAR.

<sup>2</sup>Pós doutorando em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da UNIPAR.

<sup>3</sup>Docente na Universidade de Santo Amaro, São Paulo.

<sup>4</sup>Pesquisador Técnico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Botucatu.

<sup>5</sup>Docente do curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos, UNIPAR. rosiaramaziero@prof.unipar.br

## DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN CANINO PARA MEJORÍA DE SU CINÉTICA Y VIABILIDAD

**RESUMEN:** La mayoría de los protocolos utilizados para la criopreservación de semen canino se basan en metodologías descritas para otras especies. Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivo evaluar diferentes protocolos de congelación para el semen de esta especie doméstica. Con este fin, se utilizaron 3 machos, adultos, de la raza Bulldog Campero, con edades entre 2 a 5 años y fertilidad comprobada. Se realizaron cinco recolecciones de semen de cada animal mediante el método de manipulación digital del bulbo del pene, priorizando la segunda fracción de la eyaculación. Las muestras recolectadas se dividieron en 2 grupos, con una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por mL. En el grupo 1, las muestras se diluyeron directamente en medio de congelación comercial Botudog® (Botupharma Animal Biotechnology). En el grupo 2, las muestras fueron centrifugadas a 600 g durante 10 minutos y luego el pellet fue resuspendido en medio de congelación comercial Botudog®. Las muestras se envasaron en paletas de 0,5 mL con una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides viables. Luego, las muestras permanecieron durante 1 hora en estabilización a 5°C. Posteriormente, se transfirieron al vapor de nitrógeno durante 10 minutos y, finalmente, se sumergieron en nitrógeno y se almacenaron en un cilindro criogénico. Las paletas se descongelaron a 46°C durante 15 segundos. Se han evaluado los parámetros de la cinética espermática y la integridad de la membrana plasmática acrosomal (IMPA, %). Se verificó que los parámetros de motilidad total (%), velocidad lineal progresiva (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), linealidad (%), porcentaje de espermatozoides rápidos (%) e integridad de la membrana plasmática y acrosomal evaluadas por citometría de flujo, fueron mayores en el grupo 1, donde las muestras no fueron centrifugadas. Estos datos demuestran que, el protocolo para la congelación de semen canino, usando el diluyente Botudog®, no preconiza la centrifugación del eyaculado, previamente a la congelación.

**PALABRAS CLAVE:** Análisis espermáticas. Perros. Congelación.

Recebido em: 22.08.2019

Aceito em: 06.11.2019