

EFICIÊNCIA DE TRÊS DILUIDORES INESPECÍFICOS NA REFRIGERAÇÃO DO SEMEN DE COELHO (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*)

Natan Dias de Oliveira¹

Pablo Arruda Caires¹

Fernanda Cristine Figueiredo Fernandes²

Júlio César Oliveira Dias³

Ana Carolina Leite Albeny³

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a viabilidade seminal de coelhos após refrigeração a 5°C utilizando três diluentes comerciais, indicados para refrigeração de sêmen de outras espécies monogástricas. Foram realizadas dez colheitas de sêmen de cada reprodutor. Os ejaculados de cada coelho eram misturados, obtendo-se um *pool* de sêmen. Em seguida, o *pool* heterospermico foi dividido em três tratamentos, de acordo com o diluente utilizado: BotuDog[®] (cães); BotuSemen[®] (equinos); e Beltsville Thawing Solution – BTS[®] (suínos). As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros macroscópicos, microscópicos e funcionais em quatro momentos: sêmen fresco (0 h) e refrigerado (16, 24 e 48 h). Os valores médios de motilidade, vigor e defeitos totais do sêmen fresco foram de 86,0%, 3,05 e 11,5%, respectivamente. Após o início do resfriamento, observou-se comportamento linear decrescente para a motilidade e vigor espermático do sêmen em função do tempo, diferindo ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Destaca-se que o tratamento diluído em BTS[®] apresentou redução na manutenção dos parâmetros avaliados de forma mais pronunciada ($P < 0,05$) ao longo do tempo, apresentando os menores valores para motilidade e vigor espermático dentro de cada tempo avaliado: 16h [$20,6 \pm 7,28$ e $0,75$ ($0,375 - 1,5$)], 24h [$12,0 \pm 6,80$ e 0 ($0 - 1,0$)] e 48h [$3,0 \pm 2,13$ e 0 ($0 - 0,125$)]. Após 48 h de resfriamento, o BotuDog[®] foi o que apresentou maior valor para motilidade espermática ($71,0 \pm 2,08$) e, juntamente, com o BotuSemen[®] apresentaram maior valor para vigor espermático (2,5). De acordo com os dados obtidos os diluentes BotuDog[®] e BotuSemen[®] mostraram-se eficientes em manter parâmetros espermáticos adequados, apresentando boa viabilidade espermática em até 48h pós refrigeração a 5°C. Foram obtidos, resultados inéditos quanto a parâmetros espermáticos do sêmen de coelho refrigerado que podem ser utilizados como valores de referência para o manejo reprodutivo e processamento do semen desses animais, visto a inexistência dessas recomendações técnicas.

Palavras-chave: crioprotetor; cunicultura; diluidor; espermatozoide; inseminação artificial.

EFFICIENCY OF THREE UNSPECIFIC DILUENTS IN REFRIGERATION OF RABBIT (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) SEMEN

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the seminal viability of rabbits after refrigeration at 5°C using three commercial diluents, indicated for refrigeration of semen from other monogastric species. Ten semen collections were performed from each breeder. The ejaculates of each rabbit were mixed, obtaining a pool of semen. Then, the heterospermic pool was divided into three treatments, according to the diluent used: BotuDog[®] (dogs); BotuSemen[®] (horses);

¹ Graduando em Medicina Veterinária no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas/. ndias404@gmail.com

² Mestranda no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas. nandah_crisvet@hotmail.com

³ Docente no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas/ julio.dias@ifnmg.edu.br

and Beltsville Thawing Solution – BTS[®] (pigs). The samples were evaluated for macroscopic, microscopic, and functional parameters in four moments: fresh (0 h) and refrigerated (16, 24, and 48 h) semen. The average values of motility, vigor, and total defects of fresh semen were 86.0%, 3.05 and 11.5%, respectively. After the beginning of cooling, a decreasing linear behavior was observed for motility and sperm vigor of semen as a function of time, differing ($P < 0.05$) between treatments. It is noteworthy that the treatment diluted in BTS[®] showed a more pronounced reduction in the maintenance of the evaluated parameters ($P < 0.05$) over time, with the lowest values for sperm motility and vigor within each evaluated time: 16h [20.6 ± 7.28 and 0.75 (0.375 - 1.5)], 24h [12.0 ± 6.80 and 0 (0 - 1.0)] and 48h [3.0 ± 2.13 and 0 (0 - 0.125)]. After 48 h of cooling, BotuDog[®] presented the highest value for sperm motility (71.0 ± 2.08) and, together with BotuSemen[®], presented the highest value for sperm vigor (2.5). According to the data obtained, BotuDog[®] and BotuSemen[®] diluents were efficient in maintaining adequate sperm parameters, showing good sperm viability in up to 48 hours after refrigeration at 5°C. Through this work, unpublished results were obtained regarding spermiatic parameters of refrigerated rabbit semen that can be used as reference values for reproductive management and semen processing of these animals, given the lack of these technical recommendations.

Keywords: cryoprotectant; rabbit farming; diluter; spermatozoid; artificial insemination.

EFICIENCIA DE TRES DILUYENTES INESPECÍFICOS EN LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad seminal de conejos después de refrigeración a 5°C utilizando tres diluyentes comerciales, indicados para la refrigeración de semen de otras especies monogástricas. Se realizaron diez colectas de semen de cada reproductora. Se mezclaron los eyaculados de cada conejo, obteniendo un pool de semen. Luego, el pool heterospérmico se dividió en tres tratamientos, según el diluyente utilizado: BotuDog[®] (perros); BotuSemen[®] (caballos); y Beltsville Thawing Solution – BTS[®] (cerdos). Las muestras fueron evaluadas para parámetros macroscópicos, microscópicos y funcionales en cuatro momentos: semen fresco (0 h) y refrigerado (16, 24 y 48 h). Los valores promedio de motilidad, vigor y defectos totales del semen fresco fueron 86,0%, 3,05 y 11,5%, respectivamente. Después del inicio del enfriamiento, se observó un comportamiento lineal decreciente para la motilidad y el vigor espermático del semen en función del tiempo, difiriendo ($P < 0.05$) entre tratamientos. Cabe destacar que el tratamiento diluido en BTS[®] mostró una reducción más pronunciada en el mantenimiento de los parámetros evaluados ($P < 0,05$) a lo largo del tiempo, con los valores más bajos de motilidad espermática y vigor dentro de cada tiempo evaluado: 16h [$20,6 \pm 7,28$ y $0,75$ (0,375 - 1,5)], 24h [$12,0 \pm 6,80$ y 0 (0 - 1,0)] y 48h [$3,0 \pm 2,13$ y 0 (0 - 0,125)]. Después de 48 h de enfriamiento, BotuDog[®] presentó el valor más alto de motilidad espermática ($71,0 \pm 2,08$) y, junto con BotuSemen[®], presentó el valor más alto de vigor espermático (2,5). De acuerdo con los datos obtenidos, los diluyentes BotuDog[®] y BotuSemen[®] fueron eficientes en mantener parámetros espermáticos adecuados, mostrando buena viabilidad espermática hasta 48 horas después de la refrigeración a 5°C. A través de este trabajo se obtuvieron resultados inéditos respecto a parámetros espermáticos de semen de conejo refrigerado que pueden ser utilizados como valores de referencia para el manejo reproductivo y procesamiento de semen de estos animales, dada la falta de estas recomendaciones técnicas.

Palabras clave: crioprotector; cunicultura; diluyente; espermatozoide; inseminación artificial

INTRODUÇÃO

Os parâmetros de qualidade seminal detêm grande importância, não apenas por que se correlacionam diretamente com o potencial fertilizante e prolificidade dos machos, mas porque atestam a fertilidade potencial das doses seminais quando empregadas na técnica de inseminação artificial (IA) (1, 2, 3).

A prática dessa biotecnologia em coelhos facilita a introdução de material genético de países com maior heterose, o que por sua vez, possibilita a formação de populações reprodutoras dessas raças no Brasil, dessa forma, atuando de forma positiva quanto a redução da endogamia, problema frequente na atividade. Somado a isso, permite o aperfeiçoamento do controle sanitário, a redução do número de machos, assim como o aumento da organização, pelo agrupamento de animais com estágios reprodutivos semelhantes e da parição por lotes (4, 5).

Atualmente, o emprego da técnica de IA se encontra amplamente difundido como estratégia de acasalamento em propriedades intensivas de coelhos, elevando a importância econômica da fertilidade. Com este sistema, é possível obter taxas de concepção equivalentes, ou mesmo superiores às obtidas com a cobertura natural. No entanto, a principal limitação ao emprego dessa biotecnologia na cunicultura se encontra na conservação do sêmen (6).

Nesse sentido, a técnica de criopreservação espermática, tem na sua aplicabilidade, a possibilidade de utilização por período relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelamento), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (7).

A membrana plasmática da célula espermática de mamíferos é formada por altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, os métodos de criopreservação a torna suscetível à reação de lipoperoxidação, levando-a a produção excessiva de radicais livres e consequentemente, a formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído, que altera a permeabilidade e seletividade da membrana das células (8) podendo resultar na incapacidade de fertilização do espermatozoide.

Ao contrário das células espermáticas de outras espécies domésticas, mas, semelhante ao ser humano, a membrana plasmática do espermatozoide de coelho apresenta uma alta taxa de colesterol/fosfolípido: 0,88-1,56 (9, 10) e, em relação aos fosfolípidios, observa-se baixa proporção de ácido graxo poli-insaturado/saturado (9).

Essas características produziram uma estrutura de membrana plasmática com fluidez intermediária, sendo capazes de suportar maior estresse ambiental (9), de maneira que os espermatozoides de coelho são caracterizados por sua resistência ao “choque térmico”, sendo uma característica positiva a implantação de técnicas de conservação a sub-temperaturas (11).

A utilização de diluentes podem não só expandir o volume seminal quanto também proteger de injúrias causadas nos espermatozoides devido a criopreservação. Nessas soluções, estão presentes crioprotetores que podem oferecer, temporariamente, energia ou proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura, além de atuarem na manutenção de um ambiente favorável à sobrevivência da célula espermática (12).

A eficiência das técnicas de criopreservação baseia-se em evitar a exposição dos espermatozoides aos efeitos do choque térmico. Para tanto, a solução conservadora deve possuir elementos crioprotetores e curvas de congelamento e descongelamento bem controlados (13).

Esses agentes crioprotetores ajudam a diminuir criolesões, mas quando utilizados em altas concentrações podem apresentar efeitos tóxicos aos espermatozoides (14). Portanto, a toxicidade é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de conservação (15).

Segundo Purdy (12), um diluente para ser usado na conservação do sêmen deve ter um sistema tampão, como o fosfato de sódio, citrato de sódio, TRIS (Tris-hidroximetilaminometano) e o TES (N-tris (hidroximetil) metil 2- aminoetanosulfônico); fontes

energéticas (ex: glicose e frutose), crioprotetores externos (ex: gema de ovo e leite) e crioprotetores internos (ex: glicerol - GLY e o etilenoglicol - EG).

Deve ainda apresentar em sua constituição antibióticos, sendo a Penicilina, a Estreptomicina e a Gentamicina os mais utilizados. Além de ser atóxico para os espermatozoides, ele deve ser de baixo custo e preparo fácil, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática (16).

O armazenamento de sêmen de coelho sob condições de refrigeração é possível, entretanto, uma avaliação mais aprofundada dos diluentes e das condições de armazenamento se faz necessária, antes que possa ser um complemento benéfico ao manejo de reprodutores, quanto a produção de doses seminais e aplicação futura a outras biotecnologias como a Fertilização in vitro (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Os diluentes e protocolos ainda não estão bem estabelecidos na cunicultura, como nas demais espécies domésticas, que por sua vez já possuem protocolos específicos, com produtos no mercado aprovados. Embora o uso desses diluentes não tenha sido comprovado em coelhos, os componentes presentes em suas composições são utilizados para preservar os mesmos tipos de células (espermatozoides), reagindo de forma análoga, contudo a eficácia poderá ficar diretamente afetada por particularidades da espécie cunícula.

Melhorias nos métodos de criopreservação e diluentes crioprotetores podem não apenas aperfeiçoar a preservação das células espermáticas e do material genético dos coelhos, mas também aumentar os índices reprodutivos dos plantéis nacionais, e conseqüentemente o número de descendentes, a produção e a margem da atividade gerada aos produtores rurais.

Os trabalhos nessas linhas de pesquisas também poderiam auxiliar na reprodução em cativeiro em programas de preservação de espécies de roedores e lagomorfos ameaçados de extinção como as espécies brasileiras pacarana ou paca-de-rabo (*Dinomys branickii*) e a lebre ou coelho-do-mato (*Sylvilagus brasiliensis*), bem como para a formação de biobancos, pensando na manutenção e preservação de germoplasma tanto de espécies nativas como silvestres.

O objetivo com este trabalho foi verificar se diluentes convencionais utilizados em outras espécies de monogástricos e disponíveis facilmente no mercado podem ser utilizados de forma satisfatória na refrigeração do sêmen de coelho à 5° C por até 48 horas, baseado nos parâmetros físicos e funcionais dos espermatozoides, no tempo, e quanto aos parâmetros estabelecidos para outras espécies de monogástricos (canina, equina e suína) segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (17), juntamente aos resultados levantados em outros trabalhos.

Ademais, que os resultados obtidos quanto a motilidade, vigor, e morfologia espermática neste trabalho, sirvam como parâmetros base para o semen de coelho fresco e refrigerado, visto a inexistência dessas recomendações, auxiliando assim no controle reprodutivo dos plantéis nacionais, bem como em futuras pesquisas nesse segmento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram alocados no Setor de Cunicultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais – *Campus* Salinas (Figura 1). Para este estudo foram selecionados, aleatoriamente, quatro machos reprodutores mestiços (fenotipicamente Nova Zelândia Branco), clinicamente sadios, de nove a quatorze meses de idade, e com fertilidade comprovada por monta natural. Antes do início do período experimental, os animais passaram por exame andrológico, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (17).

Os reprodutores permaneceram sob condições de iluminação natural, confinados em gaiolas individuais (Figura 2), recebendo durante todo o período experimental água e

alimentação volumosa, composta de rami (*Boehmeria nivea*) pré secado e ração para coelhos peletizada, de forma a atender às exigências nutricionais da categoria.

Foram realizadas dez colheitas de sêmen de cada animal com intervalo de dois dias, sempre pelo período da manhã, com vagina artificial, modelo descrito por Andrade e colaboradores (18), com o auxílio de um manequim vivo (Figura 3).



Figura 1. Setor de Cunicultura do IFNMG – Campus Salinas. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 2. Reprodutor em regime de gaiola individual. Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 3. Fêmea (manequim) imobilizada para coleta de sêmen com de vagina artificial.
Fonte: Arquivo Pessoal

Os ejaculados coletados de cada coelho eram misturados em tubo de coleta tipo Falcon de 15 mL obtendo um *pool* de sêmen que foi encaminhado imediatamente ao Laboratório de Reprodução do IFNMG - *Campus* Salinas para avaliação microscópica (motilidade, vigor, concentração e morfologia) do sêmen, com materiais previamente aquecidos (37 °C) em placa aquecedora (DIVITA[®]).

Em uma lâmina escavada, eram homogeneizados 10 µL do *pool* heterospérmico e 10 µL do diluente de avaliação à base de Ringer com Lactato de Sódio (LINHAMAX[®] - Eurofarma) e, em seguida, era retirada uma alíquota de 10 µL para realizar a avaliação da motilidade e do vigor espermático. A observação foi feita em microscópio óptico com contraste de fase (BM2000 SUPER LED[®] - Novel Óptics), no aumento de 200X, utilizando-se lâminas e lamínulas. Para o parâmetro motilidade, foram atribuídas notas percentuais de 0 a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais, enquanto para o vigor, os valores de 0 a 5 foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade de movimentação.

Para avaliação da concentração espermática, uma alíquota de 10 µL do *pool* heterospérmico era diluída em 1 mL de água (diluição 1:100). Posteriormente, uma alíquota de 10 µL da mistura sêmen:água era colocada em uma câmara de Neubauer (IMPROVED[®]) e o número de células espermáticas era quantificado em microscópio óptico com contraste de fase (BM2000 SUPER LED[®] - Novel Óptics), no aumento de 400X, conforme preconizado pelo CBRA (17).

Para a análise morfológica, uma alíquota de 50 µL do *pool* heterospérmico era colocada em microtubo tipo *ependorf* contendo 1 mL de formol-salino tamponado e pré-aquecido à 37°C para fixação da amostra, e reservada, para posterior análise em microscopia de contraste de fase (BM2000 SUPER LED[®] - Novel Óptics) em aumento de 1.000X. Foram contabilizadas 200 células por cada *pool* heterospérmico, verificando-se os percentuais de defeitos espermáticos segundo os critérios adotados por Blom (19).

Após as avaliações microscópicas, o *pool* heterospérmico foi diluído em uma concentração de 20 milhões de espermatozoides/mL em microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, contendo os diluidores comerciais utilizados em outros animais monogástricos:

- BotuDog[®] (refrigeração de cães);
- BotuSemen[®] (refrigeração de equinos);
- *Beltsville Thawing Solution* – BTS[®] (refrigeração de suínos).

As amostras seminais divididas nos tratamentos em microtubos tipo *Eppendorf* foram direcionadas ao interior de uma geladeira, permanecendo na posição vertical à temperatura de 5°C, por até 48 horas. Nos tempos de dezesseis, vinte e quatro, e quarenta e oito horas após o início da refrigeração, as amostras passaram por avaliação quanto a motilidade, vigor e morfologia espermática, conforme realizado no sêmen fresco.

Análises descritivas quanto às médias e desvios-padrões foram feitas para todas as características. Foi verificado a normalidade dos dados obtidos das variáveis e foram utilizados os testes de Tukey ou Dunn com nível de significância de 5%.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (protocolo CEUA/IFNMG nº 001/2021) e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média dos valores de motilidade, vigor e defeitos totais do sêmen fresco (*pool* heterospérmico) dos coelhos foi de 86,0%, 3,05 e 11,5%, respectivamente (Tabela 1). É

possível observar que as características seminais do sêmen fresco estão dentro do intervalo encontrado em outros trabalhos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios das características seminais do sêmen fresco (*pool* heterospérmico) de coelhos.

Características seminais do sêmen fresco	Valores médios encontrados	Valores médios encontrados em outros trabalhos
Motilidade (%)	86,00	80,00 (20)
		81,14 (21)
		58,00 (22)
		94,10 (23)
Vigor (0-5)	3,05	3,30 (22)
		2,30 (4)
Anormalidades espermáticas (%)		
defeitos maiores	9,90	11,67 (24)
defeitos totais	11,50	11,00 (25)
		14,40 (26)
		13,86 (21)
		15,00 (20)
		14,62 (23)
		22,56 (24)

Após o início do resfriamento, à 5°C, houve um comportamento linear decrescente para a motilidade e vigor espermático do sêmen refrigerado em função do tempo (Tabelas 2 e 3), diferindo ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2. Motilidade espermática (média \pm epm) dos coelhos após 16, 24 e 48 hs de resfriamento à 5 °C.

Tratamentos	16 hs de resfriamento	24 hs de resfriamento	48 hs de resfriamento
BotuDog [®]	80,0 \pm 1,97 ^{Aa}	72,5 \pm 2,01 ^{Ba}	71,0 \pm 2,08 ^{Ba}
BotuSemen [®]	67,5 \pm 1,86 ^{Aa}	64,0 \pm 3,64 ^{Aa}	55,5 \pm 4,25 ^{Bb}
BTS [®]	20,6 \pm 7,28 ^{Ab}	12,0 \pm 6,80 ^{Ab}	3,0 \pm 2,13 ^{Bc}

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Vigor espermático (mediana \pm primeiro e terceiro quartis) dos coelhos após 16, 24 e 48 hs de resfriamento à 5 °C.

Tratamentos	16 hs de resfriamento	24 hs de resfriamento	48 hs de resfriamento
BotuDog [®]	2,75 (2,5-3,0) ^{Aa}	2,75 (2,375-3,0) ^{Aa}	2,5 (2,0 - 3,0) ^{Aa}
BotuSemen [®]	2,5 (2,5-3,0) ^{Aa}	2,5 (2,375-3,0) ^{Aa}	2,5 (2,0 - 2,625) ^{Aa}
BTS [®]	0,75 (0,375 - 1,5) ^{Ab}	0 (0 - 1,0) ^{Ab}	0 (0 - 0,125) ^{Bb}

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn.

Destaca-se que o sêmen diluído em BTS[®] apresentou a redução na manutenção dos parâmetros avaliados de forma mais pronunciada ($P < 0,05$) ao longo do tempo. No manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (17) não são apresentados os valores ideais de motilidade para coelhos após o processo

de refrigeração. No entanto, se consideradas as espécies canina, equina e suína (animais monogástricos como os coelhos) o CBRA preconiza que a motilidade progressiva e vigor espermáticos do sêmen refrigerado, nessas espécies, sejam $\geq 50\%$ e ≥ 3 , respectivamente. Se comparado, os diluentes BotuDog[®] e BotuSemen[®] chegaram às 48 horas pós-resfriamento (5 °C) com motilidade progressiva acima do esperado para estas espécies (Tabela 2). Em relação ao vigor espermático, após os períodos de resfriamento, esses diluentes apresentaram resultados muito próximo dos desejados (Tabela 3).

Dentro de cada tempo específico, às 16 hs, 24 hs e 48 hs de resfriamento, o sêmen diluído com BTS foi o que apresentou menores valores para motilidade e vigor espermático (Tabelas 2 e 3). Após as 48 h de resfriamento, o diluente BotuDog[®] foi o que apresentou maior valor para motilidade espermática e, juntamente, com o diluente BotuSemen[®] apresentaram maior valor para vigor espermático. Vários fatores podem interferir na qualidade seminal pós-diluição, um deles é que o sêmen de coelho, diferente da maioria das espécies, apresenta baixo coeficiente de permeabilidade à água (27), o que dificulta a eficiência do uso de diluentes para esta espécie (28).

Domingo et al. (29) ao resfriar o sêmen de coelho à 16 °C, utilizando o meio comercial INRA[®] suplementado com glicerol (álcool), N-N-dimetilformamida ou N-metil-2-pirrolidona (solventes orgânico que apresenta grande miscibilidade com a água) encontraram valores médios menores de motilidade 58,4% e 44,0%, às 24 hs e 48 hs, respectivamente. Romero et al. (24) também observaram valores inferiores àqueles encontrados para motilidade e vigor espermáticos neste trabalho, ao utilizarem o diluente Tris-ácido cítrico-frutose-gema de ovo e resfriarem (5 °C) o sêmen de coelhos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de linhaça (*Linum usitatissimum*). A semente de linhaça apresenta altos teores de ácido linolênico e linoléico, e ácidos fenólicos (antioxidantes) que podem proporcionar melhora nos índices de fertilidade. Os autores encontraram valores de motilidade espermática de 17,60% (24 hs) e 11,60% (48 hs), e de vigor espermático de 0,55 (24 hs) e 0,22 (48 hs).

Johinke et al. (30, 31) utilizaram um diluente à base de Tris-ácido cítrico-glicose e encontraram valores de motilidade espermática próximos ao descrito neste trabalho. No primeiro eles resfriaram o sêmen de coelhos à 5 °C e encontraram motilidade espermática de $\pm 74\%$ às 24 hs e $\pm 68\%$ às 48 hs. No segundo trabalho, foi acrescentado quercetina no diluente, um flavonoide natural que possui ação antioxidante, e encontraram às 48 hs motilidade média de 70,3% após resfriamento à 15 °C.

El-Seadawy et al. (32) também utilizaram o diluente Tris-ácido cítrico-glicose na refrigeração de sêmen de coelho, à 4°C, acrescentado de 3% gema de ovo com e sem própolis, que é uma substância resinosa com diversas funções, sendo uma delas antioxidante. Os autores encontraram motilidade de 76,7% e 61,7% sem própolis e 86,7 e 73,7% com própolis, às 24 hs e 48 hs, respectivamente.

Suárez et al. (33) utilizaram diversos diluentes na refrigeração do sêmen de coelho, à 16 °C, e encontraram às 24 hs e 48 hs, respectivamente, os valores de motilidade de 83% e 68% (diluente composto por leite desnatado e açúcares), 52% e 32% (diluente composto por dextrose, ácido cítrico e acetato de potássio), 80% e 66% (diluente composto por caseinato de sódio, fosfato e açúcares) e 65% e 58% (diluente composto por Tris-ácido cítrico-gema de ovo). El-Nour et al. (34) também avaliaram diversos diluentes na refrigeração do sêmen de coelho, porém à 5 °C, encontrando às 24 hs e 48 hs, respectivamente, os valores de motilidade de 66,7% e 52,5% (diluente Tris-ácido cítrico-glicose-gema de ovo), 58,3% e 43,3% (Lactose citrato de sódio-gema de ovo) e 52,5% e 40,5% (Leite de coco).

Em relação as anormalidades espermáticas, após o início do resfriamento, à 5°C, pode-se observar aumento nos defeitos maiores e totais do sêmen em função do tempo (Tabela 4), diferindo ($P < 0,05$).

Tabela 4. Anormalidades espermáticas (média \pm epm) dos coelhos após 16, 24 e 48 hs de resfriamento à 5 °C.

Tratamentos	16 hs de resfriamento	24 hs de resfriamento	48 hs de resfriamento
BotuDog[®]			
Defeitos maiores (%)	2,00 \pm 0,38 ^A	2,25 \pm 0,40 ^A	3,00 \pm 0,49 ^B
Defeitos totais (%)	10,00 \pm 1,07 ^A	13,50 \pm 1,29 ^A	15,50 \pm 1,46 ^B
BotuSemen[®]			
Defeitos maiores (%)	2,25 \pm 0,59 ^A	3,00 \pm 0,37 ^A	3,50 \pm 0,40 ^A
Defeitos totais (%)	11,75 \pm 2,82 ^A	13,00 \pm 1,09 ^A	15,75 \pm 1,23 ^B
BTS[®]			
Defeitos maiores (%)	2,00 \pm 0,27 ^A	2,25 \pm 0,26 ^A	2,75 \pm 0,86 ^A
Defeitos totais (%)	13,75 \pm 0,97 ^A	14,25 \pm 1,41 ^A	14,75 \pm 1,63 ^A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Dunn.

No manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (17), também não está descrito qual percentagem máxima é indicada para anormalidades do sêmen refrigerado de coelho. No entanto, o desejado em outras espécies de monogástricos é de $\geq 60\%$ (equina), $\geq 70\%$ (canina) e $\geq 80\%$ (suína) de espermatozoides normais após o período de refrigeração. No presente trabalho, todos os tratamentos nos três períodos analisados apresentaram percentagem de espermatozoides normais $\geq 84,25\%$ (Tabela 4).

El-Seadawy et al. (32) também encontraram valores parecidos de espermatozoides normais (83% após 24 hs e 85% após 48 hs) ao trabalharem com sêmen de coelho refrigerado com diluente Tris-ácido cítrico-glicose-gema de ovo, à 4°C. Por outro lado, Suárez et al. (33) e El-Nour et al. (34) refrigerando o sêmen de coelho à 16 °C e 5 °C, respectivamente, e utilizando diversos diluentes na refrigeração do sêmen de coelho como descrito acima, encontraram valores de espermatozoides normais menores aos encontrados neste trabalho às 24 hs (56,0% à 61,5%; e 78,3% à 82,5%, respectivamente) e 48 hs (56% à 59,5%; e 70,8% à 76,8%, respectivamente).

O mecanismo de fertilização no trato reprodutivo da fêmea, demanda a manutenção do aparato cinético do espermatozóide, no exame andrológico esse fator está contido nas avaliações de motilidade e vigor espermático, se correlacionando com o potencial fertilizante desses espermatozóides *in vivo*, ademais, o percentual de células morfológicamente normais detem também a mesma importância.

O percurso que o gameta masculino trilha dentro do trato reprodutivo da fêmea apresenta uma série de barreiras, que funcionam como mecanismos de seleção, exigindo assim, a presença de grande volume de espermatozóides nesse ejaculado morfológicamente normais, uma vez que as diversas alterações observadas interferem na sua capacidade de romper essas barreiras e alcançar a região de fecundação, bem como o seu potencial em realizar a reação acrossômica, indispensável para a formação do zigoto por mecanismos naturais.

Além do BTS, não se tem a constituição exata da composição dos diluentes utilizados neste trabalho, contudo teorizamos que os melhores resultados obtidos quanto a motilidade e vigor espermático pelos diluentes BotuDog e BotuSemen, são graças ao seu perfil e concentração de crioprotetores. Uma das poucas informações que são relatadas quanto ao BotuSemen, é que este possui leite em pó desnatado em sua constituição, que oferece por meio das micelas de caseína, uma maior proteção ao sêmen criopreservado.

Quanto aos melhores resultados, obtidos pelo BTS quanto ao percentual de defeitos totais e maiores, acreditamos que seja graças a presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

na sua constituição e possivelmente a maior toxicidade e percentual dos crioprotetores presentes nos outros dois diluentes.

O EDTA, é um quelante de cálcio, sendo assim, a concentração do cálcio em presença desta substância no meio é diminuída (35). A entrada de cálcio no espermatozóide leva-os à capacitação, por conseguinte, induz movimentos oscilatórios, assim como desencadeia uma série de alterações que culminarão na reação do acrossomo (36), muitas vezes prematura.

Assim, é possível observar que existem diferenças na habilidade dos meios diluentes para manter a qualidade (motilidade, vigor e morfologia) do sêmen resfriado de coelho por períodos prolongados de tempo. Apesar de não serem específicos para espécie cunícula, os diluentes de cão e equinos utilizados neste estudo permitiram o resfriamento do sêmen de coelho, à 5°C, apresentando, posteriormente, resultados de motilidade, vigor e morfologia espermática próximos àqueles desejáveis para estas espécies de acordo com Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (17), e também, ao encontrado em trabalhos da área. Além disso, destaca-se que não foi necessário o preparo em laboratório dos diluentes e nem o acréscimo de substâncias nos mesmos e, ou, na alimentação animal, ressaltando a facilidade e agilidade da sua manipulação e utilização.

CONCLUSÃO

Os diluentes BotuDog® e BotuSemen® mostraram-se eficientes em manter parâmetros espermáticos adequados, apresentando boa viabilidade espermática em até 48h pós refrigeração a 5°C. Por sua vez, apesar do BTS ter apresentado resultados positivos quanto a morfologia espermática, em uma análise completa seu uso não é indicado na refrigeração do sêmen de coelhos segundo a metodologia apresentada. Obteve-se com este trabalho, resultados inéditos quanto a parâmetros espermáticos do sêmen de coelho refrigerado que podem ser utilizados como valores de referência para o manejo reprodutivo e processamento do semen desses animais, visto a inexistência dessas recomendações técnicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khalil MH, Al-Sobayil KA, Al-Saef AM, García ML, Baselga M. Genetic evaluation for semen characteristics in a crossbreeding project involving Saudi and Spanish V-line rabbits. *Animal* [Internet]. 2007 [citado 20 Dez 2022];1(7):923-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731107000341?via%3Dihub>
2. Lavara R, García ML, Torres C, Vicente JS, Baselga M. Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility [Internet]. In: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress; 2008; Verona (IT). Verona: WRSA; 2008* [citado 20 Dez 2022]. p. 159-62. Disponível em: <http://cuniculture.info/Docs/Magazine/Magazine2008/FiguresMag2008/Congres-2008-Verone/Papers/G-Lavara2.pdf>
3. Lavara R, Vicente JS, Baselga M. Genetic parameter estimates for semen production traits and growth rate of a paternal rabbit line. *J Anim Breed Genet* [Internet]. 2011 [citado 20 Dez 2022];128(1):44-51. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0388.2010.00889.x>
4. Alvariño JMR. Reproductive performance of male rabbits. *World Rabbit Sci* [Internet]. 2000 [citado 20 Dez 2022];8 Suppl 1:13-35. Disponível em: <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2000-Valencia/Papers/Reproduction/R00a-Alvarino.pdf>

5. IMV Technologies. Artificial insemination, a technique for rabbit meat production. France: L'Aigle; 2008.
6. Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 degrees C. Anim Reprod Sci [Internet]. 2000 [citado 20 Dez 2022];64(1-2):103-12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11078971/>
7. Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. Acta Vet Brasilica [Internet]. 2008 [citado 20 Dez 2022];2(3):67-75. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/acta/article/view/885/0>
8. Luz HKM, Wanderley LS, Faustino LR, Silva CMG, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. Acta Sci Vet [Internet]. 2011 [citado 20 Dez 2022];39(2):956. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/actavet/39-2/PUB%20956.pdf>
9. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology [Internet]. 1977 [citado 20 Dez 2022];14(4):466-70. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6)
10. Castellini C, Cardinali R, Dal Bosco A, Minelli A, Camici O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. Theriogenology [Internet]. 2006 [citado 20 Dez 2022];65(4):703-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.053>
11. Moce E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: a review. Anim Reprod Sci [Internet]. 2009 [citado 20 Dez 2022];110(1-2):1-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.015>
12. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rumin Res [Internet]. 2006 [citado 20 Dez 2022];63(3):215-25. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805000763?casa_token=SpL5QLG2lcAAAAA:hWiS8ZTD2eZEwmvMBwviwTIF5SYVvNC3QVR-voSrZ96VWyrG1IosRrJKzsdjuTY4PYVRMsGJ3jg
13. Uberti MF, Vieira FN, Salência HR, Vieira GS, Vinatea LA. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. Braz Arch Biol Technol [Internet]. 2004 [citado 20 Dez 2022];57(3):374-80. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000013>
14. Maria AN. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) [dissertação] [Internet]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2005 [citado 20 Dez 2022]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-7760>
15. Mazzobre MF, Longinotti MP, Corti HR, Buera MP. Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behavior and ice crystallization/melting. Cryobiology [Internet]. 2001 [citado 20 Dez 2022];43(3):199-210. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2345>

16. Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci [Internet]. 1987 [citado 20 Dez 2022];7(3):145-73. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
17. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
18. Andrade AFC, Yonezawa LA, Celeghini ECC, Spers A, Arruda RP. Um novo modelo de vagina artificial para coelhos. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2002 [citado 20 Dez 2022];26(3):201-4. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Andre-De-Andrade/publication/342703097_UM_NOVO_MODELO_DE_VAGINA_ARTIFICIAL_PARA_COELHOS_A_NEW_MODEL_OF_ARTIFICIAL_VAGINA_FOR_RABBITS/links/5f023ed2299bf1881603918c/UM-NOVO-MODELO-DE-VAGINA-ARTIFICIAL-PARA-COELHOS-A-NEW-MODEL-OF-ARTIFICIAL-VAGINA-FOR-RABBITS.pdf
19. Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord Vet Med. 1973;25(7):383-91.
20. Foote RH, Carney EW. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. Reprod Toxicol [Internet]. 2000 [citado 20 Dez 2022];14(6):477-93. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890623800001015?casa_token=93iwIpiVkPwAAAAA:uSaxH3Tahtm75xpIfE534SrSmt7piqr6Q3I2TdMCTQ127UCFoGF7Z38t2NnN30b2-7dTG3PgAJg
21. García-Tomás M, Sánchez J, Rafel O, Ramon J, Piles M. Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. Anim Reprod Sci [Internet]. 2006 [citado 20 Dez 2022];93(1-2):88-100. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037843200500179X?via%3Dihub>
22. Holtz W, Foote RH. Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. Biol Reprod [Internet]. 1978 [citado 20 Dez 2022];18(2):286-92. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/18/2/286/2767506>
23. El-Tarabany MS, El-Bayomi K, Abdelhamid T. Semen characteristics of purebred and crossbred male rabbits. PloS One [Internet]. 2015 [citado 20 Dez 2022];10(5):1-9. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0128435&type=printable>
24. Romero DCM, Barbosa LP, Machado WM, França CS, Vieira RLA, Mendes CS, et al. Evaluation of the seminal quality of rabbits fed diets containing different inclusion levels of flaxseed (*Linum usitatissimum*). Cienc Tecnol Agropecuaria [Internet]. 2020 [citado 20 Dez 2022];21(3):1-12. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062020000300024
25. Dubiel A, Króliński J, Kąpiak C. Właściwości nasienia królików różnych ras w poszczególnych porach roku. Med Weter [Internet]. 1985 [citado 20 Dez

- 2022];41(11):680-4. Disponível em:
<http://www.medycynawet.edu.pl/images/stories/pdf/digital/1985/198511680685.pdf>
26. García-Tomás M, Sanchez, Rafel O, Ramon J, Piles M. Reproductive performance of crossbred and purebred male rabbits. *Livest Sci* [Internet]. 2006 [citado 20 Dez 2022];104(3):233-43. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141306001351?casa_token=yXCkFdD2qEoAAAAA:JDTW5hN5UV-12stTZutVj4z8G7yIdJVMcGPyEb7733YAelbkcnh5Ve6ba021RwOIlXMt5XzjxG0
27. Curry M, Redding BJ, Watson PF. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology* [Internet]. 1995 [citado 20 Dez 2022];32(2):175-81. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224085710164>
28. Mocé E, Lavara R, Vicente JS. Effect of cooling rate to 5°C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2010 [citado 20 Dez 2022];45(5):1-7. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2009.01507.x>
29. Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. Effects of seminal plasma and diferente cryoprotectants on rabbit sperm preservation at 16°C. *Exp Anim* [Internet]. 2018 [citado 20 Dez 2022];67(4):413-20. Disponível em:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/advpub/0/advpub_17-0152/article/-char/ja/
30. Johinke D, De Graaf SP, Bathgate R. Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2014 [citado 20 Dez 2022];147(3-4):135-43. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201400133X?casa_token=omb13Pw9kikAAAAA:DtiLKnANLqInNFWyZZTeKzEbc2B-3m6VZfc394nNti0FlgeB1y2Zej650MPkSkIUYPTkfw_O4
31. Johinke D, De Graaf SP, Bathgate R. The effect of sperm concentration and storage vessel on quercetin-supplemented. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2015 [citado 20 Dez 2022];50(4):567-73. Disponível em:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12525?casa_token=kLgbwck-jk8AAAAA%3APk0sl8RQnismndoQFZYtBH5jOOKTyx4UB5SqaZ0AMU7ydLBj5AmqVowMUMdiLA_0XtbyRg7Zb_q2RgY
32. El-Seadawy IE, El-Nattat WS, El-Tohamy MM, Aziza SA, El-Senosal YA, Hussein AS. Preservability of rabbit semen after chilled storage in tris based extender enriched with different concentrations of propolis ethanolic extract (PEE). *Asian Pac J Reprod* [Internet]. 2017 [citado 20 Dez 2022];6(2):68-76. Disponível em:
<https://www.apjr.net/article.asp?issn=2305-0500;year=2017;volume=6;issue=2;spage=68;epage=76;aulast=El-Seadawy>
33. Suárez AC, Sierra PA, Restrepo MD, Duque CJE, Restrepo BG. Evaluación de diluyentes para la refrigeración de sêmen de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Rev Investig Vet Peru* [Internet]. 2020 [citado 20 Dez 2022];31(2):1-10. Disponível em:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172020000200028&script=sci_arttext

34. El-Nour SAA, Daader AH, Abdine AM, Bahgat LB. Effect of some extenders on chilled rabbit semen stored at 5°C for 48 hours. Zagazig J Agric Res [Internet]. 2017 [citado 20 Dez 20];44(1):205-14. Disponível em: https://zjar.journals.ekb.eg/article_53946.html
35. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology [Internet]. 2005 [citado 20 Dez 2022];64(3):492-504. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05001652?casa_token=I4ZJ5OAAHcwAAAAA:1lcM-TV_izgI050BEvMDI4-N5REKxpPwJ6PxR0G1uU2bnOHpG-T1SPgNR12a6RSfz80P4sb13DA
36. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol Reprod [Internet]. 1988 [citado 20 Dez 2022];59(1):7-11. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.7>

Recebido em: 29/03/2023

Aceito em: 25/07/2023