

Evaluación de dos diluyentes en la congelación de espermatozoides epididimarios de perros (Alcohol poli vinílico y Yema de huevo)

Evaluation of two extenders in Canine epididymal spermatozoa freezing (Polyvinyl alcohol and egg yolk)

Noelia López-Zhindón^{1*}, Mauricio Dumas², Xavier Samaniego², Diego Galarza³ y Daniel Argudo-Garzón²

¹Universidad Católica de Cuenca, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Posgrado. Cuenca, Ecuador.

²Universidad Católica de Cuenca, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria. Cuenca, Ecuador.

³Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Cuenca, Ecuador.

Correo electrónico: noelia.lopez.23@est.ucacue.edu.ec

RESUMEN

La yema de huevo (YH) es un componente común de los diluyentes de semen por su eficacia para proteger la membrana de los espermatozoides del choque de frío durante la criopreservación y además de ser rica en proteínas, vitaminas, antioxidantes y fosfolípidos. No obstante, la YH es un componente no definido y al mismo tiempo peligroso por el riesgo de transmisión de agentes patógenos, por esta razón, es necesario evaluar el uso de otros componentes que disminuyan este problema; una alternativa poco estudiada es alcohol poli vinílico (APV). Por lo que en esta investigación se evaluó el efecto del APV y la YH suplementados al diluyente TCG (tris, ácido cítrico, glucosa) sobre la criosupervivencia de espermatozoides epididimarios (EE) de perro. Para ello, se recuperaron EE mediante la técnica de flujo retrógrado en 15 perros adultos orquiectomizados para conformar cinco agrupaciones (4-6 muestras epididimarias / agrupación). Cada muestra agrupada se dividió en dos alícuotas, que posteriormente fueron diluidas y congeladas usando dos aditivos suplementados al diluyente TCG: APV al 1 % (peso/volumen -p/v- [TCG-APV] y yema de huevo al 20 % (volumen/volumen -v/v- [TCG-YH]). Posterior a la descongelación, se analizaron las anomalías morfológicas, la vitalidad (eosina / nigrosina), la integridad de membrana plasmática (ioduro de propido), y las variables cinemáticas (sistema CASA, SCA-2018®). Los resultados demostraron que la vitalidad e integridad de la membrana plasmática fueron superiores ($P < 0,05$) en muestras congeladas con TCG-YH, en comparación con aquellas muestras congeladas con TCG-APV. Asimismo, las muestras congeladas con TCG-YH obtuvieron valores post-descongelación más altos ($P < 0,05$) de variable cinemáticas como la motilidad total y progresiva, velocidades promedio y rectilínea, índice de rectitud y frecuencia de batida de flagelo, en comparación con las muestras congeladas con TCG-APV. En conclusión, la adición YH al medio TCG fue efectiva en la congelación de EE de perro, ya que mejoró la vitalidad, integridad de membrana plasmática y la cinética espermática; sin embargo, la adición de 1 % de APV no mejoró la respuesta a la criopreservación.

Palabras clave: Perro; semen epididimario; crioprotectores; motilidad; CASA

ABSTRACT

Egg yolk (EY) is a common component of semen extenders due to its effectiveness in protecting the sperm membrane from cold shock during cryopreservation and it is also rich in proteins, vitamins, antioxidants, and phospholipids. However, the EY is an undefined component and at the same time dangerous due to the risk of transmission of pathogenic agents. For this reason, it is necessary to evaluate the use of other components that reduce this problem. An understudied alternative is polyvinyl alcohol (PVA). For this reason, this investigation evaluated the effect of PVA and EY supplemented with TCG diluent (tris, citric acid, glucose) on the cryosurvival of dog epididymal spermatozoa (ES). For this, ES were recovered using the retrograde flow technique in 15 orchietomized adult dogs to form five pools (4-6 epididymal samples/pool). Each pooled sample was divided into two aliquots, which were subsequently diluted and frozen using two additives supplemented to the TCG diluent: 1% (w/v) PVA [TCG-PVA] and 20% (v/v) egg yolk [TCG-EY]. After thawing, morphological abnormalities, vitality (eosin/nigrosin), plasma membrane integrity (propion iodide), and kinematic variables (CASA system, SCA-2018®) were analyzed. The results demonstrated that the vitality and integrity of the plasma membrane were superior ($P < 0.05$) in samples frozen with TCG-EY, compared to those samples frozen with TCG-PVA. Likewise, the samples frozen with TCG-EY obtained higher post-thaw values ($P < 0.05$) of kinematic variables such as total and progressive motility, average and rectilinear velocities, straightness index and flagellum beat frequency, compared to with frozen samples with TCG-PVA. In conclusion, enhancement of EY to TCG medium was effective in freezing dog ES, as it improved vitality, plasma membrane body, and sperm kinetics; however, the addition of 1% PVA did not improve the response to cryopreservation.

Key words: Dog; epididymal semen; cryoprotectants; motility; CASA

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides permite conservar características fenotípicas y genotípicas de animales con un valor genético superior y administrar estos recursos en diferentes partes del mundo. De hecho, la congelación de espermatozoides se ha convertido en una herramienta clave para el desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) en animales domésticos y silvestres (ejemplo: peligro de extinción) debido al aumento de la posibilidad de reproducción y preservación [1, 2].

Durante la congelación, los espermatozoides son susceptibles a diversas tensiones y estrés osmótico debido a la exposición de soluciones hipertónicas provenientes de los diluyentes y agentes crioprotectores. El estrés osmótico está condicionado por el crioprotector que provoca que los espermatozoides se contraigan debido al flujo y eflujo de agua a través de la membrana plasmática [12]. Otros autores han propuesto que el daño criogénico que sufren los espermatozoides durante la congelación y descongelación puede deberse a factores como el choque térmico, la formación de hielo (intra y extracelular), la deshidratación, el aumento de la concentración de sal y el choque osmótico [19, 28].

Los estudios sobre métodos de congelación de espermatozoides de perros (*Canis lupus familiaris*) han considerado factores como los diluyentes básicos (ejemplo: TCG o Tris, ácido cítrico y fructuosa [TCF]) [6, 17], aditivos (ejemplo: YH), y glicerol para lograr altas tasas de criosupervivencia espermática después de la descongelación.

La YH representa uno de los aditivos que aporta mayores beneficios para la congelación espermática, ya que protege a la célula del choque de frío y confiere una cierta protección durante el proceso de congelación-descongelación [1]. Entre otras acciones, la YH previene la pérdida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática [13]. En distintos protocolos de congelación de esperma de perro, la YH ha sido adicionada al diluyente TCG al 15–20 % (v/v) para congelar espermatozoides provenientes de eyaculado [7] o del epidídimo [15]. Sin embargo, su desventaja radica en la posibilidad de transmisión de enfermedades y el riesgo de contaminación bacteriana [5]. Además, se ha informado que al usar la YH se encontraron vacuolas lipídicas y otras partículas que interfieren en la evaluación microscópica (grumos) así como en los ensayos bioquímicos y metabólicos del semen [12, 14]. Por esta razón, se han considerado alternativas que permitan mantener la criosupervivencia y fertilidad de los espermatozoides de perros.

El APV es un polímero sintético que tiene la capacidad de inhibir la recristalización del hielo en agua pura a una concentración inferior a 1 miligramo-mililitro⁻¹ (mg·mL⁻¹) [10]. Este hecho lleva a considerarlo como un potencial crioprotector para los espermatozoides. La adición de APV a diluyentes de congelación de espermatozoides de perros es útil para disminuir la concentración de glicerol y para evitar la formación de cristales de hielo extra e intracelular [27]. Recientes reportes demostraron que la adición de 0,5 a 3 % de APV a un diluyente a base de Tris se puede utilizar como alternativa a la YH para la crioconservación de espermatozoides de perros [20, 21]. Sin embargo, estos trabajos fueron realizados en espermatozoides provenientes de semen eyaculado. Hasta donde se sabe, no existe información con respecto al uso de APV en la criopreservación de EE de perro.

Esta investigación planteó la hipótesis de que al adicionar el 1 % (10 mg·mL⁻¹) de APV al diluyente TCG y al usar 5 % de glicerol como crioprotector [27], podría mejorar la criosupervivencia espermática debido al mejoramiento en la distribución eficiente

de los cristales de hielo extracelular producido durante el descenso de temperatura. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de la suplementación de APV al diluyente TCG en comparación a la YH sobre la criosupervivencia de EE de perro, basados en la cinemática, integridad y funcionalidad de membrana plasmática y anomalías morfológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los medios fueron preparados en el laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Católica de Cuenca, Ecuador y se utilizó reactivos de Sigma® Aldrich Co.

Diluyentes

El diluyente base usado para esta investigación fue el TCG-YH (Tris 313,7 milimolar –mM–), Ácido cítrico 104,7 mM, Glucosa 30,3 mM y 50 microgramos-mililitro⁻¹ (µg·mL⁻¹). A este diluyente base, se adicionaron dos aditivos en estudio, la YH y el APV, y glicerol (5 %, v/v) como agente crioprotector.

Recuperación espermática y evaluación inicial

Un total de treinta epidídimos fueron recuperados mediante flujo retrogrado, provenientes de quince perros adultos (2–8 años), sexualmente maduros y sanos, que fueron sometidos a orquiectomía bilateral. Previo a la castración, todos los perros fueron evaluados en su condición general y su aparato reproductivo, y entonces su aptitud para este estudio fue determinada.

La recuperación de EE se realizó mediante flujo retrógrado; para esto, una aguja metálica N° 22 G×1½, cortada en su extremo punzante fue introducida en el conducto deferente proximal y entonces 1 mL del diluyente TCG previamente atemperado a 18°C en un refrigerador (Indurama, RI-485, Ecuador), fue administrado. Para la evacuación del contenido retrógrado, se hicieron unos cortes longitudinales en la cola del epidídimo y el contenido espermático fue recogido en un vaso de precipitación estéril. Inmediatamente, el contenido espermático fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se mantuvo a 36°C en una platina térmica (Cryologic, BioTherm SmartPlate SPA5, Australia) durante su análisis hasta su procesamiento.

Un total de 30 muestras de EE fueron recuperadas y entonces cinco agrupaciones de semen (pools) fueron conformados (4–6 muestras epididimarias recolectadas / pool seleccionados de forma aleatoria). A cada pool se le evaluó la motilidad individual progresiva por un operador y la concentración espermática mediante una cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases (OLYMPUS® BX-51, Japón), respectivamente. Aquellas muestras agrupadas con una concentración mayor a 100×10⁶ espermatozoides·mL⁻¹ y una Motilidad Individual Progresiva mayor a 70 % fueron usadas para el subsiguiente trabajo experimental.

Dilución, tratamientos y congelación

Cada muestra agrupada fue dividida en dos alícuotas y diluidas con dos diluyentes base a una concentración inicial de 100×10⁶ espermatozoides·mL⁻¹ para conformar dos tratamientos:

1. TCG + 20 % YH (TCG-YH)
2. TCG + 1 % (p/v) APV (TCG-APV)

Las muestras de ambos tratamientos se mantuvieron en refrigeración (Indurama, RI-485, Ecuador), a 5°C durante 2 horas (h) para su equilibramiento. Posteriormente, a cada muestra se adicionó el mismo volumen (1:1) de los diluyentes base de cada tratamiento (TCG-TY y TCG-APV) más 10 % de glicerol. De esta manera, las muestras alcanzaron una concentración final de 50×10⁶ espermatozoides·mL⁻¹ y 5 % de glicerol. Inmediatamente, las muestras espermáticas se cargaron en las pajuelas de 0,25 mL y se mantuvieron en refrigeración a 5°C (Indurama, RI-485, Ecuador) durante 10 minutos (min) adicionales. Luego las pajuelas se colocaron sobre una rampa de flotación (Minitube, Alemania) y se expusieron durante 15 min en vapores de nitrógeno líquido (NL2) estático a una distancia de 5 centímetros sobre el mismo. Finalmente, las pajuelas se sumergieron directamente en NL2 y fueron almacenadas en un termo (MVE, ET-20, China) a -196°C hasta su evaluación.

Descongelación y análisis post congelación

La descongelación de las pajuelas de ambos tratamientos se realizó en un baño María (Fanem, 1100, Brasil) con agua a 37°C durante 45 segundos. La vitalidad espermática y anomalías morfológicas fueron evaluadas mediante la tinción supravital de eosina (2 %) y nigrosina (10 %). La integridad de la membrana plasmática (IMP) fue evaluada mediante la tinción fluorescente con yoduro de propidio bajo microscopía de epifluorescencia (OLYMPUS® BX-51, Japón). Las variables cinemáticas de los espermatozoides de perros congelados y descongelados con ambos tratamientos fueron analizadas usando un sistema CASA (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, versión 6.0.4 software, Microptic S.I., Barcelona, España). El sistema CASA registró la motilidad espermática (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, μm·s⁻¹), velocidad rectilínea (VSL, μm·s⁻¹), velocidad promedio (VAP, μm·s⁻¹), rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %), oscilación (WOB, %), Frecuencia de batida de flagelo (BCF, HZ), y la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

Análisis estadístico

El valor de cada variable fue calculada y presentada como promedio ± error estándar de la media. Un GLM fue usado para comparar los dos tratamientos en estudio (TCG-YH y TCG-APV). Además, en el modelo se incluyó la "repetición" como variable de ajuste. La significación se fijó en P<0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS® (versión 23.0 para Windows, Chicago, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se muestran los resultados obtenidos posterior a la descongelación de las variables analizadas en los dos tratamientos. En

la TABLA II se detallan las variables cinemáticas de los espermatozoides congelados y descongelados con ambos tratamientos. La vitalidad e Integridad de la Membrana Plasmática fueron superiores (P<0,05) en aquellas muestras congeladas con TCG-YH en comparación con las muestras congeladas con TCG-APV. No se evidenció diferencias significativas (P>0,05) en las anomalías morfológicas de los espermatozoides congelados con APV o YH.

En el análisis de las variables cinemáticas, las muestras congeladas con TCG-YH obtuvieron valores post-descongelación más altos (P<0,05) de MT, MP, VAP, VSL, STR y BCF en comparación con aquellas muestras congeladas con TCG-APV.

Los resultados de la presente investigación demuestran que la YH protegió mejor a los EE de perro durante la congelación que el APV. Por otro lado, la adición del 1 % (10 mg·mL⁻¹) de APV al diluyente TCG produjo un efecto indeseable en criosupervivencia de espermatozoides de perros basado en una baja tasa de vitalidad y cinética.

El proceso de congelación de semen causa efectos nocivos sobre a motilidad total y progresiva, la integridad de la membrana plasmática y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides [26]; es por ello que la YH se ha usado con éxito como crioprotector natural en la congelación de semen de perro, es así que se comparó la YH con el plasma de YH en un extensor a base de Tris, y se demostró que el semen congelado con TRIS-YH mostró mejor motilidad progresiva, la mayoría de células intactas, porcentaje más bajo de: ROS, daños en el acrosoma, células muertas y apoptóticas [24]. En otro estudio se probaron distintas combinaciones de crioprotectores extracelulares e intracelulares y los resultados mostraron que el uso de YH en combinación con glicerol eran óptimos para una criopreservación exitosa [9]. Se estudió la criopreservación de semen de perro en un diluyente Tris con dos preparaciones diferentes de soja al 1 % en comparación con un diluyente de YH, y se concluyó que la YH fue superior a cualquiera de los dos diluyentes a base de lecitina de soja utilizados en dicho estudio [16].

TABLA I
Características del semen de perro post descongelación

Tratamiento	Vitalidad (%) ($\bar{X} \pm EE$)	IMP (%) ($\bar{X} \pm EE$)	Anormalidades Morfológicas ($\bar{X} \pm EE$)
TCG-YH	44,5 ± 8,21 ^a	60,3 ± 1,07 ^a	47,4 ± 3,71
TCG-APV	15,5 ± 1,74 ^b	52,5 ± 1,46 ^b	48,8 ± 4,02

($\bar{X} \pm EE$): media + error estándar, YH: Yema de huevo, APV: Alcohol polivinílico, IMP: Integridad de la Membrana Plasmática. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos (^{a-b} P<0,05)

TABLA II
Características del semen de perro post descongelación, sistema CASA

Tratamiento	MT (%) ($\bar{X} \pm EE$)	MP (%) ($\bar{X} \pm EE$)	VCL (μm·s ⁻¹) ($\bar{X} \pm EE$)	VAP (μm·s ⁻¹) ($\bar{X} \pm EE$)	VSL (μm·s ⁻¹) ($\bar{X} \pm EE$)	STR (%) ($\bar{X} \pm EE$)	LIN (%) ($\bar{X} \pm EE$)	WOB (%) ($\bar{X} \pm EE$)	ALH (μm) ($\bar{X} \pm EE$)	BCF (Hz) ($\bar{X} \pm EE$)
TCG-YH	56,9 ± 16,2 ^a	10,5 ± 8,63 ^a	46,1 ± 10,98	25,0 ± 10,99 ^a	17,6 ± 7,45 ^a	63,2 ± 4,74 ^a	34,7 ± 7,15	52,6 ± 7,90	2,9 ± 2,22	4,5 ± 1,06 ^a
TCG-APV	24,9 ± 11,26 ^b	1,6 ± 1,98 ^b	37,3 ± 11,43	18,0 ± 6,55 ^b	10,6 ± 4,27 ^b	57,5 ± 5,63 ^b	32,1 ± 7,74	50,9 ± 6,72	2,1 ± 0,48	3,3 ± 1,19 ^b

($\bar{X} \pm EE$): media + error estándar, MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, VCL: velocidad curvilínea, μm·s⁻¹: micrometro por segundo, VAP: velocidad promedio, VSL: velocidad rectilínea, STR: porcentaje de rectitud, LIN: porcentaje de linealidad, WOB: porcentaje de oscilación, ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido de flagelo, Hz: hertzio. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre grupos (^{a-b} P < 0,05)

A pesar de los resultados positivos con el uso de YH se buscan alternativas para minimizar los efectos adversos que ésta pueda causar. Se conoce que el APV es un polímero sintético que previene la formación de hielo luego de la descongelación y además reduce el punto de congelación lo que regula el balance iónico intracelular [11]; sin embargo, las concentraciones elevadas de APV puede provocar toxicidad celular. Además, concentraciones elevadas del APV (1 y 2,5 %) puede aumentar la viscosidad del medio [23] y provocar una disminución de los parámetros cinéticos (motilidad, velocidades y parámetros de relación de progresividad) como fue demostrado en el presente estudio.

En investigaciones anteriores se determinó que la suplementación de 0,05 a 0,3 % (0,5 a 3mg·mL⁻¹) de APV a diluyentes basado en Tris produjo una mejoramiento de la motilidad progresiva e integridad de la membrana plasmática y acrosomal [20, 21]. Se ha demostrado que la combinación de APV (0,8 %) y albúmina sérica bovina (BSA al 1, 4 y 6 %) mostró efectos positivos sobre la motilidad en espermatozoides de perros luego de la incubación post-descongelación en tres medios de cultivo (TCM-199; Sp-TALP; y HTF) [22]. Por otro lado, se ha demostrado que la suplementación con dosis bajas y altas de APV (0,1; 1 y 2 %) al diluyente TCG con 5 % de YH produjo una mejor respuesta a la criopreservación de espermatozoides de chivo (*Capra aegagrus hircus*) [27] y carnero (*Ovis orientalis aries*) [25]. En otro estudio se reemplazó la BSA por APV con el fin de mejorar la motilidad, la reacción acrosómica y la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides de hámster (*Cricetinae*); no obstante, los resultados no evidenciaron cambios en la motilidad [4]. Del mismo modo, se estudió la vitrificación *in vitro* de ovocitos bovinos (*Bovinae*) maduros usando APV al 0,05; 0,1; 0,5 y 1 %; la tasa más alta de embriones que alcanzaron la etapa de mórula después de la vitrificación se obtuvo en una solución reforzada con APV al 0,1 % [3, 8]. Los resultados del presente estudio son inconsistentes a los resultados expuestos en los estudios anteriores, debido a que ellos usan dosis bajas y altas de APV y la criorespuesta fue deseable (o la esperada) [25, 27]. Esto quizá permite especular que la respuesta a la criopreservación con la suplementación de APV es diferente entre especies y tipos de células.

Se realizó una revisión sobre las alternativas a la YH como crioprotectores en la congelación del semen de perro, entre ellas lipoproteínas de baja densidad, plasma de YH, lectina de soya, leche descremada y APV; pero se concluye que a pesar de los riesgos de contaminación cruzada al usar YH, sigue siendo la más usada y con mejores resultados, las alternativas a éste muestran resultados prometedores pero son necesarios más estudios [18].

CONCLUSIONES

La adición YH al medio TCG fue efectiva en la congelación de EE de perro debido a que mejoró la vitalidad, integridad de membrana plasmática y la cinética espermática. La adición de 1 % de APV no mejoró la respuesta a la criopreservación, no obstante, se necesitan más estudios en los que se pruebe otras concentraciones y, asimismo, evaluar los efectos específicos del APV sobre los espermatozoides de perro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores dejamos constancia de nuestro agradecimiento a los laboratorios de Biotecnología y Reproducción Animal de la Universidad Católica de Cuenca y Universidad de Cuenca.

Conflicto de intereses

Los autores certifican que no existen conflictos de interés en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AISEN, E.; ALVAREZ, H.; VENTURINO, A.; GARDE, J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **The Milkweed**. 53: 1053-1061. 2000.
- [2] AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenol**. 61: 895-907. 2004.
- [3] ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S.; FUKI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenol**. 58: 1199-1208. 2002.
- [4] BAVISTER, B.D. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. **J. Exp. Zool**. 217: 45-51. 1981.
- [5] BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenol**. 50: 699-706. 1998.
- [6] BUNYAGA, A.S.; KASHOMA, I.P. Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: A review article. **Tanzania Vet. J.** 35: 213-233. 2017.
- [7] CATURLA-SÁNCHEZ, E.; SÁNCHEZ-CALABUIGA, M.J.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; CERDEIRA, J.; CASTAÑO, C.; SANTIAGO-MORENO, J. Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. **Cryobiol**. 80: 126-129. 2018.
- [8] CHECURA, C.M.; SEIDEL JR, G.E. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenol**. 67: 919-930. 2007.
- [9] CHEEMA, R.S.; KAUR, S.; MAVI, G.K.; SINGH, A.K.; HONPARKHE, M.; GANDOTRA, V.K. *In vitro* evaluation of Labrador dog spermatozoa cryopreserved in Tris-citric acid-fructose buffer supplemented with different combinations of extracellular and intracellular cryoprotectants. **Anim. Biotechnol**. 32: 352-365. 2021.
- [10] CONGDON, T.; NOTMAN, R.; GIBSON, M.I. Antifreeze (Glyco) protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): Detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. **Biomacromolec**. 14: 1578-1586. 2013.
- [11] DELLER, R.; VATISH, M.; MITCHELL, D.; GIBSON, M.I. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. **Nat. Commun**. 5: 1-7. 2014.
- [12] EILTS, B. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. **Theriogenol**. 64: 692-697. 2005.
- [13] FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – New challenges. **Reprod. Domest. Anim**. 44: 336-341. 2009.

- [14] FONTBONNE, A.; BADINAND, F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. **J. Reprod. Fertil.** 47: 325-327. 1993.
- [15] GALARZA, D.A.; JARA, D.I.; PAREDES, E.; SAMANIEGO, J.X.; MÉNDEZ, S.; SORIA, M.E.; PEREA, F.; MUÑOZ-LEÓN, E.; SANTIAGO-MORENO, J. BoviPure® density-gradient centrifugation procedure enhances the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 242: 107003. 2022.
- [16] HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A.; AXNÉR, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1 % soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. **Vet. Med. Sci.** 7: 812-819. 2021.
- [17] HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Anim. Reprod. Sci.** 67: 101-111. 2001.
- [18] MAHIDDINE, F.Y.; KIM, M.J. Overview on the antioxidants, egg yolk alternatives and mesenchymal stem cells and derivatives used in canine sperm cryopreservation. **Anim.** 11. 2021.
- [19] MAZUR, P. Freezing of living cells : mechanisms and implications. **Am. Physiol. Soc.** 247: 125-142. 1984.
- [20] NABEEL, A.H.T.; JEON, Y.; YU, I.J. Use of polyvinyl alcohol as a chemically defined compound in egg yolk-free extender for dog sperm cryopreservation. **Reprod. Domest. Anim.** 54: 1449-1458. 2019.
- [21] NABEEL, A.H.T.; JEON, Y.; YU, I.J. Cryopreservation of dog spermatozoa using essential and non-essential amino acids solutions in an egg yolk-free polyvinyl alcohol extender. **Cryoletters.** 42: 44-52. 2021.
- [22] RISOPATRÓN, J.; CATALÁN, S.; MISKA, W.; SCHILL, W.B.; SÁNCHEZ, R. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated *in vitro*. **Reprod. Domest. Anim.** 37: 347-351. 2002.
- [23] SAKASE, M.; HARAYAMA, H. Involvement of Ca²⁺-ATPase in suppressing the appearance of bovine helically motile spermatozoa with intense force prior to cryopreservation. **J. Reprod. Dev.** 68(3): 2021-2143. 2022.
- [24] SCHÄFER-SOMI, S.; BINDER, C.; BURAK, J.; PAPADOPOULOS, N.; ILAS, J.; BOERSMA, A.; AURICH, C. Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. **Cryobiol.** 100: 63-71. 2021.
- [25] SCHMEHL, M.K.; VAZQUEZ, I.A.; GRAHAM, E.F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. **Cryobiol.** 23: 512-517. 1986.
- [26] SICHERLE, C.C.; SOUZA, F.F.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MOTHÉ, G.B.; PADOVANI, C.R.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Anim. Reprod.** 17: 1-10. 2020.
- [27] TEKIN, K.; DAŞKIN, A. Effect of polyvinyl alcohol on survival and function of angora buck spermatozoa following cryopreservation. **Cryobiol.** 89: 60-67. 2019.
- [28] WOELDERS, H.; MATTHIJIS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiol.** 35:93-105. 1997.