

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em
Veterinária



Dissertação

Dimetilformamida na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti

Pelotas, 2018

Norton Luis Souza Gatti

Dimetilformamida na criopreservação seminal de galos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Júnior

Coorientadora: Dra. Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G263. Gatti, Norton Luis Souza

Dimetilformamida na criopreservação seminal de galos / Norton Luis Souza Gatti ; Antonio Sérgio Varela Jr., orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2018.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Amidas. 2. Criopreservação. 3. DMF. 4. Galos. 5. Semêm. I. Jr., Antonio Sérgio Varela, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD : 636.5

Norton Luis Souza Gatti

Dimetilformamida na criopreservação seminal de galos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Jr. (Orientador)
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande

Profa. Dra. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. PhD. Denise Calisto Bongalardo
PhD em Animal and Poultry Science pela University of Guelph

Profa. Dra. Eliza Rossi Komninou
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradecer é o mínimo que se faz a tantas pessoas que nos ajudam em nossa caminhada. Aos meus pais deixo minha eterna gratidão, por sempre acreditarem em mim e por ensinarem dando os melhores exemplos, além de todo o resto, por serem pessoas maravilhosas e que me orgulham muito, vocês são os melhores!! A minha parceira de vida, que acredito ser a melhor definição da nossa relação, agradeço por todo o amor. Viver o dia-a-dia com uma pessoa positiva e alto-astrol é um privilégio do qual tenho o prazer de desfrutar. Obrigado por me apoiar quando mereço e por me mostrar outras formas de ver as coisas quando estou precisando, Fernanda Ide, eu te amo!! Agradeço aos meus sogros, cunhada e cunhado, e a toda “nova família” que ganhei, me identifico muito com vocês e me orgulho em fazer parte dessa família. Agradeço a minha família em geral, cada um de vocês é importante e eu amo cada um do jeito que é. A todos os amigos de Rio Grande, codornas e outros amigos da faculdade só lastimo não podermos passar tanto tempo juntos como antigamente, mas as memórias do que vivemos estarão sempre comigo, memórias de um tempo bom que não volta nunca mais... Gracias por tudo! Agradeço a todos professores, pós-graduandos, estagiários, técnicos, faxineiras, seguranças e demais trabalhadores que compõem a universidade e que de alguma forma colaboraram na minha formação. Agradeço em especial aos amigos e colegas de pós-graduação Jorge Squeff Filho, Andréia Anciuti e Sara Lorandi, vocês tornaram tudo mais fácil e prazeroso. Por fim, agradeço a professora Carine Dahl Corcini e ao meu orientador Professor Antonio Sergio Varela Junior que cumpriu com perfeição seu papel de facilitador do conhecimento e além de tudo foi um parceiro durante esse tempo de mestrado.

Resumo

GATTI, Norton Luis Souza. **Dimetilformamida na criopreservação seminal de galos**. 2018. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Apesar das dificuldades na utilização de sêmen congelado pela indústria avícola o pujante mercado envolvido representa grande oportunidade para a difusão da técnica de criopreservação nesta espécie. Neste estudo, foi avaliada a adição de dimetilformamida (DMF) como crioprotetor ao diluente de congelamento de sêmen de galos nas concentrações de 3%, 6%, 9% e 12% por diferentes períodos de exposição 1, 3, 5, 7 e 9 minutos. As análises pós-descongelamento foram realizadas no Computer-assisted semen analysis (CASA) analisando parâmetros cinéticos e por citometria de fluxo avaliando a funcionalidade da membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e o índice de fragmentação de DNA. O tratamento com adição de 6% de DMF e 5 minutos de exposição apresentou melhor motilidade progressiva, não diferindo apenas do tratamento com adição de 6% de DMF e 7 minutos de exposição, assim como demonstrou superioridade em quase todos os parâmetros avaliados pelo CASA. Com os resultados da citometria de fluxo foi possível perceber que o ponto de intersecção entre uma boa preservação da membrana plasmática e uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio, foi o tratamento de 6% de DMF com 5 minutos de exposição.

Palavras-chave: amidas; criopreservação; DMF; galos; sêmen

Abstract

GATTI, Norton Luis Souza. **Dimethylformamide in rooster semen cryopreservation**. 2018. 54f. Dissertation (Master's Degree) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

DMF addition to freezing medium has been evaluated as a cryoprotector for rooster semen in the concentrations of 3%, 6%, 9% e 12% during 1, 3, 5, 7 e 9 minutes of exposition. Analysis after thawing such as kinect sperm parameters were assessed by Computer-assisted semen analysis (CASA) and by flow cytometry the evaluations of plasmatic membrane functionality, mitochondria functionality, reactive oxygen species (ROS) production, lipid peroxidation (LPO) and DNA fragmentation index (DFI). The 6% DMF addition treatment during 5 minutes of exposition presented higher progressive motility, differing from not only the 6% addition and 7 minutes of time exposition, but also demonstrating superiority in almost all parameters assayed by CASA system. With data obtained by flow cytometry it was possible to realize the intersection point between a good plasmatic membrane preservation and a low reactive oxygen species production, it was the 6% DMF addition treatment during 5 minutes of exposition.

Keywords: amides; cryopreservation; DMF; rooster; semen

Lista de Figuras

Figura 1	Correlações entre a concentração de DMF e parâmetros avaliados pela citometria de fluxo.....	29
Figura 2	Correlações entre o período de exposição e parâmetros avaliados pela citometria de fluxo.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média \pm SE do parâmetro motilidade total (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	30
Tabela 2	Média \pm SE do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	31
Tabela 3	Média \pm SE do parâmetro distância média percorrida (μm , DAP) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	32
Tabela 4	Média \pm SE do parâmetro distância curvilínea (μm , DCL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	33
Tabela 5	Média \pm SE do parâmetro distância retilínea (μm , DSL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	34
Tabela 6	Média \pm SE do parâmetro velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$, VAP) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	35
Tabela 7	Média \pm SE do parâmetro velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$, VCL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	36
Tabela 8	Média \pm SE do parâmetro velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$, VSL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	37

Tabela 9	Média ± SE do parâmetro deslocamento lateral de cabeça (µm, ALH) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	38
Tabela 10	Média ± SE do parâmetro frequência de batimento cruzado (µm, BCF) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	39
Tabela 11	Média ± SE do parâmetro retilinearidade (% , STR) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	40
Tabela 12	Média ± SE do parâmetro wobble – oscilação (µm/s, WOB) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	41
Tabela 13	Média ± SE do parâmetro linearidade (LIN, %) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	42
Tabela 14	Médias ± SE do parâmetro celular rompimento espermático pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	43
Tabela 15	Médias ± SE do parâmetro celular funcionalidade de membrana espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	44
Tabela 16	Médias ± SE do parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de todos os espermatozoides pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	45
Tabela 17	Médias ± SE do parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides viáveis pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	46
Tabela 18	Médias ± SE do parâmetro celular LPO espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	47

Tabela 19	Médias \pm SE do parâmetro celular DFI espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	48
Tabela 20	Médias \pm SE do parâmetro celular funcionalidade de mitocôndria espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.....	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento cruzado
BSA	Albumina sérica bovina
CASA	Sistema de análise espermática computadorizada
DAP	Distância média percorrida
DCF	Diacetato de carboxifluoresceína
DCL	Distância curvilínea
DMA	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
DSL	Distância retilínea
LIN	Linearidade
LPO	Peroxidação lipídica
PI	Iodeto de propídeo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade média percorrida
VCL	Velocidade curvilínea,
VSL	Velocidade retilínea
Wob	Oscilação

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
©	Copyright
g	Gramas
°C	Graus Celsius
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
µL	Microlitro
%	Porcento
µm	Micrômetro
µm/s	Micrômetros por segundo

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Artigo.....	15
3 Considerações Finais.....	50
Referências.....	51

1 Introdução

A criopreservação espermática possibilita o armazenamento e transporte de sêmen para uso em técnicas de reprodução artificial, sendo a técnica mais utilizada para conservação de material genético. Apesar de ser utilizada comercialmente em determinadas espécies, para galos a prática ainda não é adotada industrialmente (LONG, 2006).

Dentre as principais dificuldades quanto ao congelamento seminal de galos, está a redução nas taxas de fertilidade quando se usa sêmen congelado em comparação ao sêmen fresco e também a falta de padronização em estudos sobre o congelamento de sêmen desta espécie, o que dificulta a comparação de dados mesmo entre trabalhos que testam a mesma variável (ABOUELEZZ et al., 2017).

O processo de criopreservação seminal é sabidamente danoso para as células espermáticas por diferentes razões como choque térmico, choque osmótico, formação de cristais de gelo intra e extracelulares (SIEME et al., 2016). Ultimamente grande atenção é dada também ao estresse oxidativo e encontrar maneiras de evitar uma produção elevada de espécies reativas de oxigênio ou aumentar a capacidade antioxidante do sêmen é fundamental para manter a funcionalidade das células (PARTYKA et al., 2012).

Glicerol e dimetilacetamida (DMA) são considerados os mais adequados agentes crioprotetores para o congelamento de sêmen de aves (WOELDERS et al., 2006; BLESBOIS et al., 2007) embora seja verdade que foram os dois mais estudados até agora. As amidas possuem menor peso molecular e viscosidade que o glicerol, o que diminuiria a possibilidade de estresse osmótico (BIANCHI et al., 2008). Além disso, diferente do glicerol não apresentam efeito contraceptivo no trato reprodutivo da fêmea, não precisando ser retiradas do sêmen após o descongelamento, procedimento que reduz a qualidade espermática (RAKHA et al., 2017), dessa forma demonstrando grande potencial para uso na criopreservação espermática de galos. A principal desvantagem do uso de amidas no processo de criopreservação relatada até o momento diz respeito a elevada toxicidade, foi

demonstrado que a adição de DMA 6% prévia ao congelamento durante 30 minutos de exposição no sêmen, reduziu a viabilidade espermática em relação a adição da mesma concentração do crioprotetor durante 1 minuto de exposição (ZANIBONI et al., 2014).

Alguns estudos demonstraram resultados interessantes com o uso de amidas em aves como Abouelezz et al. (2017) e Tselutin et al. (1999), e em meio a busca por amidas alternativas a DMA, recentemente a DMF foi utilizada como agente crioprotetor no congelamento de sêmen de galos em comparação a metil-acetamida (MA) e DMA não sendo demonstrada diferença estatística entre as amidas testadas quanto a motilidade progressiva (MIRANDA et al., 2018).

Ao adicionar um agente crioprotetor ao sêmen diluído, é necessário um certo período para que o mesmo possa penetrar a célula, é o chamado tempo de equilíbrio, que varia de acordo com a espécie animal e com a natureza e concentração do agente crioprotetor (IAFFALDANO et al., 2012). Identificar as melhores condições para o uso de crioprotetores é fundamental para otimizar sua performance e garantir maior proteção e funcionalidade das células espermáticas após passarem pelos processos de congelamento e descongelamento.

A utilização de um único teste de laboratório não é o suficiente para estimar a fertilidade do sêmen, enquanto a combinação da análise de alguns atributos espermáticos se mostra mais precisa e mais efetiva para a predição de fertilidade (GLIOZZI et al., 2017). O objetivo deste estudo foi determinar a melhor concentração e tempo de exposição para utilizar a DMF na criopreservação seminal de galos, utilizando as variáveis cinéticas do CASA e a citometria de fluxo (funcionalidade mitocondrial, funcionalidade de membrana plasmática, índice de fragmentação de DNA, produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica), a fim de aperfeiçoar o processo de congelamento de sêmen nesta espécie

2 Artigo

DMF na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti; Carine Dahl Corcini; Jorge Squeff Filho; Sara Lorandi Soares; Andréia Nobre Anciuti; Rafael Mielke Barbosa; Nathalia Knabah; Amauri Telles Tavares; Denise Calisto Bongalhardo e Antonio Sergio Varela Junior

Submetido à revista Theriogenology

DMF na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti¹; Carine Dahl Corcini²; Jorge Squeff Filho¹; Sara Lorandi Soares³; Andréia Nobre Anciuti¹; Rafael Mielke Barbosa¹; Nathalia Wacholz Knabah¹; Amauri Telles Tavares⁴; Denise Calisto Bongalhardo⁵ e Antonio Sergio Varela Junior^{6*}

¹ Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

² Departamento de Patologia Animal, Laboratório de Reprodução Animal, FV, UFPel

³ Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de desenvolvimento tecnológico CDTEC / Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

⁴ Graduação em Zootecnia Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

⁵ Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.

⁶ Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brasil. * Email: antoniovarela@furg.br

Resumo

Apesar das dificuldades na utilização de sêmen congelado pela indústria avícola o pujante mercado envolvido representa grande oportunidade para a difusão da técnica de criopreservação nesta espécie. Neste estudo, foi avaliada a adição de DMF como crioprotetor ao diluente de congelamento de sêmen de galos nas concentrações de 3%, 6%, 9% e 12% por diferentes períodos de exposição 1, 3, 5, 7 e 9 minutos. As análises pós-descongelamento foram realizadas no Computer-assisted semen analysis (CASA) analisando parâmetros cinéticos e por citometria de fluxo avaliando a funcionalidade da membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e o índice de fragmentação de DNA. O tratamento com adição de 6% de DMF e 5 minutos de exposição apresentou melhor motilidade progressiva, não diferindo apenas do tratamento com adição de 6% de DMF e 7 minutos de exposição, assim como demonstrou superioridade em quase todos os parâmetros avaliados pelo CASA. Com os resultados da citometria de fluxo foi possível perceber que o ponto de intersecção entre uma boa preservação da membrana plasmática e uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio, foi o tratamento de 6% de DMF com 5 minutos de exposição.

Palavras-chave: amidas; criopreservação; DMF; galos; sêmen

1. Introdução

A indústria do frango (poedeiras e de corte) representa um importante setor da economia que movimenta vultuosos investimentos, e por ser uma atividade altamente tecnicizada é cada vez mais difícil melhorar a performance dos animais. Apesar disso, mesmo com o avanço obtido em relação a criopreservação seminal de diferentes espécies, o uso industrial de sêmen de galo congelado permanece inviável [1], principalmente devido à redução nas taxas de fertilidade em relação ao uso de sêmen fresco etambém a falta de padronização em estudos sobre o congelamento de sêmen desta espécie, o que dificulta a comparação de dados mesmo entre trabalhos que testam a mesma variável [2]. Os protocolos testados na criopreservação seminal de galos diferem em muitos aspectos como o diluente, método de congelamento e descongelamento, condições de uso do crioprotetor e outros, tornando mais lenta a formação de conhecimento sobre o congelamento de sêmen nesta espécie.

O uso de agentes crioprotetores adequados, sua concentração ideal no diluente e o tempo ótimo de exposição do sêmen ao agente crioprotetor de acordo com a espécie estudada, são alguns dos importantes fatores a serem identificados para que seja possível otimizar a qualidade do sêmen congelado.

As amidas, formadas por grupos funcionais que contém nitrogênio [3], conseguem interagir com a água unindo seu nitrogênio e hidrogênio ao hidrogênio presente na estrutura química da água. Testadas no congelamento seminal de diversas espécies, as amidas vem sendo muito utilizadas em aves por não estarem ligadas a efeitos contraceptivos como o glicerol, não sendo necessária sua remoção após o descongelamento[4, 5]. Além disso, por apresentarem menor peso molecular e viscosidade, diminuiriam a possibilidade de dano celular pelo estresse osmótico [6]. A principal desvantagem relatada por autores que utilizaram amidas na criopreservação seminal foi a toxicidade elevada, [7] encontrou redução na viabilidade espermática ao utilizar dimetilacetamida (DMA) 6% no diluente de congelamentopor 30 min de exposição com o sêmen prévio ao congelamento.

Uma alternativa a adição de DMA como crioprotetor é a dimetilformamida (DMF) que foi utilizada com resultados satisfatórios em outras espécies como cavalos [8, 9, 10], camelos [11] e suínos [6], sendo superior ao glicerol nestes estudos. Recentemente a DMF foi utilizada como crioprotetor no congelamento de sêmen de galos [12] em comparação com outras amidas DMA e metilacetamida e não foi demonstrada diferença no desempenho ao considerar a motilidade progressiva pós-descongelamento.

Ao adicionar um agente crioprotetor ao sêmen diluído, é necessário um período de tempo para que o mesmo possa penetrar a célula, é o chamado tempo de equilíbrio, que varia de acordo com a espécie animal e com a natureza e concentração do agente crioprotetor [13]. A criopreservação é um processo que promove grande estresse as células espermáticas impondo condições extremamente desfavoráveis á manutenção de sua viabilidade [14], ocorrendo alterações em diferentes estruturas, de forma que mesmo espermatozoides móveis podem possuir lesões que o impediriam de realizar a fecundação.

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento seminal de galos após o descongelamento ao utilizar o DMF como crioprotetor, testando diferentes concentrações desta amida adicionada ao diluente de congelamento por diferentes períodos de exposição ao sêmen, a fim de determinar as melhores condições para seu uso como crioprotetor nesta espécie.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Quarenta e quatro galos da linhagem Embrapa 051 (galos semi-pesados), sexualmente maduros (26-30 semanas de idade) foram criados e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os galos eram alojados individualmente em gaiolas individuais e mantidos a 20-24 graus, sob foto período de 12h luz e 12h de escuro. Ração comercial era fornecida na dose de 140g por dia e água ad libitum.

2.2. Coleta e diluição seminal

A coleta de sêmen era realizada duas vezes por semana pelo método de massagem dorso-abdominal [15] e o sêmen era obtido através de um tubo plástico graduado e diluído 1:1 com o diluente de Lake. O diluente de Lake [16] foi o diluente utilizado para o resfriamento e congelamento com composição para cada um litro: frutose ($C_6H_{12}O_6$) 10 g; cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,68 g; citrato de potássio tribásico ($C_6H_5K_3O_7$) 1,28 g; acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2$) 5,13 g; glutamato monossódico ($C_5H_8NO_4Na$) 21,25 g. Para o congelamento era utilizado este mesmo diluente com adição de DMF na concentração respectiva a cada tratamento prévio ao congelamento.

2.3. Seleção de ejaculados e formação de pools

Alíquotas de cada ejaculado eram retiradas para verificar motilidade e concentração. Para a avaliação de motilidade 5 μ L de sêmen eram colocados sobre uma lâmina e coberto com lamínula e analisados em um microscópio de contraste de fase no aumento de 200x (BX 41 Olympus America, Inc., São Paulo, SP, Brasil), sempre pelo mesmo técnico treinado e apenas ejaculados com 80% de motilidade ou mais foram utilizados para a formação dos pools. A concentração era estimada com o uso de um espectrofotômetro Micronal B542® ao comprimento de onda de 450 nm. Dos ejaculados coletados no dia, eram escolhidos os que tinham maior motilidade e os pools eram feitos para obter volume de amostra suficiente para análise. Depois de formado o pool, o volume de diluente era ajustado até atingir a concentração de 800 \times 10⁶ espermatozoides/mL. Desde a coleta, o sêmen era mantido em caixa de isopor.

2.4. Criopreservação seminal

Os pools prontos eram levados a câmara fria para estabilização e mantidos a 5°C por 2 horas. Alíquotas de 125 μ L de cada pool eram diluídas 1:1 com os respectivos tratamentos (diluente de Lake com o dobro da concentração final da amida utilizada), atingindo a concentração final de 400 \times 10⁶ espermatozoides/mL. O sêmen permanecia em contato com o tratamento pelo período de exposição estabelecido (1, 3, 5, 7 ou 9 min) e era colocado no vapor de nitrogênio a 3 cm de altura do nitrogênio líquido [17] por 7 minutos. Após, as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido a -196°C e armazenadas por (2 meses).

2.5. Descongelamento e análises espermáticas pós-descongelamento

As palhetas eram descongeladas em banho-maria com agitação a 37°C por 20s. Para a diluição das amostras descongeladas foi utilizado o diluente de Lake com adição de albumina sérica bovina (BSA) 3mg/mL e eram diluídos 40 μ L de sêmen em 200 μ L de Lake com BSA.

Para as avaliações as amostras permaneciam na temperatura da sala que era mantida a 22°C.

2.5.1. CASA

Após o descongelamento, uma alíquota de 5 μ L era colocada entre lâmina e lamínula para estimar motilidade e outras características cinéticas dos espermatozoides, utilizando o sistema Androvision® - Software CASA, com computador e monitor (Minitube). Os parâmetros avaliados foram motilidade total e progressiva (%), DAP (distância média percorrida, μ m), DCL (distância curvilínea, μ m), DSL (distância retilínea, μ m), VAP

(velocidade média percorrida, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), STR (retilinearidade %), Lin (linearidade %), Wob (oscilação, VAP/VCL, %), ALH (amplitude do deslocamento lateral da cabeça, μm) e BCF (frequência de batimento cruzado).

2.5.2. Citometria de fluxo

As análises foram realizadas por um citometro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer® (Applied Biosystems) equipado com fotodetector BL1 (filtro 530/30) que detectava o DCF-diclorofluoresceína (integridade de membrana plasmática e espécies reativas de oxigênio) e a rodamina 123 (funcionalidade de mitocôndria). A fluorescência vermelha do iodeto de propídeo (integridade de membrana) era detectada por um fotodetector BL3 (filtro 640LP). Para mensurar populações espermáticas, as células eram coradas com Hoescht 33342 e detectadas por um fotodetector VL1 (filtro 450/40), enquanto as contagens não espermáticas eram eliminadas baseadas em scatter plots. Foram analisados um total de 20.000 eventos por amostra em velocidade de fluxo de 500 células/segundo.

2.5.2.1. Preparação da amostra

Para cada avaliação eram utilizados 10 μL de amostra e se fazia a adição da respectiva sondafluorescente permanecendo em banho seco a 37°C por 10 minutos. Na sequência, 20 μL de solução de Hoescht (10mg/mL) era adicionado e mantido por 1 minuto em contato com a amostra a fim de determinar a população espermática e cores de fluorescências específicas, sendo analisada em seguida. Apenas para as análises de ROS e LPO o tempo de banho seco era diferente, sendo de 15 minutos.

2.5.2.2. Integridade de membrana

Para esta análise eram utilizadas as probes fluorescentes iodeto de propídeo (PI) e syber. Apenas células com a membrana lesada permitem a entrada de PI que penetra o núcleo da célula, enquanto o syberpenetra o espermatozoide e é convertido em um composto fluorescente não-permeável que fica retido no citoplasma. Sendo assim, eram considerados com membrana plasmática intacta, espermatozoides marcados apenas com syber.

2.5.2.3. Funcionalidade mitocondrial

Nesta avaliação as mitocôndrias ativas eram coradas com a probe fluorescente rodamina 123. A fluorescência verde é maior em mitocôndrias mais ativas. Dessa forma,

espermatozoides com pouca fluorescência verde eram considerados com baixa atividade mitocondrial e os corados intensamente com fluorescência verde eram considerados com alta atividade mitocondrial.

2.5.2.4. Peroxidação lipídica (LPO)

O body-pi era a probe fluorescente utilizada para a análise da peroxidação lipídica, na qual se considera a quantidade de células espermáticas afetadas pela produção de espécies reativas de oxigênio. Para calcular a taxa de peroxidação lipídica era utilizada a mediana da intensidade de fluorescência verde (lipídeo peroxidado)/mediana da intensidade de fluorescência verde mais a mediana da intensidade de fluorescência vermelha (lipídeo não-peroxidado) x 100.

2.5.2.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Apenas células vivas produzem radicais livres como as espécies reativas de oxigênio. Para mensurar concentração de ROS foram utilizadas as probes diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídeo (PI). O DCF emite fluorescência verde quando oxidado e o PI emite fluorescência vermelha. A estimativa da produção de ROS era alcançada através da mediana da intensidade de fluorescência verde usada para mensurar apenas células vivas (PI negativo).

2.5.2.6. Índice de fragmentação de DNA (DFI)

A análise do DFI era a única em que não se usava Hoescht, sendo utilizadas 3 probes combinadas. Para cada avaliação era feita a adição da primeira probe TNE (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.001 EDTA, pH 7.2) a 10 μ L de sêmen tratado, depois a segunda probe era adicionada 10 μ L de Triton (Triton X – 100, 0.1%) e então era adicionado laranja de acridina imediatamente antes da leitura.

2.6. Análises estatísticas

Todas as variáveis foram distribuídas de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados transformados por não apresentarem distribuição normal e os demais foram avaliados através de estatística descritiva, análise ANOVA e, posteriormente, todos as médias foram testadas pelo teste LSD. Os dados da citometria também foram avaliados quanto a correlações pelo teste de Pearson. O Programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi o Statistix

10® (Statistix. Statistix 10 for Windows. Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA, 2014). A significância atribuída a todos os valores foi $P < 0.05$.

3. Resultados e Discussão

A avaliação da cinética espermática comprovou que a motilidade total e progressiva do tratamento com dimetilformamida na concentração de 6% no diluente de congelamento, permanecendo pelo período de 5 minutos de exposição, foi superior ($P < 0.05$) as demais concentrações de DMF (tabelas 1 e 2). Com exceção do tratamento com 6% de DMF e período de exposição de 7 minutos prévio ao congelamento ($P > 0.05$) os demais tempos não foram eficientes ($P < 0.05$) quando comparados a concentração com 6% e 5 minutos de exposição, demonstrando queda do percentual de células móveis totais ou progressivas. Os demais parâmetros de cinética espermática também apresentaram este mesmo padrão de resposta entre a concentração de DMF utilizada e o tempo de exposição do crioprotetor (tabelas 3 a 13 cinética).

Em estudo recente se obteve motilidade progressiva pós-descongelamento inferior a 20% ao utilizar DMF 7,5% como crioprotetor no congelamento seminal de galos [12], na ocasião o período de exposição foi de 45 minutos e provavelmente o elevado tempo de exposição não foi o adequado para preservar a integridade das células espermáticas, concordando com nossos resultados. Interessantemente [18] utilizou DMF na concentração final de 6% com 15 minutos de período de exposição que seria um período muito longo de acordo com nossos resultados e demonstrou motilidade progressiva semelhante a encontrada no presente estudo, talvez devido às diferenças entre protocolos de congelamento o que de certa forma dificulta a comparação de dados.

Este é o primeiro estudo investigando a influência da concentração e período de exposição da DMF quando adicionada previamente ao diluente de congelamento na criopreservação seminal de galos. Através de nossos dados foi possível identificar qual a melhor concentração e período de exposição prévio ao congelamento que deve ser utilizado com o crioprotetor DMF, otimizando a preservação das características espermáticas e assim aumentando a qualidade do sêmen descongelado, isto é importante devido ocorrer, após a criopreservação, alterações das características bioquímicas e estruturais do espermatozoide que reduzem a fertilidade [19].

A concentração de 6% de DMF com 5 minutos de exposição foi a que apresentou maior distância média percorrida pelos espermatozoides, distancia media curvilínea, velocidade média percorrida, velocidade média curvilínea, ALH e BCF, quando comparada

aos demais períodos de exposição na mesma concentração e foi a maior nas diferentes concentrações de DMF utilizadas no período de 5 minutos, sendo esta a maior distância percorrida apresentada na tabela (tabela 3). Outros parâmetros do CASA não ajudaram na percepção de um tempo e concentração ideal desta amida.

As análises de citometria de fluxo dos espermatozoides descongelados demonstraram por que a cinética espermática apresentou como melhores resultados os tratamentos de 6% de DMF por 5 a 7 minutos de exposição das células.

O rompimento de membrana foi menor ($P < 0,05$) com o aumento da concentração ($r = -0,26$; $P < 0,05$) e do tempo ($r = -0,13$; $P < 0,05$) de exposição ao DMF (tabela 14; figura 1), já quando avaliamos a funcionalidade da membrana plasmática os períodos de 7 e 9 minutos não foram benéficos na maioria das concentrações de DMF, e apresentaram correlação negativa ($r = -0,12$; $P < 0,05$) com o período de exposição e positiva com a concentração utilizada ($r = 0,09$; $P < 0,05$). Em estudo utilizando a dimetilacetamida (DMA) 6% na criopreservação seminal de galos [20] a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foi menor com 1 minuto de equilíbrio da amida com o sêmen, do que quando equilibrado por 30 minutos. Já no presente estudo, ao utilizar a DMF na mesma concentração obtivemos maior funcionalidade da membrana plasmática em 1 minuto de equilíbrio em relação aos maiores períodos de exposição avaliados (7 e 9 minutos). Observando juntas, as tabelas de rompimento de membrana e funcionalidade de membrana (tabelas 14 e 15) nota-se a incapacidade do tratamento com 1 % de DMF e 1 minuto de período de exposição de proteger a membrana plasmática, provavelmente devido ao insuficiente tempo de exposição para uma concentração tão baixa.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS total e ROS viável) está contrariamente a estes resultados em relação ao tempo e concentração de DMF, pois foi menor ($P < 0,05$) nas concentrações mais baixas e nos menores períodos de exposição (tabelas 16 e 17). Não ocorreu o aumento da ROS (total e viável) nos períodos de exposição 1 e 3 minutos em todas as concentrações de DMF utilizadas. O período de exposição do crioprotetor DMF teve correlação positiva com a ROS total ($r = 0,22$; $P < 0,05$) e com a ROS viável ($r = 0,21$; $P < 0,05$). Fisiologicamente ocorre um equilíbrio entre a ROS e a capacidade antioxidante do sêmen, mas quando ocorre aumento da ROS no processo de criopreservação, diminui a qualidade e a habilidade fertilizante do espermatozoide descongelado, reduzindo a integridade de membrana plasmática e a porcentagem de mitocôndrias ativas nas células espermáticas [21].

Com 5 minutos de exposição somente as concentrações de 3% e 6% não tiveram aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio, já nos períodos de 7 e 9 minutos o aumento da concentração de DMF incrementou a produção de espécies reativas de oxigênio, e acreditamos que ocorreu a parada do metabolismo celular de parte da população nos tratamentos com 12% de DMF, com 7 e 9 minutos de exposição (diminuição da média de produção de ROS e aumento do erro padrão da média). O ponto de intersecção, entre uma boa preservação da membrana plasmática e uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio, foi o tratamento de 6% DMF com 5 min de exposição.

Neste experimento o índice de fragmentação do DNA (DFI) não foi incrementado (figura 1) em relação aos períodos de exposição prévios ao congelamento (a correlação não foi significativa), diferente da LPO (tabela 18) que foi aumentada ($r = 0,13$; $P < 0,05$) com o aumento do tempo de exposição, mas não teve correlação com a concentração do crioprotetor. Já quando avaliado o DFI com a concentração de crioprotetor utilizada (tabela 19), percebemos que quanto maior a concentração ocorreu menor DFI ($r = 0,09$; $P < 0,05$). Mas estes parâmetros (DFI e LPO) não foram variáveis dependentes úteis para a compreensão de qual concentração e período de exposição do DMF que deve ser utilizada para a criopreservação do sêmen de galos.

A funcionalidade de mitocôndria não diferiu entre as diferentes concentrações dentro de um mesmo tempo (tabela 20), já o período de exposição de 1 minuto foi o melhor nas concentrações de 9% e 12%, e esteve dentre os melhores resultados nas concentrações de 3% e 6%, demonstrando que quando consideramos somente a funcionalidade de mitocôndria indiferente da concentração utilizada o ideal para preservar a funcionalidade da mitocôndria é expor o crioprotetor pelo menor período de exposição possível.

A avaliação objetiva e precisa realizada na citometria de fluxo, além do alto nível de repetibilidade experimental permitem o estudo detalhado da resposta espermática a procedimentos de congelamento [22, 23]. Em nosso estudo foi possível observar o comportamento de diferentes características que envolvem a “saúde” das células espermáticas após o descongelamento quando se utiliza DMF em diferentes concentrações e períodos de exposição. O estudo dessas características provavelmente ajudará no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de galos e na otimização do processo.

4 Conclusão

De acordo com nossos resultados o ponto de intersecção entre uma boa proteção de membrana plasmática e uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio foi o tratamento de 6% de DMF com 5 minutos de exposição que apresentou a maior motilidade progressiva, não diferindo estatisticamente apenas do tratamento DMF 6% com 7 minutos de exposição. Estudos futuros testando concentrações e tempos intermediários de DMF podem ajudar a encontrar as condições ótimas para o uso desta substância na criopreservação seminal de galos.

5 Referências

- [1] Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* 2016; 73(3):343-347.
- [2] Abouelezz FMK, Sayed MAM, Santiago-Moreno J. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. *Animal reproduction science* 2017;184:228-234.
- [3] Alves JP, Corcini CD, Silva EF, Caldas JS, Cardoso TF, Piedras SRN, Jardim RD, Varela ASJr. The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes bonariensis*. *Cryobiology* 2016; 73(3):383-387.
- [4] Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in domestic animals* 2015; 50(1):135-141.
- [5] Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Zafar Z, Naseer A, Hussain I, Santiago-Moreno J, Blesbois E. Dimethylacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology* 2017; 103:83-89.
- [6] Bianchi I, CalderaM K, Maschio EF, Madeira EM, Rosa Ulguim R, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia TJR, Deschamps JC, Corrêa MN. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 2008; 69:632–638.
- [7] Zaniboni L, Chiara C, Maria G, Teresa MG, Silvia C. Pellet cryopreservation for chicken semen: effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology* 2014; 82(2):251–258.

- [8] Oldenhof H, Bigalk J, Hettel C, De Oliveira Barros L, Sydykov B, Bajcsy AC, Sieme H, Wolkers WF. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreservation and biobanking* 2017; 15(5):422-431.
- [9] Gibb Z, Morris LHA, Maxwell WMC, Grupen CG. Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology* 2013; 79(7):1027-1033.
- [10] Pukazhenthii BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, Coutinho Da Silva M, Alvarenga MA, Wildt DE. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology* 2014; 68(2):205-214.
- [11] El-Badry DA, Mohamed RH, El-Metwally HA, Abo Al-Naga TR. The effect of some cryoprotectants on dromedary camel frozen-thawed semen. *Reproduction in Domestic Animals* 2017; 52(3):522-525.
- [12] Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N, Chrenek P. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2018; 53(1):93-100.
- [13] Iaffaldano N, Di Iorio M, Pina Rosato M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 2012; 78:1381–1389.
- [14] Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 2006; 63(3):215-225.
- [15] Burrows WH, Quinn JP. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 1937; 16(1):19-24.
- [16] Lake PE. Studies on the dilution and storage of fowl semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 1960; 1(1):30-35.
- [17] Madeddu M, Mosca F, Abdel Sayed A, Zaniboni L, Mangiagalli MG, Colombo E, Cerolini S. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Animal reproduction science* 2016; 171:58-64.
- [18] Chuaychu-Noo N, Thananurak P, Chankitisakul V, Vongpralub T. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology* 2017; 74:8-12.

- [19] Long JA. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science* 2006; 85(2):232–236.
- [20] Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, Campo JL. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry science* 2011; 90(9):2047-2053.
- [21] Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 2012; 77(8):1497-1504.
- [22] Partyka A, Nizanski W, Łukaszewics E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* 2010; 74(6):1019-1027.
- [23] Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005; 63(2):445-457.

6 Figuras

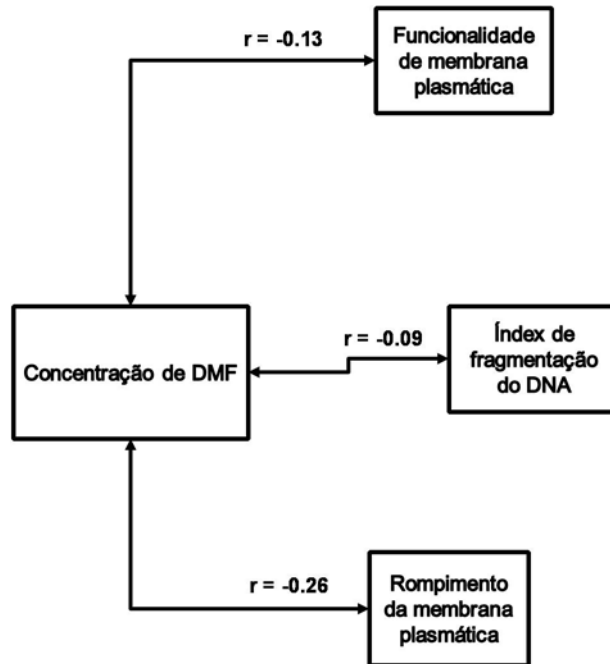


Figura 1: Correlações entre a concentração de DMF e parâmetros avaliados pela citometria de fluxo.

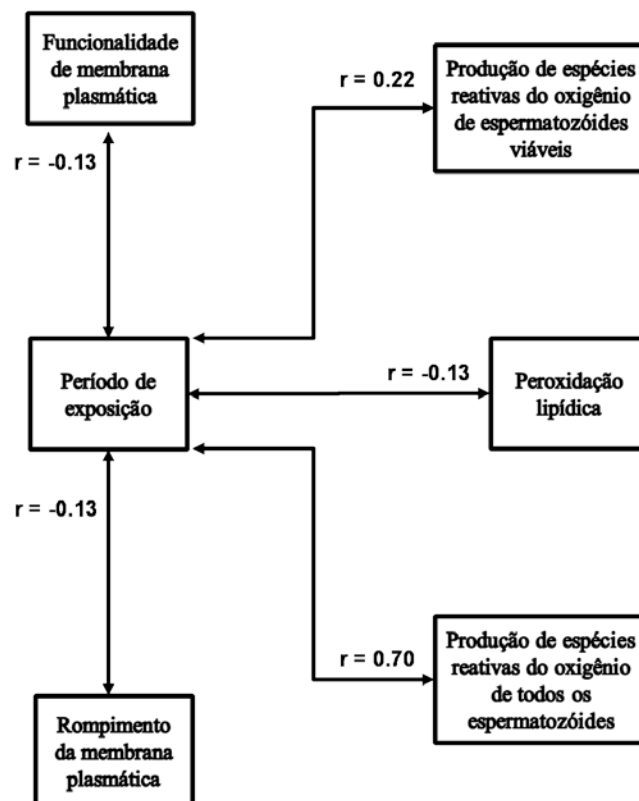


Figura 2: Correlações entre o período de exposição e parâmetros avaliados pela citometria de fluxo.

7. Tabelas

Tabela 1. Média \pm SE do parâmetro motilidade total (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	29.5 \pm 1.0 ^{Cd}	33.2 \pm 1.1 ^{Bbc}	37.2 \pm 1.0 ^{Ba}	35.3 \pm 1.0 ^{Bab}	31.9 \pm 0.9 ^{Ac}
6%	37.3 \pm 1.1 ^{Abc}	36.4 \pm 1.1 ^{Ac}	41.1 \pm 1.2 ^{Aa}	39.7 \pm 1.0 ^{Aab}	32.3 \pm 1.0 ^{Ad}
9%	33.2 \pm 1.0 ^{Bab}	30.5 \pm 0.8 ^{Bb}	34.8 \pm 1.0 ^{Ba}	32.9 \pm 1.0 ^{Bab}	27.5 \pm 0.9 ^{Bc}
12%	31.3 \pm 0.9 ^{Bca}	27.2 \pm 0.9 ^{Cbc}	29.5 \pm 0.9 ^{Cab}	29.3 \pm 0.7 ^{Cab}	26.3 \pm 0.8 ^{Bc}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 2. Média \pm SE do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	25.0 \pm 0.9 ^{Cd}	28.8 \pm 0.9 ^{Bbc}	32.5 \pm 0.9 ^{Ba}	30.7 \pm 1.0 ^{Bab}	27.2 \pm 0.9 ^{Accd}
6%	33.0 \pm 1.1 ^{Abc}	31.8 \pm 1.0 ^{Ac}	36.7 \pm 1.2 ^{Aa}	35.3 \pm 1.0 ^{Aab}	27.9 \pm 1.0 ^{Ad}
9%	28.8 \pm 0.9 ^{Bab}	26.0 \pm 0.7 ^{Cbc}	30.8 \pm 1.0 ^{Ba}	28.7 \pm 1.0 ^{Bab}	23.7 \pm 0.8 ^{Bc}
12%	26.6 \pm 0.8 ^{BCa}	22.9 \pm 0.8 ^{Dbc}	25.0 \pm 0.8 ^{Cab}	24.3 \pm 0.7 ^{Cbc}	22.3 \pm 0.8 ^{Bc}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 3. Média \pm SE do parâmetro distância média percorrida (μm , DAP) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	14.1 \pm 0.2 ^{Bab}	13.8 \pm 0.2 ^{Ab}	14.7 \pm 0.3 ^{Ba}	14.7 \pm 0.2 ^{Aa}	14.4 \pm 0.2 ^{Aab}
6%	14.8 \pm 0.2 ^{Abc}	14.5 \pm 0.3 ^{Ac}	15.9 \pm 0.2 ^{Aa}	15.2 \pm 0.2 ^{Ab}	14.3 \pm 0.2 ^{Ac}
9%	13.9 \pm 0.2 ^{Bab}	14.1 \pm 0.2 ^{Aab}	14.3 \pm 0.3 ^{Ba}	13.9 \pm 0.2 ^{Bab}	13.3 \pm 0.3 ^{Bb}
12%	12.8 \pm 0.2 ^{Cab}	12.2 \pm 0.3 ^{Bb}	13.1 \pm 0.3 ^{Ca}	12.9 \pm 0.2 ^{Cab}	12.6 \pm 0.3 ^{Cab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 4. Média \pm SE do parâmetro distância curvilínea (μm , DCL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	24.4 \pm 0.4 ^{Bbc}	24.0 \pm 0.4 ^{Bc}	25.4 \pm 0.5 ^{Bab}	26.0 \pm 0.3 ^{Aa}	25.0 \pm 0.4 ^{Aabc}
6%	26.4 \pm 0.5 ^{Ab}	25.5 \pm 0.5 ^{Abc}	27.9 \pm 0.4 ^{Aa}	26.5 \pm 0.4 ^{Ab}	25.0 \pm 0.4 ^{ABc}
9%	24.3 \pm 0.4 ^{Bab}	24.3 \pm 0.5 ^{ABab}	25.3 \pm 0.5 ^{Ba}	24.3 \pm 0.5 ^{Bab}	24.0 \pm 0.6 ^{Bb}
12%	22.8 \pm 0.4 ^{Ca}	21.5 \pm 0.4 ^{Cb}	23.2 \pm 0.5 ^{Ca}	22.7 \pm 0.4 ^{Ca}	22.0 \pm 0.5 ^{Cab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$).

Tabela 5. Média \pm SE do parâmetro distância retilínea (μm , DSL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	7.1 \pm 1.0 ^{Bab}	6.8 \pm 0.1 ^{Ab}	7.3 \pm 0.2 ^{ABa}	7.5 \pm 0.1 ^{Aa}	7.3 \pm 0.2 ^{Aa}
6%	7.6 \pm 0.2 ^{Aa}	7.0 \pm 0.1 ^{Ab}	7.7 \pm 1.2 ^{Aa}	7.7 \pm 1.2 ^{Aa}	7.5 \pm 0.2 ^{Aab}
9%	6.8 \pm 0.1 ^{Bab}	6.7 \pm 0.1 ^{Ab}	7.2 \pm 1.2 ^{Ba}	6.9 \pm 0.2 ^{Bab}	6.8 \pm 0.2 ^{Bb}
12%	6.2 \pm 0.1 ^{Cab}	6.0 \pm 0.2 ^{Bb}	6.6 \pm 0.2 ^{Ca}	6.1 \pm 0.1 ^{Cb}	6.2 \pm 0.2 ^{Cab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$).

Tabela 6. Média \pm SE do parâmetro velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$, VAP) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	35.8 \pm 0.5 ^{ABab}	35.0 \pm 0.6 ^{Ab}	36.8 \pm 0.6 ^{Ba}	36.9 \pm 0.5 ^{Aa}	36.4 \pm 0.6 ^{Aab}
6%	37.0 \pm 0.6 ^{Abc}	36.4 \pm 0.7 ^{Abc}	39.9 \pm 0.6 ^{Aa}	38.0 \pm 0.5 ^{Ab}	35.9 \pm 0.6 ^{Ac}
9%	35.0 \pm 0.5 ^{Bab}	35.6 \pm 0.5 ^{Aa}	35.8 \pm 0.6 ^{Ba}	35.0 \pm 0.6 ^{Bab}	33.5 \pm 0.7 ^{Bb}
12%	32.3 \pm 0.6 ^{Cab}	30.7 \pm 0.7 ^{Bb}	32.8 \pm 0.8 ^{Ca}	32.8 \pm 0.5 ^{Ca}	32.0 \pm 0.7 ^{Bab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$).

Tabela 7. Média \pm SE do parâmetro velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$, VCL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	61.6 \pm 1.0 ^{Bb}	60.4 \pm 1.0 ^{Bb}	63.3 \pm 1.1 ^{Bab}	64.8 \pm 0.9 ^{Aa}	62.9 \pm 1.0 ^{Aab}
6%	65.6 \pm 1.0 ^{Ab}	64.1 \pm 1.2 ^{Abc}	69.8 \pm 1.1 ^{Aa}	65.9 \pm 0.9 ^{Aa}	61.8 \pm 1.0 ^{ABc}
9%	61.0 \pm 0.9 ^{Bab}	61.4 \pm 1.1 ^{ABab}	63.0 \pm 1.1 ^{Ba}	60.8 \pm 1.1 ^{Bab}	59.1 \pm 1.4 ^{BCb}
12%	57.1 \pm 1.0 ^{Ca}	53.8 \pm 1.1 ^{Cb}	57.6 \pm 1.3 ^{Ca}	57.5 \pm 0.9 ^{Ca}	55.9 \pm 1.1 ^{Cab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 8. Média \pm SE do parâmetro velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$, VSL) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	18.1 \pm 0.3 ^{Bab}	17.4 \pm 0.3 ^{Ab}	18.4 \pm 0.4 ^{ABab}	18.9 \pm 0.3 ^{Aa}	18.5 \pm 0.4 ^{Aa}
6%	19.0 \pm 0.4 ^{Aab}	18.0 \pm 0.4 ^{Ab}	19.6 \pm 0.4 ^{Aa}	19.2 \pm 0.4 ^{Aa}	18.8 \pm 0.4 ^{Aab}
9%	17.3 \pm 0.3 ^{Bab}	17.3 \pm 0.4 ^{Aab}	18.3 \pm 0.4 ^{Ba}	17.6 \pm 0.4 ^{Bab}	17.1 \pm 0.5 ^{Bb}
12%	15.8 \pm 0.2 ^{Cab}	15.3 \pm 0.4 ^{Bb}	16.7 \pm 0.6 ^{Ca}	15.8 \pm 0.3 ^{Cab}	16.1 \pm 0.5 ^{Bab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 9. Média \pm SE do parâmetro Deslocamento lateral de cabeça (μm , ALH) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	2.42 \pm 0.03 ^{Aa}	2.42 \pm 0.03 ^{Aa}	2.49 \pm 0.04 ^{Ba}	2.51 \pm 0.03 ^{Aa}	2.48 \pm 0.03 ^{Aa}
6%	2.60 \pm 0.04 ^{Aab}	2.48 \pm 0.04 ^{Ac}	2.65 \pm 0.03 ^{Aa}	2.51 \pm 0.03 ^{Abc}	2.46 \pm 0.03 ^{Ac}
9%	2.43 \pm 0.03 ^{Aa}	2.42 \pm 0.03 ^{Aa}	2.45 \pm 0.04 ^{Ba}	2.42 \pm 0.03 ^{Ba}	2.39 \pm 0.05 ^{Aa}
12%	2.29 \pm 0.03 ^{Ba}	2.18 \pm 0.04 ^{Bb}	2.34 \pm 0.04 ^{Ca}	2.28 \pm 0.03 ^{Ca}	2.27 \pm 0.04 ^{Bab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 10. Média \pm SE do parâmetro frequência de batimento cruzado (μm , BCF) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

BCF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	23.0 \pm 0.3 ^{Aab}	22.1 \pm 0.3 ^{Bb}	22.8 \pm 0.3 ^{Bab}	23.2 \pm 0.3 ^{Aa}	22.5 \pm 0.3 ^{Aab}
6%	22.8 \pm 0.3 ^{Ab}	23.1 \pm 0.3 ^{Ab}	23.9 \pm 0.2 ^{Aa}	22.8 \pm 0.3 ^{ABb}	22.7 \pm 0.3 ^{Ab}
9%	22.3 \pm 0.3 ^{Aa}	22.1 \pm 0.3 ^{Ba}	22.1 \pm 0.2 ^{Ba}	22.1 \pm 0.3 ^{BCa}	21.9 \pm 0.4 ^{Aa}
12%	20.1 \pm 0.3 ^{Ab}	21.0 \pm 0.4 ^{Cab}	22.0 \pm 0.5 ^{Ba}	21.7 \pm 0.3 ^{Cab}	21.9 \pm 0.4 ^{Aa}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 11. Média \pm SE do parâmetro retilinearidade (% , STR) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	0.501 \pm 0,006 ^{ABa}	0.494 \pm 0,005 ^{Aa}	0.494 \pm 0.006 ^{ABa}	0.506 \pm 0.006 ^{Aa}	0.505 \pm 0.006 ^{Aa}
6%	0.509 \pm 0,003 ^{Aa}	0.489 \pm 0.006. ^{Ab}	0.485 \pm 0.006 ^{Bb}	0.500 \pm 0.006 ^{Aab}	0.516 \pm 0.006 ^{Aa}
9%	0.494 \pm 0,007 ^{ABab}	0.483 \pm 0.006 ^{Ab}	0.507 \pm 0.006 ^{Aa}	0.496 \pm 0.007 ^{Aab}	0.503 \pm 0.007 ^{Aa}
12%	0.487 \pm 0,005 ^{Bab}	0.495 \pm 0.007 ^{Aab}	0.501 \pm 0.008 ^{ABa}	0.479 \pm 0.006 ^{Bb}	0.498 \pm 0.007 ^{Aa}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 12. Média \pm SE do parâmetro wobble – oscilação ($\mu\text{m/s}$, WOB) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	0.578 \pm 0.005 ^{Aa}	0.576 \pm 0.004 ^{ABab}	0.576 \pm 0.002 ^{Aab}	0.564 \pm 0.003 ^{Ab}	0.574 \pm 0.004 ^{Aab}
6%	0.558 \pm 0.004 ^{Bc}	0.565 \pm 0.004 ^{Bbc}	0.567 \pm 0.003 ^{Abc}	0.572 \pm 0.003 ^{Aab}	0.578 \pm 0.004 ^{Aa}
9%	0.569 \pm 0.004 ^{ABa}	0.578 \pm 0.004 ^{Aa}	0.565 \pm 0.004 ^{Aa}	0.573 \pm 0.004 ^{Aa}	0.566 \pm 0.006 ^{Aa}
12%	0.561 \pm 0.005 ^{Ba}	0.565 \pm 0.004 ^{Ba}	0.564 \pm 0.005 ^{Aa}	0.568 \pm 0.004 ^{Aa}	0.569 \pm 0.005 ^{Aa}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD ($P < 0.05$).

Tabela 13. Média \pm SE do parâmetro linearidade (LIN, %) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	0.291 \pm 0.005 ^{Aa}	0.285 \pm 0.004 ^{Aa}	0.286 \pm 0.004 ^{Aa}	0.286 \pm 0.004 ^{Aa}	0.290 \pm 0.004 ^{Aba}
6%	0.284 \pm 0.004 ^{ABb}	0.277 \pm 0.004 ^{Ab}	0.276 \pm 0.004 ^{Ab}	0.287 \pm 0.004 ^{Aab}	0.298 \pm 0.004 ^{Aa}
9%	0.282 \pm 0.005 ^{ABa}	0.280 \pm 0.005 ^{Aa}	0.287 \pm 0.004 ^{Aa}	0.286 \pm 0.005 ^{Aa}	0.286 \pm 0.005 ^{Aba}
12%	0.273 \pm 0.004 ^{Ba}	0.280 \pm 0.004 ^{Aa}	0.283 \pm 0.006 ^{Aa}	0.272 \pm 0.004 ^{Ba}	0.283 \pm 0.004 ^{Ba}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 14. Médias \pm SE do parâmetro celular rompimento espermático pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	61.7 \pm 3.3 ^{Aa}	53.5 \pm 2.2 ^{Ab}	57.4 \pm 2.4 ^{Aab}	51.0 \pm 3.0 ^{Ab}	52.9 \pm 2.2 ^{Ab}
6%	55.0 \pm 2.2 ^{ABa}	49.8 \pm 2.5 ^{ABab}	50.8 \pm 2.3 ^{ABab}	42.8 \pm 2.3 ^{BCc}	47.2 \pm 2.0 ^{Abc}
9%	52.9 \pm 2.3 ^{Ba}	46.5 \pm 2.8 ^{BCab}	47.9 \pm 2.9 ^{BCab}	46.6 \pm 2.1 ^{ABab}	45.9 \pm 3.5 ^{Ab}
12%	48.6 \pm 2.5 ^{Ba}	39.2 \pm 3.6 ^{Cab}	42.3 \pm 2.6 ^{Cab}	38.9 \pm 2.2 ^{Cb}	46.1 \pm 4.0 ^{Aab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 15. Médias \pm SEdo parâmetro celular funcionalidade de membrana espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	66.5 \pm 4.5 ^{Bbc}	71.1 \pm 2.2 ^{Ab}	81.2 \pm 1.8 ^{Aa}	59.1 \pm 4.3 ^{Ac}	73.6 \pm 3.0 ^{Aab}
6%	83.4 \pm 1.1 ^{Aa}	77.6 \pm 2.3 ^{Aab}	80.9 \pm 1.4 ^{Aab}	67.2 \pm 4.6 ^{Ac}	74.7 \pm 2.1 ^{Ab}
9%	83.0 \pm 1.9 ^{Aa}	72.8 \pm 2.9 ^{Ab}	77.3 \pm 2.7 ^{Aab}	70.3 \pm 4.6 ^{Ab}	75.3 \pm 3.1 ^{Aab}
12%	85.6 \pm 1.4 ^{Aa}	68.0 \pm 3.8 ^{Ab}	81.7 \pm 2.2 ^{Aa}	71.4 \pm 5.0 ^{Ab}	70.1 \pm 4.5 ^{Ab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 16. Médias \pm SE do parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de todos os espermatozoides pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	5661 \pm 615 ^{Ab}	5142 \pm 294 ^{Ab}	8883 \pm 846 ^{Bb}	11023 \pm 1134 ^{Ab}	36437 \pm 15126 ^{Aa}
6%	6818 \pm 568 ^{Ab}	5471 \pm 335 ^{Ab}	9700 \pm 1111 ^{ABb}	9967 \pm 795 ^{ABb}	30502 \pm 11892 ^{Aa}
9%	5847 \pm 485 ^{Ab}	5745 \pm 334 ^{Ab}	13443 \pm 2096 ^{Aab}	9004 \pm 668 ^{ABb}	25242 \pm 10107 ^{Aa}
12%	5933 \pm 413 ^{Ab}	5480 \pm 423 ^{Ab}	11745 \pm 1658 ^{ABb}	7720 \pm 546 ^{Bb}	25500 \pm 10347 ^{Aa}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 17. Médias \pm SEdo parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides viáveis pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	7379 \pm 1068 ^{Ab}	5677 \pm 411 ^{Ab}	9224 \pm 702 ^{Bb}	9247 \pm 553 ^{Ab}	29989 \pm 9964 ^{Aa}
6%	7759 \pm 724 ^{Ab}	6455 \pm 506 ^{Ab}	10015 \pm 914 ^{ABb}	11431 \pm 845 ^{Ab}	22280 \pm 7675 ^{Aa}
9%	6341 \pm 528 ^{Ab}	6281 \pm 458 ^{Ab}	13403 \pm 1710 ^{Aab}	10124 \pm 775 ^{Ab}	20116 \pm 6236 ^{Aa}
12%	6486 \pm 450 ^{Ac}	6466 \pm 689 ^{Ac}	12416 \pm 1447 ^{ABa}	9630 \pm 959 ^{Ab}	8433 \pm 811 ^{Abc}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 18. Médias \pm SEdo parâmetro celular LPO espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	33.7 \pm 3.6 ^{Aa}	31.6 \pm 2.1 ^{Aa}	41.5 \pm 4.0 ^{Aa}	33.3 \pm 3.6 ^{Aa}	35.3 \pm 4.0 ^{Aa}
6%	26.6 \pm 3.3 ^{Ac}	30.1 \pm 2.8 ^{Abc}	41.8 \pm 3.4 ^{Aa}	31.2 \pm 2.7 ^{Abc}	38.4 \pm 3.9 ^{Aab}
9%	27.4 \pm 3.4 ^{Ab}	27.7 \pm 3.1 ^{Ab}	34.8 \pm 2.7 ^{Aab}	33.4 \pm 3.5 ^{Aab}	36.0 \pm 3.4 ^{Aa}
12%	28.9 \pm 3.7 ^{Ab}	29.4 \pm 3.1 ^{Aab}	33.3 \pm 3.0 ^{Aab}	31.0 \pm 3.1 ^{Aab}	41.1 \pm 3.7 ^{Aa}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 19. Médias \pm SE do parâmetro celular DFI espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	0.077 \pm 0,002 ^{Aa}	0.072 \pm 0.003 ^{Aa}	0.075 \pm 0,003 ^{Aa}	0.070 \pm 0,004 ^{Aba}	0.075 \pm 0,002 ^{Aa}
6%	0.067 \pm 0,004 ^{Ba}	0.072 \pm 0.003 ^{Aa}	0.066 \pm 0,005 ^{Aa}	0.071 \pm 0,004 ^{Aba}	0.073 \pm 0,003 ^{Aa}
9%	0.071 \pm 0,004 ^{ABa}	0.068 \pm 0.005 ^{Aa}	0.052 \pm 0.006 ^{Bb}	0.066 \pm 0,004 ^{Ba}	0.070 \pm 0,004 ^{Aa}
12%	0.070 \pm 0.004 ^{ABab}	0.070 \pm 0.004 ^{Aab}	0.064 \pm 0.005 ^{ABb}	0.076 \pm 0,002 ^{Aa}	0.071 \pm 0,003 ^{Aab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

Tabela 20. Médias \pm SEdo parâmetro celular funcionalidade de mitocôndria espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de DMF e diferentes períodos de exposição.

DMF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	66.7 \pm 3.0 ^{Aa}	51.6 \pm 5.4 ^{Ab}	60.2 \pm 3.5 ^{Aab}	58.9 \pm 3.0 ^{Aab}	60.4 \pm 4.2 ^{Aab}
6%	68.1 \pm 4.7 ^{Aa}	60.2 \pm 5.0 ^{Aab}	55.6 \pm 4.1 ^{Ab}	61.0 \pm 3.0 ^{Aab}	67.3 \pm 3.7 ^{Aa}
9%	73.9 \pm 3.3 ^{Aa}	44.3 \pm 5.8 ^{Ac}	62.4 \pm 3.3 ^{Ab}	56.5 \pm 3.7 ^{Ab}	63.2 \pm 3.0 ^{Ab}
12%	69.6 \pm 4.1 ^{Aa}	47.4 \pm 5.4 ^{Ac}	57.2 \pm 3.0 ^{Abc}	55.3 \pm 4.2 ^{Abc}	61.6 \pm 4.4 ^{Aab}

^{AB} Letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05). ^{ab} Letras distintas na mesma linha apresentam diferença estatística a partir do teste LSD (P<0.05).

3 Considerações Finais

Durante a criopreservação as células espermáticas são expostas a condições adversas que reduzem sua viabilidade pós-descongelamento, sendo necessário um protocolo de criopreservação específico para cada espécie, a fim de minimizar os efeitos deletérios decorrentes do processo de congelamento e descongelamento.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a adição de 6% de DMF por um período de 5 minutos foi o ponto de intersecção entre uma boa proteção da membrana plasmática e uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio.

Espera-se que com esses dados seja possível aperfeiçoar os protocolos de criopreservação para essa espécie, visando futuramente a utilização desta técnica a nível comercial e industrial.

Referências

ABOUELEZZ, F. M. K.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; ESTESO, M. C.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; CAMPO, J. L.; SANTIAGO-MORENO, J. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. **Reproduction in domestic animals**, v.50, n.1, p.135-141, 2015.

ABOUELEZZ, F. M. K.; SAYED, M. A. M.; SANTIAGO-MORENO, J. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. **Animal reproduction science**, v.184, p.228-234, 2017.

ALVES, J. P.; CORCINI, C. D.; SILVA, E. F.; CALDAS, J. S.; CARDOSO, T. F.; PIEDRAS, S. R. N.; JARDIM, R. D.; VARELA, A. S. JUNIOR. The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes bonariensis*. **Cryobiology**, v.73, n.3, p.383-387, 2016.

BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1682–1699, 2012.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E. M.; ROSA ULGUIM, R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D. C.; CORRÊA, E .K.; LUCIA, T. JR.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.69, p. 632–638. 2008

BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; GRASSEAU, I.; LIMOUZIN, C.; BESNARD, J.; GOURICHON, D.; COQUERELLE, G.; RAULT, P.; TIXIER-BOICHARD, M. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. **Poultry science**, v.86, n.3, p.555-564, 2007.

BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v.16, n.1, p. 19-24, 1937.

CHUAYCHU-NOO, N.; THANANURAK, P.; CHANKITISAKUL, V.; VONGPRALUB, T. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. **Cryobiology**, v.74, p.8-12, 2017.

EL-BADRY, D. A.; MOHAMED, R. H.; EL-METWALLY, H. A.; ABO AL-NAGA, T. R. The effect of some cryoprotectants on dromedary camel frozen-thawed semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.3, p.522-525, 2017.

GIBB, Z.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, n.7, p.1027-1033, 2013.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.445-457, 2005.

GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **Animal**, v.11, n.11, p.1975-1982, 2017.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMES-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCE, E.; MERCADO, E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.109– 116, 2012.

IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; PINA ROSATO, M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. **Theriogenology**, v.78, p.1381–1389, 2012.

LAKE, P. E. Studies on the dilution and storage of fowl semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, n.1, p.30-35, 1960.

LONG, J.A. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? **Poultry Science**, v.85, n.2, p. 232–236, 2006.

MADEDDU, M.; MOSCA, F.; ABDEL SAYED, A.; ZANIBONI, L.; MANGIAGALLI, M. G.; COLOMBO, E.; CEROLINI, S. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. **Animal reproduction science**, v.171, p.58-64, 2016.

MIRANDA, M.; KULÍKOVÁ, B.; VAŠÍČEK, J.; OLEXIKOVÁ, L.; IAFFALDANO, N.; CHRENEK, P. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.1, p.93-100, 2018.

MOSCA, F.; MADEDDU, M.; SAYED, A. A.; ZANIBONI, L.; IAFFALDANO, N.; CEROLINI, S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v.73, n.3, p.343-347, 2016.

OLDENHOF, H.; BIGALK, J.; HETTEL, C.; DE OLIVEIRA BARROS, L.; SYDYKOV, B.; BAJCSY, Á. C.; SIEME, H.; WOLKERS, W. F. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. **Biopreservation and biobanking**, v.15, n.5, p.422-431, 2017.

PARTYKA, A.; NIZANSKI, W.; ŁUKASZEWICS, E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, v.74, n.6, p.1019-1027, 2010.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1497-1504, 2012.

PUKAZHENTHI, B. S.; JOHNSON, A.; GUTHRIE, H. D.; SONGSASEN, N.; PADILLA, L. R.; WOLFE, B. A.; COUTINHO DA SILVA, M.; ALVARENGA, M. A.; WILDT, D. E. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). **Cryobiology**, v.68, n.2, p.205-214, 2014.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, n.3, p.215-225, 2006.

RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; AKHTER, S.; ZAFAR, Z.; NASEER, A.; HUSSAIN, I.; SANTIAGO-MORENO, J.; BLESBOIS, E. Dimethyleacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. **Theriogenology**, v.103, p.83-89, 2017.

SANTIAGO-MORENO, J.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; COLOMA, M. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; PRIETO, M. T.; CAMPO, J. L. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. **Poultry science**, v.90, n.9, p.2047-2053, 2011.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal reproduction science**, v.169, p.2-5, 2016.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, n.4, p. 586–590, 1999.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, C. A.; HIEMSTRA, S. J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. **Poultry Science**, v.85, n.2, p.216-222, 2006.

ZANIBONI, L.; CHIARA, C.; MARIA, G.; TERESA, M.G.;SILVIA, C. Pellet cryopreservation for chicken semen: effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. **Theriogenology**, v.82, n.2, p.251–258, 2014.

ZHANDI, M.; ANSARI, M.; ROKNABADI, P.; ZARE SHAHNEH, A.; SHARAFI, M. Orally administered Chrysin improves post-thawed sperm quality and fertility of rooster. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.6, p.1004-1010, 2017.