

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



Tese

Uso de amidas na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti

Pelotas, 2022

Norton Luis Souza Gatti

Uso de amidas na criopreservação seminal de galos

Tese 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 Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G263u Gatti, Norton Luis Souza

Uso de amidas na criopreservação seminal de galos /
Norton Luis Souza Gatti ; Antonio Sergio Varela Junior,
orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas,
2022.

42 f.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de
Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Criopreservação seminal. 2. Amidas. 3.
Dimetilacetamida. 4. Metilformamida. 5. Sêmen. I. Varela
Junior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl,
coorient. III. Título.

CDD : 598.610446

Norton Luis Souza Gatti

Uso de amidas na criopreservação seminal de galos

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

Data da Defesa: 24/10/2022

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Fernando Rutz
PhD em Nutrição de Aves pela Universidade de Kentucky

Prof^a. Dr^a. Denise Calisto Bongalhardo
Doutor em Animal and Poultry Science pela University of Guelph

Prof^a. Dr^a. Eliza Rossi Komninou
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Com o passar da vida aprendemos que os melhores momentos são quando estamos juntos das pessoas que amamos e que a felicidade só é completa quando compartilhada. Não poderia estar mais feliz por proporcionar esta realização a todos que torcem por mim, especialmente meus pais. Ter vocês na minha vida é sinônimo de amor, trabalho, honestidade e direção. Obrigado por acreditarem sempre em mim e investirem no meu futuro.

Agradeço a Fernanda Ide, minha parceira no amor e na vida. Mais de uma década juntos e nossa relação segue evoluindo e tornando minha vida melhor. Agradeço também, a todos familiares e amigos, fundamentais em minha trajetória.

Sempre serei grato ao meu orientador Antonio Sergio e a minha co-orientadora Carine Corcini por confiarem em mim. Aprendi muito com vocês, dentro e fora dos laboratórios.

Agradeço a instituição UFPEL por tudo que me proporcionou, assim como a todos colaboradores que tornaram este lugar tão especial. De professores e colegas ao pessoal da segurança e limpeza, vocês são diferenciados.

Enfim, novos desafios virão e sempre levarei no coração cada um de vocês. Obrigado!

“A pior preguiça é a preguiça mental.”
Massako Takahashi

Resumo

GATTI, Norton Luis Souza. **Uso de amidas na criopreservação seminal de galos.** 2022. 42f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Embora a primeira criopreservação de sêmen tenha ocorrido com sêmen de galo, outras espécies evoluíram mais no uso da técnica. Além do custo inicial com a adequação das instalações e mão de obra para a coleta, processamento e inseminação seminal, o sêmen de galos é mais sensível que o de mamíferos ao processo de criopreservação, resultando em redução de fertilidade. Uma vez que o glicerol, tradicional crioprotetor, apresenta ação contraceptiva no trato reprodutivo da galinha, o uso de crioprotetores alternativos se faz necessário. Para aprimorar os protocolos nesta espécie testamos as amidas dimetilacetamida (DMA) e metilformamida (MF), em diferentes concentrações (3%, 6%, 9% e 12%) no diluente final e equilibradas com o sêmen por diferentes períodos prévios ao congelamento (1 min, 3 min, 5 min, 7 min e 9 min). Após o descongelamento, foi avaliada a cinética espermática com o uso do Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) e características bioquímicas e ultraestruturais através da citometria de fluxo. Ambas as amidas geraram maior proteção à membrana plasmática quando utilizadas em altas concentrações, embora nessas concentrações a motilidade tenha sido reduzida. Cada amida agiu de acordo com suas características físico-químicas e as condições nas quais se obteve maior motilidade com o menor dano celular aparente foram DMA 6% com 3 minutos de equilíbrio com o sêmen e MF 3% com 3 a 7 minutos de equilíbrio.

Palavras-chave: criopreservação seminal; amidas; dimetilacetamida; metilformamida; sêmen; galo

Abstract

GATTI, Norton Luis Souza. **Use of amides in rooster semen cryopreservation.** 2022. 42f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Although the first semen cryopreservation took place with rooster semen, other species have evolved more in the technique. In addition to the high cost of labor for the collection, processing, and seminal insemination, the semen of roosters is more sensitive than mammals to the cryopreservation process, resulting in reduced fertility. Since glycerol, the main cryoprotectant used in this species, has a contraceptive effect on the female reproductive tract, using alternative cryoprotectants is necessary. To improve the protocols in this species, we tested the amides dimethylacetamide (DMA) and methylformamide (MF) at different concentrations (3%, 6%, 9%, and 12%) in the final extender and balanced with the semen for different periods before freezing (1 min, 3 min, 5 min, 7 min, and 9 min). After thawing, sperm kinetics were evaluated using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and biochemical and ultrastructural characteristics through flow cytometry. Both amides provided greater protection to the plasma membrane when used at high concentrations, although at these concentrations, motility was reduced. Each amide acted according to its physicochemical characteristics, and the most suitable conditions were: DMA 6% with 3 minutes of equilibrium with the semen and MF 3% with 3 to 7 minutes of equilibrium. Under these conditions, the highest motility was obtained with the least cell damage.

Keywords: seminal cryopreservation; amides; dimethylacetamide; methylformamide; sperm; rooster

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1	Mean \pm SE of total sperm motility (%) parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.....	15
Table 2	Mean \pm SE of progressive sperm motility (%) parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.....	15
Table 3	Mean \pm SE of plasma membrane rupture parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.....	15
Table 4	Mean \pm SE of mitochondrial functionality parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.....	16
Table 5	Mean \pm SE of plasma membrane functionality parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.....	16

Artigo 2

Tabela 1	Média \pm SE do parâmetro motilidade total (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	32
Tabela 2	Média \pm SE do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	32

Tabela 3	Média \pm SE do parâmetro celular rompimento espermático pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	33
Tabela 4	Médias \pm SE do parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides viáveis pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	34
Tabela 5	Médias \pm SE do parâmetro celular peroxidação lipídica espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	35
Tabela 6	Médias \pm SE do parâmetro celular funcionalidade mitocondrial espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.....	36

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Artigos.....	12
2.1 Artigo 1.....	12
2.2 Artigo 2.....	18
3 Considerações Finais.....	37
Referências.....	38

1 Introdução

A criopreservação seminal é uma biotécnica que proporciona o armazenamento de sêmen por período indeterminado. Sua utilização na avicultura poderia reduzir custos através da redução do número de machos na propriedade, alimentação e manejo dos mesmos, além de aumentar a difusão do progresso genético (RAKHA et al., 2017). Apesar da utilização comercial de sêmen congelado em algumas espécies de mamíferos, para galos seu uso ainda não se tornou economicamente viável, devido principalmente à redução de fertilidade e à maior sensibilidade seminal à criopreservação (LONG, 2006). Outra dificuldade para a evolução mais rápida da técnica nesta espécie é a grande variação entre protocolos (ABOUELEZZ et al, 2017).

Durante o processo de criopreservação, as células espermáticas são expostas à bruscas mudanças de temperatura, que alteram sua estrutura e função, levando a morte de espermatozoides e outras injúrias sub-letais (VARELA JUNIOR et al., 2009; PINI et al., 2018). O uso de agentes crioprotetores minimiza o estresse celular e evita parcialmente a perda de viabilidade do sêmen descongelado (SIEME et al., 2016; HOLT, 2000). A concentração do crioprotetor é importante para garantir sua ação crioprotetora sem tornar-se tóxico, como ocorre quando se utiliza altas concentrações (SIEME et al., 2016). Já o período de equilíbrio, é o tempo necessário para que o crioprotetor consiga penetrar na célula espermática, e varia de acordo com a espécie animal e com o tipo e concentração do crioprotetor. (IAFFALDANO et al., 2012).

Os crioprotetores mais utilizados para a criopreservação seminal de galos são: glicerol e dimetilacetamida (DMA) (WOELDERS et al., 2006; BLESBOIS 2007). Embora seja um tradicional crioprotetor, o glicerol apresenta efeito contraceptivo no trato reprodutivo da galinha, sendo necessário sua remoção posterior ao descongelamento, reduzindo a viabilidade do sêmen (PURDY et al., 2009). A DMA, assim como as outras amidas, não possui ação tóxica no trato reprodutivo da fêmea, não sendo necessária sua remoção após o descongelamento, embora possa

apresentar efeitos citotóxicos principalmente durante o contato inicial com o sêmen (BLESBLOIS & BRILLARD, 2007). Amidas são compostos orgânicos, com um grupo funcional amina, que interage com o hidrogênio da água promovendo a formação de uma geleificação intracelular, ao invés de cristais de gelo (BIANCHI et al., 2008). Além disso, por possuírem menor peso molecular e viscosidade que o glicerol, amidas têm maior permeabilidade à membrana, reduzindo as injúrias celulares causadas pelo estresse osmótico (BALL et al., 2001). Na criopreservação seminal de galos, a DMA é a amida mais utilizada e a que apresenta os melhores resultados (BLESBOIS & BRILLARD, 2007). Outra amida utilizada com sucesso na criopreservação seminal de outras espécies é a metilformamida (MF), embora com galos, seu uso tenha ocorrido apenas na década de 80 (FUTINO et al., 2010; VARELA JUNIOR et al., 2012; TERADA et al., 1988). Uma vez que a MF possui peso molecular ainda menor que a DMA, seu uso poderia resultar em menor estresse osmótico para as células espermáticas (BIANCHI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos das amidas, DMA e MF, no congelamento seminal de galos, quanto à concentração utilizada (3%, 6%, 9% e 12%) e ao período de contato com o sêmen prévio ao congelamento (1 min, 3 min, 5 min, 7 min e 9 min). Para analisar o sêmen descongelado em relação às características cinéticas foi utilizado o Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), e para examinar o efeito dos tratamentos quanto à bioquímica e a ultraestrutura celular foi utilizado o citometro de fluxo, avaliando ruptura de membrana plasmática, peroxidação lipídica (LPO), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e funcionalidade mitocondrial.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Dimethylacetamide in rooster semen cryopreservation

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

Aceito para publicação na revista Cryo Letters, v. 42, n. 1, p.39-43, 2021

Dimethylacetamide in Rooster Semen Cryopreservation

Norton Luis Souza Gatti ¹, Carine Dahl Corcini ^{2*}, Jorge Squeff Filho ¹; Sara Lorandi Soares ³; Andréia Nobre Ancuti ¹, Rafael Mielke Barbosa ¹, Nathália Wacholz Knabah ¹, Amauri Telles Tavares ⁴, Denise Calisto Bongalhardo ⁵, Antonio Sergio Varela Junior ⁶

¹ Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária; ² Departamento de Patologia Animal, Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária; ³ Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de desenvolvimento tecnológico CDTEC/Biotecnologia; ⁴ Graduação em Zootecnia Bacharelado; ⁵ Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas; ⁶ Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brasil.

*Corresponding author: antoniovarela@furg.br (A.S. Varela Junior).

Abstract

BACKGROUND: Sperm cryopreservation of cocks is a significant challenge, and so far, there is no adequate information to enable the commercial use of frozen semen. **OBJECTIVE:** To test the toxicity of dimethylacetamide (DMA). **MATERIALS AND METHODS:** DMA was added at 3%, 6%, 9% and 12% to the freezing diluent and maintained for equilibration with the semen sample for 1 min, 3 min, 5 min, 7 min, and 9 min before freezing. Thawed semen was evaluated for kinetic characteristics by computer-assisted semen analysis (CASA) and structural and functional properties by flow cytometry (plasma membrane rupture, mitochondrial functionality, and plasma membrane functionality). **RESULTS and CONCLUSION:** The addition of 6% DMA for 3-min equilibration resulted in the highest total and progressive motility, 42.0%, and 36.9%, respectively. The point of intersection between good protection and low plasma membrane rupture was obtained with the addition of 6% of DMA for 3-min equilibration with the rooster semen.

Keywords: Amides, rooster sperm, cryopreservation.

INTRODUCTION

Although the first major step in seminal cryopreservation was the discovery of glycerol's cryoprotective properties in freezing rooster semen (12), improving the technique in this species and commercial use remains a challenge for researchers. Sperm cells differ in many ways, justifying the need for specific protocols that meet the unique characteristics of the species' spermatozoa (2, 10). Roosters have filiform spermatozoa, with narrow and long heads and smaller volumes than mammals, being generally more sensitive to the freezing process (14, 15). Cryopreservation is highly stressful for sperm cells, leading to structural and functional changes (26), which can cause the death of some spermatozoa and sub-lethal damage, compromising their full function (22).

Cryoprotectants are necessary to minimize cellular damage; however, they are toxic to cells when used in high concentrations (25).

The most suitable cryoprotectants in the sperm cryopreservation of cocks are glycerol and dimethylacetamide (DMA) (4, 27). Glycerol has contraceptive action on the reproductive tract of chickens and therefore needs to be removed before artificial insemination through a process that reduces semen viability (9). Although DMA does not need to be removed before insemination, a reported disadvantage is its cytotoxic effects on avian spermatozoa (5), mainly during initial contact between the spermatozoa and cryoprotectant and during post-thaw processing (18, 23). The amides have lower viscosity and molecular weight than

glycerol, which would decrease the intensity of osmotic stress experienced by sperm cells (3).

When adding a cryoprotective agent to the diluted semen, it takes time to penetrate cells (equilibration), which varies according to the animal species and nature and concentration of the cryoprotectant (11). Therefore, in addition to concentration, adequate equilibration time with semen is an essential variable for the effectiveness without causing toxicity to sperm cells. The objective of this study was to determine the best conditions for the use of DMA in the seminal cryopreservation of roosters by testing the addition of different concentrations of this cryoprotectant in different periods of equilibrium with the semen before freezing.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty-four roosters of the Embrapa 051 line (semi-heavy roosters), sexually mature (26-30 weeks of age), were raised and kept in the Central Biotério of the Federal University of Pelotas. The roosters were housed individually in cages and kept at 20-24 degrees under a 12h light - 12h dark photoperiod. Commercial feed was supplied at 140g daily and water ad libitum.

Semen collection and dilution

Semen collection was performed twice weekly by the dorsal-abdominal massage method (6) and the semen was obtained through a graduated plastic tube and diluted 1:1 with the Lake diluents (13). The Lake diluent was used for cooling and freezing with each liter composition: 10g fructose, 0.68g magnesium chloride, 1.28g tribasic potassium citrate, 5.13 sodium acetate, and 21.25 g monosodium glutamate. DMA was added to the diluent before freezing.

Selection of ejaculates and pooling

Aliquots of each ejaculate were removed to verify motility and concentration. For motility evaluation, 5µl of semen were placed on a slide, covered with a coverslip, and analyzed in a 200x magnification phase contrast microscope (BX 41 Olympus America, Inc., São Paulo, SP, Brazil). Ejaculated with 80% motility or more were used for pooling, and the concentration was estimated using a spectrophotometer at a wavelength of 450nm. Those with the highest motility were chosen of the ejaculates collected on the day,

and pooling were made to obtain sufficient sample volume for analysis. After the pool was formed, the volume of diluent was adjusted to reach the concentration of 800×10^6 sperm/ml. The semen was kept in a Styrofoam box with synthetic ice from the collection.

Freezing protocol

The pools were taken to the cold room for stabilization and kept at 5°C for 2 hours. Aliquots of each pool (125µl) were diluted 1:1 with the respective treatments (Lake diluent at twice the final amide concentration used) and immediately stored in 0.25ml straws, reaching the final concentration of 400×10^6 sperm/ml. The semen remained in contact with the treatment by the established exposure period (1, 3, 5, 7, or 9min) and then placed in the nitrogen vapor 3cm above liquid nitrogen for 7 min. Afterwards, the straws were dipped in liquid nitrogen and stored for at least 2 months.

Thawing and dilution

Straws were thawed in a water bath with shaking at 37°C for 20s. For the dilution of the thawed samples, the Lake diluent was added with bovine serum albumin (BSA) 3mg/ml, and 40µl of thawed semen was diluted in 200µl of Lake with BSA.

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

After thawing, a 5µl aliquot was placed between the slide and coverslip to estimate motility and other kinetic characteristics of spermatozoa using the Androvision® - CASA Software system with computer and monitor (Minitube). The parameters evaluated were total and progressive (%) motility.

Flow cytometry

The analysis was performed by a flow cytometer, Attune acoustic focusing cytometer (Applied Biosystems) equipped with BL1 photodetector (filter 530/30) for rhodamine 123 (mitochondria functionality). Red fluorescence of propidium iodide (membrane integrity) was detected by a BL3 photodetector (640LP filter). To measure sperm populations, cells were stained with Hoescht 33342 and detected by a VL1 photodetector (450/40 filter), while non-sperm counts were eliminated based on scatter plots. A total of 20,000 cells per sample were analyzed at a flow rate of 500 cells/sec.

Preparation of samples: For each evaluation, 10µl of the sample was used and the respective fluorescent probe was added,

remaining in a dry bath at 37°C for 10 minutes. Subsequently, 20µl of Hoescht's solution (10mg/ml) was added and held for 1 minute in contact with the sample to determine the sperm population and specific fluorescence colors and then analyzed.

Membrane integrity: Fluorescence probes of propidium iodide (PI) and SYBER-14 were used. Cells with damaged membranes allow the entry of PI that penetrates the cell's nucleus. In contrast, SYBER-14 penetrates the spermatozoa and is converted into a non-permeable fluorescent compound retained in the cytoplasm. Thus, spermatozoa marked only with SYBER-14 had intact plasma membranes.

Mitochondrial function: Mitochondria were stained with rhodamine 123. Spermatozoa with slight green fluorescence were considered to have low mitochondrial activity, and those stained intensely with green fluorescence had high mitochondrial activity.

Statistical Analysis

All variables were analyzed using the Shapiro-Wilk test. Data were transformed if originally not present in normal distribution. Analysis of variance (ANOVA) was used with subsequent mean comparison by LSD test. Statistix 10 was used (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). The significance level to all values was $P < 0.05$.

RESULTS

The treatment that presented the best total and progressive sperm motility (Tables 1 and 2) was from 6% DMA to the freezing diluent for 3-min exposure to semen.

Plasma membrane rupture (Table 3) is lower at higher DMA concentrations and for longer exposure. This becomes clear, when we consider the means of concentration independent of time or exposure period independent of concentration. The mean plasma membrane

Table 1. Mean \pm SE of total sperm motility (%) parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.

DMA	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	34.2 \pm 1.4 ^{ABab}	35.9 \pm 1.2 ^{Bab}	32.7 \pm 1.0 ^{Bb}	34.3 \pm 1.3 ^{Aab}	37.2 \pm 1.3 ^{Aa}
6%	37.2 \pm 1.1 ^{Ab}	42.0 \pm 0.7 ^{Aa}	35.9 \pm 1.1 ^{Ab}	32.1 \pm 0.8 ^{Ac}	34.3 \pm 1.3 ^{Abc}
9%	34.6 \pm 0.9 ^{ABa}	32.4 \pm 1.3 ^{Ca}	34.0 \pm 0.9 ^{ABa}	33.5 \pm 1.3 ^{Aa}	34.8 \pm 1.2 ^{Aa}
12%	32.4 \pm 0.8 ^{Ba}	26.8 \pm 1.0 ^{Db}	28.0 \pm 0.7 ^{Cb}	27.5 \pm 1.0 ^{Bb}	27.2 \pm 0.8 ^{Bb}

^{AB} Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

^{ab} Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

Table 2. Mean \pm SE of progressive sperm motility (%) parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.

DMA	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	30.1 \pm 1.3 ^{Aab}	30.9 \pm 1.2 ^{Bab}	28.2 \pm 0.9 ^{Bb}	29.8 \pm 1.2 ^{Aab}	32.9 \pm 1.2 ^{Aa}
6%	32.5 \pm 1.0 ^{Ab}	36.9 \pm 0.7 ^{Aa}	31.3 \pm 1.0 ^{Ab}	28.0 \pm 0.8 ^{Ac}	29.8 \pm 1.2 ^{Abc}
9%	29.9 \pm 0.8 ^{ABa}	28.4 \pm 1.2 ^{Ba}	29.5 \pm 0.9 ^{ABa}	29.0 \pm 1.2 ^{Aa}	30.0 \pm 1.1 ^{Aa}
12%	27.2 \pm 0.7 ^{Ba}	22.0 \pm 0.8 ^{Cb}	23.2 \pm 0.7 ^{Cb}	23.3 \pm 0.9 ^{Bb}	22.8 \pm 0.8 ^{Bb}

^{AB} Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

^{ab} Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

Table 3. Mean \pm SE of plasma membrane rupture parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.

DMA	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	58.4 \pm 3.7 ^{Aa}	54.4 \pm 4.9 ^{Aa}	56.4 \pm 5.5 ^{Aa}	57.2 \pm 3.7 ^{Aa}	46.7 \pm 4.1 ^{Aa}
6%	53.7 \pm 3.6 ^{Aa}	45.2 \pm 4.2 ^{Aa}	47.5 \pm 4.7 ^{Aa}	48.5 \pm 2.4 ^{Aa}	46.2 \pm 2.3 ^{Aa}
9%	55.1 \pm 3.3 ^{Aa}	41.8 \pm 5.0 ^{Ab}	49.1 \pm 3.4 ^{Aab}	50.3 \pm 3.1 ^{Aab}	50.4 \pm 3.6 ^{Aab}
12%	50.7 \pm 3.7 ^{Aa}	46.0 \pm 4.6 ^{Aab}	47.4 \pm 3.5 ^{Aab}	38.2 \pm 4.3 ^{Bb}	46.6 \pm 3.2 ^{Aab}

^{AB} Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

^{ab} Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis ($P < 0.05$).

rupture at different concentrations was 3% - 54.6, 6% - 48.2, 9% - 49.3 and 12% - 45.8 and in different exposure periods were 1min - 54.5, 3 min - 46.9, 5 min - 50.1, 7 min - 48.6 and 9 min - 47.5. However, for mitochondrial functionality (Table 4), shorter periods of exposure resulted in greater mitochondrial functionality. This is evident when we analyzed the means of the exposure time regardless of the concentration used, which were 1min - 71.3, 3min - 58.6, 5min - 53.6, 7min - 52.3, and 9min - 55.9. For the plasma membrane functionality (Table 5), the exposure period of 1 min at concentrations of 3%, 6%, and 9% was higher than the other treatments. However, at the concentration of 12%, there was no statistical difference between the exposure periods.

DISCUSSION

The study evaluated DMA concentrations at 3%, 6%, 9% and 12% for different exposure times to semen (1, 3, 5, 7 and 9 min) as a factor in seminal cryopreservation of cocks on kinetic, structural and biochemical parameters of the cock semen. Although DMA has been widely used in sperm cryopreservation of roosters (16,17, 19, 21), the significant variability in the conditions used prevented the definition of how this cryoprotectant should be used.

Recently, 6% DMA was used for 45-min equilibration in freezing rooster semen (17),

resulting in progressive motility of less than 18%, according to our data, possibly due to the high contact time of spermatozoa with DMA that should be harmful to cellular integrity.

Flow cytometry is an excellent tool for the evaluating the of structures and biochemistry of sperm cells. It allows the assesment of thousands of cells in a few seconds, the integration of several tests with high reproducibility, and an approach that facilitates a better understanding of the functions of spermatozoa and uncovers how treatments act inside cells (8). In a previous study with the use of 6% DMA in freezing of Spanish chicken semen, lower membrane integrity was obtained with only 1-min equilibrium in relation to 30-min exposure (24), corroborating the hypothesis that a period of equilibrium as short as 1 min is not enough to prevent spermatic membrane rupture. By analyzing only the effect of the 1-min exposure to DMA at different concentrations, it is possible to infer that despite the greater functionality of plasma membrane (evaluated in viable cells) and mitochondrial functionality, this short period of exposure was unable to avoid rupture of cells, perhaps because it does not allow adequate dehydration and does not prevent intracellular ice formation. Although flow cytometry makes it possible to perform physical and functional analysis (21), the technique is seldom used in the seminal assesment of roosters. The production of more studies that use flow

Table 4. Mean \pm SE of mitochondrial functionality parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.

DMA	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	70.4 \pm 4.1 ^{Aa}	57.1 \pm 4.0 ^{Bbc}	40.8 \pm 5.3 ^{Bd}	48.7 \pm 3.3 ^{AcD}	61.9 \pm 3.5 ^{Ab}
6%	74.6 \pm 3.9 ^{Aa}	50.9 \pm 6.1 ^{Bb}	54.1 \pm 4.5 ^{ABb}	58.4 \pm 4.9 ^{Ab}	56.8 \pm 5.5 ^{Ab}
9%	74.4 \pm 3.6 ^{Aa}	71.5 \pm 2.8 ^{Aa}	61.5 \pm 4.5 ^{Aab}	48.7 \pm 5.4 ^{Ab}	53.8 \pm 7.4 ^{Ab}
12%	65.8 \pm 5.0 ^{Aa}	54.9 \pm 5.0 ^{Bab}	57.9 \pm 4.6 ^{Aab}	53.4 \pm 4.9 ^{Aab}	51.2 \pm 6.3 ^{Ab}

^{AB} Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis (P<0.05).

^{ab} Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis (P<0.05).

Table 5. Mean \pm SE of plasma membrane functionality parameter after thawing using different concentrations of DMA and different exposure periods.

DMA	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	88.1 \pm 1.6 ^{Aa}	62.9 \pm 5.5 ^{Abc}	56.6 \pm 5.9 ^{Cc}	72.4 \pm 4.1 ^{Ab}	62.4 \pm 6.4 ^{Abc}
6%	90.8 \pm 1.0 ^{Aa}	69.5 \pm 4.2 ^{Ab}	64.8 \pm 5.3 ^{BCb}	77.0 \pm 4.0 ^{Ab}	72.1 \pm 5.5 ^{Ab}
9%	89.5 \pm 1.9 ^{Aa}	72.4 \pm 5.5 ^{Ab}	77.5 \pm 3.3 ^{Ab}	69.1 \pm 3.3 ^{Ab}	76.3 \pm 3.6 ^{Ab}
12%	79.2 \pm 4.5 ^{Ba}	66.1 \pm 6.1 ^{Aa}	77.2 \pm 3.2 ^{ABa}	67.8 \pm 5.0 ^{Aa}	68.6 \pm 4.0 ^{Aa}

^{AB} Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis (P<0.05).

^{ab} Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis (P<0.05).

cytometry for the seminal evaluation of roosters will facilitate understanding the sperm alterations that occur in different structures due to cryopreservation. The standardization of studies involving seminal cryopreservation of cocks is crucial to facilitate data comparison, promoting a faster evolution of the technique in this species.

Our data indicate that treatment with 6% DMA for 3-min equilibrium was the most suitable among the conditions tested. In future studies, improving the cryopreservation protocol will likely yield even better results with 6% DMA for 3-min exposure.

Acknowledgements: The work was funded by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel). Antonio Sergio Varela Junior (310327/2018-0) and Carine Dahl Corcini (310203/2018-0) are CNPq research fellows.

REFERENCES

- Alves JP, Corcini CD, Silva, EF, Caldas, JS, Cardoso TF, Piedras, SRN, Jardim RD & Varela AS (2016) *Cryobiol* 73, 383–387
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM & Critser JK (2012) *Theriogenol* 78, 1682–1699
- Bianchi I, Calderam K, Maschio ÉF, Madeira EM, da Rosa Ulguim R, Corcini CD, Bongalharo DC, Corrêa ÉK, Lucia T, Deschamps JC & Corrêa MN (2008) *Theriogenol* 69, 632–638
- Blesbois E (2007) *Worlds Poult Sci J* 63, 213–222
- Blesbois E & Brillard JP (2007) *Anim* 1(10), 1472–1481
- Burrows WH & Quinn JP (1937) *Poult Sci* 16(1), 19–24
- Cerolini S, Zaniboni L, Colombo E, Madeddu M, Abdel Sayed A, Mangiagalli MG & Mosca F (2016) *Anim Reprod Sci* 171, 58–64
- Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C & Pizzi F (2017) *Anim* 11(11), 1975–1982
- Hammerstedt ROYH, Graham JK & Carolina S (1992) *26th Annu Control* 38, 26–38
- Holt WV (2000) *Anim Reprod Sci* 62(1-3), 3-22
- Iaffaldano N, Di Iorio M & Rosato MP (2012) *Theriogenol* 78, 1381–1389
- Kealy TJ & Pauson PL (1951) *Nature Publishing Group Nat* 168, 1039–1040
- Lake PE (2008) *Reprod* 1, 30–35
- Long JA (2006) *Poult Sci* 85, 232–236
- López-Sebastián A, Martínez J, Velázquez R, Goya A, Castaño C, Santiago-Moreno J, Estes M, Villaverde-Morcillo S & Toledano-Díaz A (2016) *Asian J Androl* 18(6), 882–8
- Madeddu M, Berlinguer F, Pasciu V, Succu S, Satta V, Leoni GG, Zinellu A, Muzzeddu M, Carru C & Naitana S (2010) *Theriogenol* 74, 1010–1018
- Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N & Chrenek P (2018) *Reprod Domest Anim* 53, 93–100
- Mocé E, Grasseau I & Blesbois E (2010) *Anim Reprod Sci* 122, 359–366
- Mosca F, Madeddu M, AbdelSayed A, Zaniboni L, Iaffaldano N & Cerolini S (2016) *Cryobiol* 73, 343–347
- Partyka A, Łukaszewicz E & Nizański W (2012) *Theriogenol* 77, 1497–1504
- Partyka A, Nizański W & Łukaszewicz E (2010) *Theriogenol* 74, 1019–1027
- Pini T, Leahy T & de Graaf SP (2018) *Theriogenol* 118, 172–181
- Purdy PH, Song Y, Silversides FG & Blackburn HD (2009) *Poult Sci* 88 :2184–2191
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT & Campo JL (2011) *Poult Sci* 90, 2047–2053
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF, (2016) *Anim Reprod Sci* 169, 2–5
- Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MVF, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia T & Deschamps JC (2009) *Anim Reprod Sci* 115, 323–327
- Woelders H, Zuidberg CA & Hiemstra SJ (2006) *Poult Sci* 85, 216–222

2.2 Artigo 2

Metilformamida na criopreservação seminal de galos

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

Será submetido à revista Andrologia

Metilformamida na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti^{1*}; Carine Dahl Corcini²; Jorge Squeff Filho¹; Sara Lorandi Soares³; Andréia Nobre Anciuti¹; Rafael Mielke Barbosa¹; Nathalia Wacholz Knabah¹; Amauri Telles Tavares⁴; Denise Calisto Bongalhardo⁵; Antonio Sergio Varela Junior⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Brasil.

²Departamento de Patologia Animal, Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Brasil.

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

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

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

⁶Departamento de Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brasil.

Resumo

A busca por crioprotetores eficientes e as condições ideais para seu uso são fundamentais para a otimização dos resultados de criopreservação seminal nas diferentes espécies. O objetivo deste estudo foi determinar as melhores condições de uso da metilformamida (MF) na criopreservação seminal de galos, quanto à concentração utilizada no diluente de congelamento (3%, 6%, 9% e 12%) e também ao tempo de equilíbrio com o sêmen (1 min, 3 min, 5 min, 7 min e 9 min) prévio ao congelamento. Após o descongelamento, características cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas com o CASA (Computer-assisted sperm analysis), e através da citometria de fluxo foram analisadas ruptura da membrana plasmática, produção de espécies reativas de oxigênio, funcionalidade mitocondrial e peroxidação lipídica (LPO). Embora as concentrações de MF 9% e 12% tenham resultado em menor ruptura de membrana, menos células espermáticas móveis foram encontradas em relação a tratamentos com menores concentrações. Os dados apresentados neste estudo sugerem que ao utilizar MF na criopreservação seminal de galos, a concentração de 3% e o tempo de contato

* Correspondence

Norton Luis Souza Gatti, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, Pelotas, RS, 96010-900, Brasil.
Email: nortongatti@hotmail.com

com o sêmen de 3 a 7 minutos, prévios ao congelamento, são as condições mais adequadas para seu uso.

Palavras-chave: CASA, tempo de equilíbrio, citometria de fluxo, metilformamida, criopreservação de sêmen, galo

1. INTRODUÇÃO

Em 1949 a criopreservação de sêmen deu seus primeiros passos com a descoberta da atividade crioprotetora do glicerol, ao ser demonstrado efetivo na criopreservação seminal de galos (Polge et al., 1949). Por diversos motivos como fisiologia, manejo, e características inerentes ao espermatozoide, outras espécies evoluíram mais no desenvolvimento de protocolos de criopreservação seminal. Apenas nos anos 90 surgiram métodos eficientes para realizar o processo em galos (Tselutin et al., 1999; Challah et al., 1999), e até hoje, a falta de padronização de todo processo de criopreservação resulta em grande variação nos resultados encontrados (Zaniboni et al., 2014).

O uso de um agente crioprotetor adequado, na concentração e tempo de equilíbrio apropriados a cada espécie é primordial para o sucesso na criopreservação seminal. Um crioprotetor em alta concentração pode ser tóxico para as células e em baixa concentração pode ser insuficiente (Sieme et al., 2016). Também é necessário um certo período de tempo para que o crioprotetor possa permear as células, o chamado tempo de equilíbrio, que se excessivo, poderá determinar ação tóxica do crioprotetor nos espermatozoides (Iaffaldano et al., 2012).

Embora o glicerol seja um crioprotetor amplamente utilizado, apresenta efeitos contraceptivos no trato reprodutivo da galinha, efeito este extremamente indesejável, resultando em diminuição da fertilidade (Tajima et al. 1989; Hammerstedt and Graham, 1992). Como alternativa ao glicerol, muitas amidas foram testadas para o congelamento de sêmen de galos com bons resultados, dentre as quais se destaca a dimetilacetamida (DMA) (Tselutin et al., 1999; Challah et al., 1999). Uma desvantagem do uso de amidas é a citotoxicidade sobre os espermatozoides de galo (Blesbois and Brillard 2007), principalmente durante o contato inicial entre espermatozoide e crioprotetor (Purdy et al. 2009; Mocé et al. 2010).

A metilformamida (MF) possui peso molecular ainda menor que a DMA, podendo teoricamente diminuir a possibilidade de estresse osmótico (Bianchi et al., 2008). Utilizada mais recentemente com bons resultados em outras espécies, como cães (Futino et al., 2010) e

peixes (Varela Junior et al., 2012), a MF foi relatada na criopreservação seminal de galos apenas em trabalhos da década de 80, ou sem informar tempo de equilíbrio com o sêmen ou equilibrado por 10 minutos, todos utilizando congelamento em pellets, com glicose como substrato energético e motilidade avaliada subjetivamente (Terada et al., 1983; Maeda et al., 1984; Terada et al., 1988).

O objetivo deste estudo foi determinar as melhores condições para o uso da MF, como crioprotetor penetrante no congelamento seminal de galos, testando diferentes concentrações desta substância, em fatorial, com diferentes períodos de exposição ao sêmen, prévios ao congelamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta de sêmen

Foram criados e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas quarenta e quatro galos da linhagem Embrapa 051 (galos semi-pesados), sexualmente maduros (26-30 semanas de idade). Alojados individualmente em gaiolas e mantidos a 20-24 graus, sob foto período de 12h luz e 12h de escuro. Era fornecida ração comercial na dose de 140g por dia e água ad libitum. As coletas de sêmen eram realizadas duas vezes por semana pelo método de massagem dorso-abdominal (Burrows, 1937). Para a obtenção do sêmen era utilizado um tubo plástico graduado e diluído 1:1 com o diluente de Lake.

2.2. Diluente, seleção de ejaculados e formação de pools

O diluente de Lake (Lake, 2008) 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 MF no dobro da concentração final respectiva a cada tratamento prévio ao congelamento. 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, cobertos 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. 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 800×10^6 espermatozoides/mL. Desde a coleta, o sêmen era mantido em caixa de isopor.

2.3. Criopreservação seminal

Após a formação dos pools era realizada a estabilização em câmara fria por 2 horas na temperatura de 5°C. De cada pool, eram retiradas alíquotas de 125µL e diluídas 1:1 com os respectivos tratamentos (diluente de Lake com o dobro da concentração final de MF), atingindo a concentração final de 400×10^6 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 por 7 minutos (Gatti, 2021). Após, as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido a -196°C e armazenadas por pelo menos 2 meses. Para o descongelamento, as palhetas eram colocadas em banho-maria com agitação, a 37°C por 20s.

2.4. Análises espermáticas pós-descongelamento

Para a diluição das amostras, era realizada a adição de albumina sérica bovina (BSA) 3mg/mL em diluente de Lake e, eram diluídos 40µL de sêmen descongelado de cada tratamento em 200µL de Lake com BSA. Após, eram realizadas análises cinéticas com o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) e estruturais e bioquímicas através da citometria de fluxo. Para as avaliações as amostras permaneciam na temperatura da sala, que era mantida a 22°C.

2.4.1. CASA – (Computer Assisted Sperm Analysis)

Uma alíquota de 5µL de cada tratamento era colocada entre lâmina e lamínula para estimar a motilidade total e progressiva dos espermatozoides, utilizando o sistema Androvision® - Software CASA, com computador e monitor (Minitube).

2.4.2. Citometria de fluxo

Um citometro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer® (Applied Biosystems) foi utilizado para a realização das análises. O equipamento possuía fotodetector BL3 (640 nm), que detectava a fluorescência vermelha do iodeto de propídeo (integridade de membrana) e fotodetector BL1 (530/30 nm), que detectava o DCF-diclorofluoresceína (espécies reativas de oxigênio) e a rodamina 123 (funcionalidade mitocondrial). Para eliminar debris celulares, as células eram coradas com Hoescht 33342 e detectadas por um fotodetector VL1 (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.

2.4.2.1. Preparação das amostras

Eram utilizados 10µL de amostra para cada avaliação e se fazia a adição de 10 µL da respectiva sonda fluorescente permanecendo em banho seco a 37°C por 10 minutos. Apenas para as análises de ROS e LPO o tempo de banho seco era diferente, sendo de 15 minutos. Na sequência, 20µL de solução de Hoescht 3342 (10mg/mL) era adicionado e mantido por 1 minuto em contato com a amostra, a fim de eliminar os debris da população espermática. Finalmente, mais 500µL de solução salina tamponada (PBS) com EDTA era adicionado imediatamente antes da análise.

2.4.2.2. Ruptura de membrana plasmática

Para esta análise foi utilizada a probe fluorescente iodeto de propídeo (PI). Apenas células com a membrana lesada permitem a entrada de PI, que penetra o núcleo da célula emitindo fluorescência vermelha. Sendo assim, eram considerados com membrana plasmática rompida, espermatozoides marcados com fluorescência vermelha.

2.4.2.3. Peroxidação lipídica (LPO)

O fluoróforo ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadieno)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico (C11-BODIPY) foi 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.

2.4.2.4. 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 2'7'diacetato diclorofluoresceína (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).

2.4.2.5 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. Análises estatísticas

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para a análise de todas as variáveis. 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. 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

3.1 Motilidade

Os dados de motilidade total e progressiva são apresentados, respectivamente, nas tabelas 1 e 2. A concentração de 3% acarretou as maiores motilidades em todos os períodos de equilíbrio, exceto por 1 e 9 minutos, nos quais não diferiu significativamente de 6%. Na concentração de 3%, houve menor motilidade total e progressiva com 1 minuto de equilíbrio ($P < 0.05$), em relação a maiores períodos com a mesma concentração.

3.2 Ruptura de membrana plasmática

Tratamentos com maiores concentrações de MF (9% ou 12%), apresentaram menor ruptura da membrana plasmática (Tabela 3), em relação às concentrações de 3% e 6% em todos tempos de equilíbrio ($P < 0.05$), exceto pelo período de 5 minutos em que a concentração não afetou a ruptura.

3.3 Produção de ROS

Independente do período de equilíbrio utilizado, a produção de ROS (Tabela 4) não diferiu significativamente entre as concentrações testadas. Exceto pelos tratamentos com adição de 12% MF, nos quais o tempo de equilíbrio não afetou a produção de espécies reativas de oxigênio, nas demais concentrações o período de equilíbrio de 9 minutos resultou em maior produção de ROS que o período de 1 minuto ($P < 0.05$).

3.4 Peroxidação lipídica

A concentração de MF não afetou a peroxidação lipídica (Tabela 5), exceto pelos tratamentos que ficaram 1 minuto em equilíbrio com o sêmen, nos quais a concentração de 12% resultou em maior peroxidação que os tratamentos com adição de 6% e 9%, embora sem diferir significativamente da adição de 3%. Nas concentrações de 6% e 9%, houve maior peroxidação lipídica em tratamentos que permaneceram 9 minutos, em relação a 1 minuto em equilíbrio com o sêmen ($P < 0.05$).

3.5 Funcionalidade mitocondrial

Com 5 minutos de equilíbrio, o tratamento com 3% MF resultou em menor funcionalidade mitocondrial (Tabela 6) que 9% e 12%, embora sem diferir significativamente de 6%. Entre as demais concentrações e períodos de equilíbrio testados não houve diferença estatística.

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar, em fatorial, a concentração de MF e o período de equilíbrio com o sêmen na criopreservação seminal de galos. Nossos dados demonstram que tanto a concentração de MF utilizada quanto o tempo de equilíbrio com o sêmen afetam a qualidade do sêmen descongelado. De modo geral, menores concentrações renderam maiores motilidades e maiores concentrações resultaram em maior proteção à membrana plasmática. Quanto ao período de equilíbrio, tratamentos que permaneceram apenas 1 minuto em contato com o sêmen antes do congelamento resultaram em baixas motilidades, independente da concentração e, tratamentos equilibrados por 9 minutos geraram maior produção de espécies reativas de oxigênio independente da concentração utilizada.

A motilidade espermática (Tabela 1 e Tabela 2) foi claramente mais afetada pela concentração de MF utilizada do que pelo período de equilíbrio com o sêmen. Tratamentos com 3% MF estiveram sempre entre as maiores motilidades, independente do tempo de equilíbrio, enquanto 12% MF sempre entre as menores. Nos estudos que avaliaram concentração de MF na criopreservação seminal de galos, os melhores resultados foram com concentrações intermediárias dentre as testadas, 6% ou 9% (Terada et al., 1983) e 10% (Terada et al., 1988), provavelmente por influência de outros fatores relacionados aos protocolos de criopreservação utilizados. Também interessante notar no presente estudo, que em todas as concentrações, o tempo de equilíbrio de 1 minuto resultou entre as menores motilidades, demonstrando que um período tão curto de equilíbrio com o sêmen não proporciona adequada penetração da MF na célula espermática, conseqüentemente comprometendo sua ação crioprotetora.

A membrana plasmática dos espermatozoides é a primeira barreira contra o ambiente externo e, quando lesada, pode levar a uma alteração no ambiente intracelular e disfunção celular. Exceto pelo período de equilíbrio de 5 minutos, no qual não houve diferença estatística entre as concentrações testadas, nos demais períodos, as concentrações de 9% e 12% protegeram melhor a membrana plasmática ao prevenir sua ruptura que concentrações mais baixas como 3% e 6% (Tabela 3). Interessante observar que apesar de maiores concentrações de MF terem sido mais eficazes para proteger a membrana plasmática, renderam motilidades mais baixas que tratamentos com menores concentrações. Mesmo no

menor período de equilíbrio testado, apenas 1 minuto, nota-se que as concentrações de 9% e 12%, embora resultem em proteção da membrana plasmática significativamente superior a 3% e 6%, já causam danos ao espermatozoide mesmo com o rápido contato inicial, reduzindo a motilidade das amostras.

Espécies reativas de oxigênio são bioprodutos naturais de diversas reações bioquímicas e, quando em níveis controláveis, exercem importantes papéis nas funções espermáticas de aquisição de motilidade e capacidade fertilizante (Aitken et al., 2012). Pela conhecida toxicidade das amidas com o sêmen já era esperado que um maior período de equilíbrio poderia gerar maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção de ROS (Tabela 4) foi maior com 9 minutos de exposição ao sêmen em relação a apenas 1 minuto, exceto pelos tratamentos com adição de 12% de MF, nos quais supomos que devido a menor motilidade possa ter ocorrido maior morte celular, e a produção de ROS acabou sendo reduzida. Grande quantidade de ROS no processo de criopreservação, como observada nos tratamentos equilibrados com o sêmen por 9 minutos, tornará os espermatozoides mais suscetíveis ao estresse oxidativo (Chen, 2013). Nossos resultados também demonstraram que a produção de ROS não foi afetada significativamente pela concentração utilizada, variando apenas de acordo com o tempo de equilíbrio, sugerindo fortemente que um período de equilíbrio menor que 9 minutos evitaria danos ao espermatozoide decorrentes da maior produção de ROS em tratamentos equilibrados por maior período.

É sabido, que quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante das células, exercem efeito negativo conhecido como estresse oxidativo, afetando diferentes estruturas do espermatozoide (Chen et al., 2013; Conrad et al., 2015). A concentração de MF não interferiu na peroxidação lipídica (Tabela 5), exceto pelos tratamentos que ficaram apenas 1 minuto em equilíbrio com o sêmen, indicando que a menor motilidade observada nas maiores concentrações testadas não ocorreu por influência da lipoperoxidação. Ao comparar a peroxidação lipídica entre tratamentos que permaneceram 1 e 9 minutos em equilíbrio com o sêmen, em todas as concentrações o período de 9 minutos resultou numericamente em maior peroxidação, embora apenas nas concentrações de 6% e 9% a diferença tenha sido significativa. Além disso, houve maior produção de ROS com 9 minutos de equilíbrio em relação a 1 minuto, provavelmente a causa da maior peroxidação lipídica nestes tratamentos, posto que ROS estão associadas a dano na membrana espermática e peroxidação lipídica (Rui et al., 2017).

Embora a funcionalidade mitocondrial seja essencial para manter adequada produção de ATP para os espermatozoides poderem realizar seu movimento (Sangani et al., 2017), a

redução de motilidade observada nas maiores concentrações utilizadas, se deu por outro motivo que não a redução da funcionalidade mitocondrial. Exceto pelo período de 5 minutos, no qual 3% resultou em menor funcionalidade mitocondrial que 9% e 12%, mas sem diferir de 6%, nenhuma outra diferença estatística foi observada entre as demais concentrações e períodos de equilíbrio (Tabela 6). Aparentemente, a produção de ATP sofreu pouca influência das diferentes condições testadas.

Ficou evidente que as concentrações de 9% e 12%, embora eficazes para proteger a membrana plasmática, foram tóxicas para as células espermáticas, fato evidenciado pela redução da motilidade nesses tratamentos. Provavelmente, a maior ruptura de membrana plasmática observada nos tratamentos com menor concentração de MF ocorreu mecanicamente por cristais de gelo, uma vez que não houve aumento na produção de ROS, nem de peroxidação lipídica nesses tratamentos. Além disso, concentrações maiores comprometeram a viabilidade espermática, mesmo com apenas 1 minuto de contato com o sêmen, sendo mais adequadas concentrações inferiores de MF para o uso na criopreservação seminal de galos.

Associar o uso do Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), para avaliar cinética, com a citometria de fluxo, para quantificar alterações estruturais e bioquímicas dos espermatozoides, proporciona maior precisão na comparação entre os tratamentos em relação a estudos anteriores (Leite et al., 2010). Sabe-se que a combinação de análises de diferentes atributos espermáticos é mais efetiva e precisa na predição de fertilidade do que a utilização de apenas um teste de laboratório (Gliozzi et al., 2017). Apesar disso, a realização de testes de fertilidade poderia ser um próximo passo para demonstrar a capacidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea. A continuidade de estudos sobre a criopreservação seminal de galos que utilizem metodologias avançadas de análise espermática, a padronização de protocolos e a realização de testes de fertilidade são muito importantes para o aperfeiçoamento dos protocolos e para possibilitar o uso desta técnica comercialmente em criações avícolas.

5. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, a utilização de MF na concentração de 3% mantida em contato com o sêmen por 3 a 7 minutos são as condições mais adequadas para seu uso como crioprotetor na criopreservação seminal de galos, preservando características estruturais e bioquímicas sem comprometer a motilidade dos espermatozoides.

Acknowledgements

This work was funded by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel). Antonio Sérgio Varela Junior (307195 / 2015-7) and Carine Dahl Corcini (306356 / 2014-7) are CNPq research fellows.

Conflict of interest

The authors have no interests to disclose.

Referências

Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *Journal of andrology*, 33(6), 1096–1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>

Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., & Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 146(5), R163–R174. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>

Bianchi, I., Calderam, K., Maschio, E. F., Madeira, E. M., da Rosa Ulguim, R., Corcini, C. D., Bongalhardo, D. C., Corrêa, E. K., Lucia, T., Jr, Deschamps, J. C., & Corrêa, M. N. (2008). Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69(5), 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.012>

Blesbois, E., & Brillard, J. P. (2007). Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*, 1(10), 1472–1481. <https://doi.org/10.1017/S175173110700081X>

Burrows, W. H.; quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24, 1937. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>

Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E., & Brillard, J. P. (1999). In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39(2), 185–191. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2201>

Chen, S., Allam, J. P., Duan, Yg., Haidl, G. (2013). Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288(1), 191-199. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2801-4>

Conrad, M., Ingold, I., Buday, K., Kobayashi, S., & Angeli, J. P. (2015). ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1850(8), 1566–1574. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.020>

- Futino, D. O., Mendes, M. C., Matos, W. N., Mondadori, R. G., & Lucci, C. M. (2010). Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction In Domestic Animals*, 45(2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01208.x>
- Gliozzi, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C., & Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1975–1982. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>
- Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26–38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-1)
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., & Rosato, M. P. (2012). The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: DIMETHylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology*, 78(6), 1381–1389. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.009>
- Lake P. E. (1960). Studies on the dilution and storage of fowl semen. *Journal Of Reproduction And Fertility*, 1, 30–35. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0010030>
- Leite, T. G., Vale Filho, V. R., Arruda, R. P., Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., Andrade, V. J. (2010) Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005>
- Maeda, T., Terada, T., & Tsutsumi, Y. (1984). Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25(4), 547–553. <https://doi.org/10.1080/00071668408454896>
- Mocé, E., Grasseau, I., & Blesbois, E. (2010). Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.10.010>
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- Purdy, P. H., Song, Y., Silversides, F. G., & Blackburn, H. D. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science*, 88(10), 2184–2191. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00402>
- Rui, B. R., Shibuya, F. Y., Kawaoku, A., Losano, J., Angrimani, D., Dalmazzo, A., Nichi, M., & Pereira, R. (2017). Impact of induced levels of specific free radicals and

- malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology*, 90, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.001>
- Sangani, K. A., Masoudi, A. A., & Vaez Torshizi, R. (2017). Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow- and fast-growing roosters. *Poultry Science*, 96(1), 211–219. <https://doi.org/10.3382/ps/pew273>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
- Tajima, A., Graham, E. F., & Hawkins, D. M. (1989). Estimation of the relative fertilizing ability of frozen chicken spermatozoa using a heterospermic competition method. *Journal Of Reproduction And Fertility*, 85(1), 1–5. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0850001>
- Terada, T., Maeda, T., Watanabe, M., & Tsutsumi, Y. (1983). Oxygen consumption rate as a measurement of freeze-induced damage to chicken spermatozoa. *Poultry Science*, 62(11), 2271–2275. <https://doi.org/10.3382/ps.0622271>
- Terada, T., Hashimoto, H., Maeda, T., Watanabe, M. & Tsutsumi, Y. (1988). Influence of cryoprotectant concentration on cell volume and motility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Japanese Poultry Science*, 25(5), 268-277.
- Tselutin, K., Narubina, L., Mavrodina, T., & Tur, B. (1995). Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36(5), 805–811. <https://doi.org/10.1080/00071669508417825>
- Varela Junior, A. S., Corcini, C. D., Gheller, S. M., Jardim, R. D., Lucia, T., Jr, Streit, D. P., Jr, & Figueiredo, M. R. (2012). Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 78(2), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>
- Zaniboni, L., Cassinelli, C., Mangiagalli, M. G., Gliozzi, T. M., & Cerolini, S. (2014). Pellet cryopreservation for chicken semen: effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology*, 82(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.007>

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

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	24.6 \pm 0.8 ^{Ab}	29.6 \pm 1.1 ^{Aa}	27.8 \pm 0.8 ^{Aa}	29.1 \pm 0.8 ^{Aa}	27.8 \pm 1.2 ^{Aa}
6%	23.5 \pm 0.6 ^{ABc}	26.1 \pm 1.0 ^{Bab}	23.5 \pm 0.9 ^{BCc}	25.8 \pm 0.7 ^{Bb}	28.0 \pm 0.7 ^{Aa}
9%	22.1 \pm 0.9 ^{Bbc}	23.5 \pm 1.0 ^{BCabc}	24.4 \pm 0.9 ^{Ba}	23.9 \pm 0.6 ^{Bab}	21.4 \pm 0.5 ^{Bc}
12%	19.0 \pm 0.9 ^{Cb}	21.8 \pm 0.7 ^{Ca}	21.6 \pm 0.7 ^{Ca}	19.3 \pm 0.8 ^{Cb}	22.1 \pm 0.7 ^{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 2. Média \pm SE do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	20.4 \pm 0.8 ^{Ab}	25.6 \pm 1.0 ^{Aa}	23.9 \pm 0.7 ^{Aa}	25.2 \pm 0.8 ^{Aa}	24.5 \pm 1.2 ^{Aa}
6%	19.7 \pm 0.5 ^{ABb}	21.6 \pm 0.9 ^{Bab}	19.8 \pm 0.8 ^{Bb}	22.1 \pm 0.7 ^{Ba}	23.6 \pm 0.7 ^{Aa}
9%	17.8 \pm 0.8 ^{Bb}	19.6 \pm 1.0 ^{BCab}	20.2 \pm 0.9 ^{Ba}	19.4 \pm 0.5 ^{Cab}	17.5 \pm 0.5 ^{Bb}
12%	14.5 \pm 0.8 ^{Cc}	17.8 \pm 0.7 ^{Ca}	17.0 \pm 0.6 ^{Cab}	15.5 \pm 0.7 ^{Dbc}	17.7 \pm 0.7 ^{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 3. Média \pm SE do parâmetro celular rompimento espermático pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	68.4 \pm 2.4 ^{Aa}	56.2 \pm 4.4 ^{Ab}	54.4 \pm 3.2 ^{Ab}	52.1 \pm 3.6 ^{ABb}	61.8 \pm 2.6 ^{Aab}
6%	65.2 \pm 1.9 ^{Aa}	56.4 \pm 3.4 ^{Ab}	57.8 \pm 2.5 ^{Aab}	55.5 \pm 2.8 ^{Ab}	55.8 \pm 2.8 ^{ABb}
9%	48.9 \pm 3.7 ^{Ba}	53.7 \pm 4.9 ^{Aba}	51.4 \pm 2.2 ^{Aa}	50.4 \pm 2.5 ^{ABa}	49.6 \pm 5.0 ^{Ba}
12%	55.0 \pm 4.1 ^{Ba}	43.7 \pm 3.4 ^{Ba}	50.0 \pm 3.8 ^{Aa}	45.9 \pm 3.5 ^{Ba}	46.4 \pm 4.9 ^{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 4. Médias \pm SE do parâmetro celular produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides viáveis pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	7467 \pm 644 ^{Ab}	10443 \pm 1217 ^{Ab}	13960 \pm 2988 ^{Aab}	8166 \pm 989 ^{Ab}	20167 \pm 6634 ^{Aa}
6%	7153 \pm 592 ^{Ab}	9325 \pm 1446 ^{Aab}	11552 \pm 2202 ^{Aab}	8722 \pm 999 ^{Ab}	16880 \pm 5351 ^{Aa}
9%	6962 \pm 525 ^{Ab}	10198 \pm 1447 ^{Aab}	12201 \pm 2843 ^{Aab}	9983 \pm 1401 ^{Aab}	17362 \pm 5950 ^{Aa}
12%	7179 \pm 1205 ^{Aa}	10836 \pm 1693 ^{Aa}	11360 \pm 2087 ^{Aa}	7786 \pm 960 ^{Aa}	13238 \pm 3734 ^{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 5. Médias \pm SE do parâmetro celular peroxidação lipídica espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	29.1 \pm 4.4 ^{ABa}	37.7 \pm 4.1 ^{Aa}	37.2 \pm 4.5 ^{Aa}	29.3 \pm 3.9 ^{Aa}	38.3 \pm 5.5 ^{Aa}
6%	25.2 \pm 4.5 ^{Bb}	39.2 \pm 3.9 ^{Aa}	40.0 \pm 3.5 ^{Aa}	34.5 \pm 3.5 ^{Aab}	38.2 \pm 5.0 ^{Aa}
9%	23.4 \pm 2.5 ^{Bb}	41.2 \pm 3.8 ^{Aa}	39.0 \pm 3.3 ^{Aa}	39.7 \pm 4.3 ^{Aa}	40.8 \pm 4.9 ^{Aa}
12%	36.8 \pm 2.5 ^{Aa}	36.4 \pm 4.7 ^{Aa}	36.9 \pm 3.7 ^{Aa}	32.3 \pm 4.4 ^{Aa}	39.3 \pm 4.2 ^{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 6. Médias \pm SE do parâmetro celular funcionalidade mitocondrial espermática pós-descongelamento com diferentes concentrações de MF e diferentes períodos de exposição.

MF	Período de exposição do crioprotetor				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	59.5 \pm 4.5 ^{Aa}	54.3 \pm 4.1 ^{Aa}	48.3 \pm 2.8 ^{Ba}	59.0 \pm 4.3 ^{Aa}	52.2 \pm 4.9 ^{Aa}
6%	62.0 \pm 5.2 ^{Aa}	58.1 \pm 4.7 ^{Aa}	54.9 \pm 4.5 ^{Ab}	50.5 \pm 4.0 ^{Aa}	57.2 \pm 5.2 ^{Aa}
9%	60.2 \pm 4.3 ^{Aa}	52.0 \pm 5.7 ^{Aa}	59.6 \pm 3.4 ^{Aa}	56.3 \pm 4.6 ^{Aa}	56.1 \pm 5.1 ^{Aa}
12%	64.9 \pm 2.7 ^{Aa}	59.9 \pm 4.0 ^{Aa}	62.3 \pm 3.7 ^{Aa}	58.7 \pm 3.4 ^{Aa}	57.1 \pm 3.9 ^{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).

3 Considerações Finais

A importância de determinar as melhores condições para o uso de amidas na criopreservação seminal de galos, quanto à concentração e tempo de equilíbrio com o sêmen ficou bem clara em ambos os artigos. A avaliação da cinética espermática realizada com o CASA, associada às análises realizadas através da citometria de fluxo, garantem grande precisão na geração de dados.

Embora cada amida aja de acordo com suas características físico-químicas, a ação crioprotetora da DMA e da MF foi semelhante em muitos aspectos. Maiores concentrações de ambas as amidas resultaram em maior proteção da membrana plasmática, embora tenham acarretado motilidades mais baixas em relação a concentrações menores. Ainda que pouco afetada pelas condições testadas com MF, a funcionalidade mitocondrial foi maior quando se utilizou DMA com apenas 1 minuto de equilíbrio com o sêmen em relação a períodos de equilíbrio maiores. Considerando apenas a DMA, 1 minuto de equilíbrio com o sêmen também preservou melhor a funcionalidade da membrana plasmática que períodos de equilíbrio maiores, mesmo que não tenha rendido maior motilidade. Já quando se observa apenas a MF, houve aumento na produção de ROS e na LPO quando a mesma ficou em equilíbrio com o sêmen por 9 minutos.

O espermatozoide é uma célula complexa e necessita preservar sua estrutura e função para desempenhar seu papel. Todas as estruturas são fundamentais para manter a função celular, não adiantando preservar determinadas estruturas em detrimento de outras. O que se busca é um equilíbrio de forma que se garanta a maior viabilidade a esse espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea.

De acordo com nossos resultados, as condições com maior potencial para o uso na criopreservação seminal de galos são: a concentração de 6% DMA em equilíbrio com o sêmen por 3 minutos e a concentração de 3% MF mantida em equilíbrio com o sêmen por 3 a 7 minutos.

Referências

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.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096–1106, 2012.

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

AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 163–174, 2013.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.

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.; BRILLARD, J. P. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. **Animal**, v. 1, n. 10, p. 1472–1481, 2007.

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.

- CHALAH, T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E.; BRILLARD, J. P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 185–191, 1999.
- CHEN, S.; ALLAM, J. P.; DUAN, YG.; HAIDL, G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 288, n. 1, p. 191-199, 2013.
- CONRAD, M.; INGOLD, I.; BUDAY, K.; KOBAYASHI, S.; ANGELI, J. P. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 8, p. 1566–1574, 2015.
- FUTINO, D. O.; MENDES, M. C.; MATOS, W. N.; MONDADORI, R. G.; LUCCI, C. M. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 214-220, 2010.
- 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.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 26–38, 1992.
- HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H. M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.
- IAFFALDANO, N.; DI IORIO, M.; ROSATO, M. P. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: DIMETHylacetamide versus dimethylsulfoxide. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1381–1389, 2012.
- KEALY, T. J.; PAUSON, P. L. A new type of organo-iron compound. **Nature**, v. 168, p. 1039–1040, 1951.
- LAKE, P. E. Studies on the dilution and storage of fowl semen. **Journal Of Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 30–35, 1960.
- LEITE, T. G.; VALE FILHO, V. R.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; EMERICK, L. L.; ZAFFALON, F. G.; MARTINS, J. A. M.; ANDRADE, V. J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 31-38, 2010.

LONG, J. A. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? **Poultry science**, v. 85, n. 2, p. 232-236, 2006.

MADEDDU, M.; BERLINGUER, F.; PASCUI, V.; SUCCU, S.; SATTA, V.; LEONI, G. G.; ZINELLU, A.; MUZZEDDU, M.; CARRU, C.; NAITANA, S. Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the Barbary partridge (*Alectoris barbara*). **Theriogenology**, v. 74, p. 1010-1018, 2010.

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, n. 3, p. 58–64, 2016.

MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v. 25, n. 4, p. 547–553, 1984.

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.

MOCÉ, E.; GRASSEAU, I.; BLESBOIS, E. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 359–366, 2010.

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.

PARTYKA, A.; NIZANSKI, W.; ŁUKASZEWICS, E. Evaluation of fresh and frozenthawed 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.

PINI, T.; LEAHY, T.; DE GRAAF, S. P. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. **Theriogenology**, v. 118, p. 172-181, 2018.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

PURDY, P. H.; SONG, Y.; SILVERSIDES, F. G.; BLACKBURN, H. D. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. **Poultry Science**, v. 88, n. 10, p. 2184-2191, 2009.

- RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; AKHTER, S.; ZAFAR, Z.; HUSSAIN, I.; SANTIAGO-MORENO, J.; BLESBOIS, E. Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen with polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology**, v. 78, p. 27–33, 2017.
- RUI, B. R.; SHIBUYA, F. Y.; KAWAOKU, A.; LOSANO, J.; ANGRIMANI, D.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; PEREIRA, R. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. **Theriogenology**, v. 90, p. 11–19, 2017.
- SANGANI, K. A.; MASOUDI, A. A.; VAEZ TORSHIZI, R. Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow- and fast-growing roosters. **Poultry Science**, v. 96, n. 1, p. 211–219, 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.
- SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; VILLAVERDE-MORCILLO, S.; TOLEDANO-DÉAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GOYA, A. L.; MARTÍNEZ, J. G. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 6, p. 882–888, 2016.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.2-5, 2016.
- TAJIMA, A.; GRAHAM, E. F.; HAWKINS, D. M. Estimation of the relative fertilizing ability of frozen chicken spermatozoa using a heterospermic competition method. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, n. 1, p. 1–5, 1989.
- TERADA, T.; HASHIMOTO, H.; MAEDA, T.; WATANABE, M.; TSUTSUMI, Y. Influence of cryoprotectant concentration on cell volume and motility of frozen-thawed fowl spermatozoa. **Japanese Poultry Science**, v. 25, n. 5, p. 268-277, 1988.
- TERADA, T.; MAEDA, T.; WATANABE, M.; TSUTSUMI, Y. Oxygen consumption rate as a measurement of freeze-induced damage to chicken spermatozoa. **Poultry Science**, v. 62, n. 11, p. 2271–2275, 1983.
- TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v. 36, n. 5, p. 805–811, 1995.
- VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R.; ALVARENGA, M. V.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N.; LUCIA, T. JR.; DESCHAMPS, J. C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 323–327, 2009.

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA, T. JR.; STREIT, D. P. JR.; FIGUEIREDO, M. R. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 244–251, 2012.

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.