

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**UTILIZAÇÃO DA DIMETILACETAMIDA E DA DIMETILFORMAMIDA
ASSOCIADAS AO GLICEROL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN OVINO**

GABRIEL FELIPE OLIVEIRA DE MENEZES

SALVADOR - BA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

UTILIZAÇÃO DA DIMETILACETAMIDA E DA DIMETILFORMAMIDA
ASSOCIADAS AO GLICEROL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN OVINO

GABRIEL FELIPE OLIVEIRA DE MENEZES

MÉDICO VETERINÁRIO

SALVADOR - BA

2019

GABRIEL FELIPE OLIVEIRA DE MENEZES

**UTILIZAÇÃO DA DIMETILACETAMIDA E DA
DIMETILFORMAMIDA ASSOCIADAS AO GLICEROL PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Produtos e Processos
Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt

**SALVADOR – BA
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI – UFBA)

M543u Menezes, Gabriel Felipe Oliveira de

Utilização da dimetilacetamida e da dimetilformamida associadas ao glicerol para criopreservação do sêmen ovino / Gabriel Felipe Oliveira de Menezes — Salvador, 2019.

65 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2019.

1. Crioprotetores. 2. Espermatozoide. 3. Amidas. 4. Biotecnologia da reprodução. I. Ribeiro Filho, Antonio de Lisboa. II. Bittencourt, Rodrigo Freitas. III. Título.

CDU: 636.3

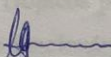
**Utilização da dimetilacetamida e da dimetilformamida associadas ao glicerol
para criopreservação do sêmen ovino**

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes

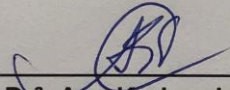
**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal nos Trópicos.**

Salvador, em 29 de março de 2019

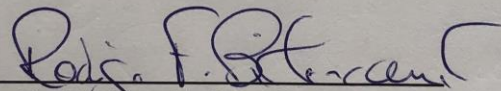
Comissão Examinadora:



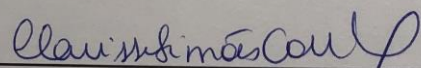
Dr^a Maria Madalena Pessoa Guerra



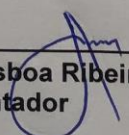
Dr^a Ana Karina da Silva Cavalcante



Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt



Dr^a. Clarisse Simões Coelho



Dr. Antônio de Lisboa Ribeiro Filho
Orientador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL FELIPE OLIVEIRA DE MENEZES – Nascido em 20 de outubro de 1987, na cidade de Salvador-BA. Formado em Medicina Veterinária pela faculdade UNIME - União Metropolitana para o Desenvolvimento da Educação e Cultura em 2011, pós-graduado (especialização) na área de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal em 2012. Mestre em Biotecnologia pela UFS - Universidade Federal de Sergipe, em 2015. Durante o mestrado ministrou a disciplina de Biologia Celular e Molecular para os cursos de Enfermagem, Odontologia e Biologia da UFS. Foi professor da UNIME no período de 2014 a 2017, onde ministrou disciplinas para os alunos do curso Técnico em Agropecuária. Foi prestador de serviço da TCG - Tertúlia Central Genética de 2011 a 2015, responsável pela parte da coleta, criopreservação e comercialização do sêmen. Em 2015 ingressou no doutorado em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia. Em 2016 começou a fazer parte do quadro de funcionários do SENAR/AR-BA - Serviço Nacional de Aprendizagem Rural da Bahia, exercendo o cargo de Coordenador de Programas, continuando até o momento atual.

“Gratidão
Pela força que não me deixou desistir
Por ter sido escolhida para essa missão
Obrigada meu Deus por você existir
Sempre me deu a mão”

Alexandre Silva de Assis

Dedico este trabalho a minha filha, Maria Alice Miranda de Menezes, que chegou em minha vida trazendo muito mais amor, felicidade e força para alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde, sabedoria e tranquilidade para continuar em busca dos meus sonhos, ultrapassando todos os obstáculos encontrados;

A minha mãe, Silvia, meu pai, Fernando e meu irmão, Thiago, vocês são a minha base, amo vocês!

Ao meu amor, Cíntia, obrigado por toda atenção, carinho e amor que a mim foi dado, mesmo nos momentos mais difíceis;

A minha filha, Maria, minha fonte de alegria diária;

Aos meus familiares e amigos, obrigado por me animarem nos momentos que eu mais precisei e me apoiarem o tempo todo, amo vocês!

Sem dúvidas não posso deixar de agradecer aos amigos que fiz ao longo desse doutorado, Fernando Cardoso, Edivânia Jesus, Walkiria Barreto, João Victor, Bia Carôso, Mariana Barros, Mariana Andrade, Maicon Pereira, Mônica Madrigal, Luiz di Paolo, Elisiane Sateles, Kárita Fuchs, Isabela Vasconcelos, Alexandra Soares, Thiago Brandão, Renata Barreto, Marcus Loiola, Celso Barros, vocês tornaram essa batalha muito mais fácil, obrigado pelo companheirismo!

Aos professores e funcionários da UFBA que sempre contribuíram de forma direta ou indireta para o crescimento do meu conhecimento.

Ao meu orientador, professor Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho, obrigado pela oportunidade que foi oferecida;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt, obrigado pelos ensinamentos contínuos e pela confiança em mim depositada;

A todos os professores (as) do curso de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, pelos conhecimentos passados;

Não posso deixar de agradecer a todos os animais que fizeram parte do meu experimento, sem vocês nada disso seria possível;

À Universidade Estadual de Santa Cruz pela disponibilidade no Laboratório de Reprodução Animal para parte das análises.

À Universidade Federal da Bahia e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, pela oportunidade de qualificação;

A todos os envolvidos diretamente ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

MENEZES, G. F. O. **Utilização da dimetilacetamida e da dimetilformamida associadas ao glicerol para criopreservação do sêmen ovino**, Salvador-BA, 2019. 62p. Tese (Doutorado em Ciência Animal dos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, 2019.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos crioprotetores dimetilacetamida (DMA) e dimetilformamida (DMF) associadas, ou não, ao glicerol (GL), utilizadas na formulação de diluidores para criopreservação do sêmen ovino, sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e fertilidade *in vivo*. Para tanto, foram realizados dois experimentos com sete tratamentos cada. No experimento 1 objetivou-se avaliar o efeito da utilização da dimetilacetamida, em diferentes concentrações, associada ou não ao glicerol, para confecção de diluidores para criopreservação espermática, sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen ovino pós-descongelação. Os tratamentos foram divididos em G1: GLY6%; G2: DMA3%; G3: GLY5%+ DMA1%; G4: GLY4%+DMA2%; G5: GLY3%+DMA3%; G6: GLY2%+DMA4% e G7: GLY1%+DMA5%. O experimento 2 teve como objetivo estudar a eficiência da dimetilformamida em diferentes concentrações nos diluidores, associada ou não ao glicerol, para a manutenção da viabilidade espermática ovina *in vitro* e *in vivo* pós-descongelação. Os grupos foram divididos em G1: GLY6%; G2: DMF3%; G3: GLY5%+ DMF1%; G4: GLY4%+DMF2%; G5: GLY3%+DMF3%; G6: GLY2%+DMF4%; G7: GLY1%+DMF5%. As amostras de ambos os experimentos foram avaliadas, após a descongelação, quanto à cinética espermática através da análise computadorizada do sêmen - CASA e da integridade de membrana por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do *Statistical Analysis System* - SAS com nível de significância de 5%. Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos do experimento 1 utilizando o DMA nas avaliações *in vitro* e *in vivo*. No experimento 2 com o DMF, houve diferença na avaliação da integridade de membrana apenas entre o grupo G4 e G7 ($P<0,05$), que não foi demonstrada no teste *in vivo*. Conclui-se que os crioprotetores à base de dimetilacetamida e de dimetilformamida não diferiram do glicerol em relação à criopreservação do sêmen ovino, podendo ser utilizados como crioprotetores alternativos.

Palavras-chave: crioprotetores, espermatozoide, amidas, biotecnologia da reprodução.

ABSTRACT

MENEZES, G. F. O. **Use of dimethylacetamide and dimethylformamide associated with glycerol for cryopreservation of ovine semen.**, Salvador-BA, 2019. 62p. Thesis (Doctorate in Animal Science of the Tropics) - School of Veterinary Medicine and Zootechnics - Federal University of Bahia, 2019.

This work was carried out with the objective of evaluating the effect of dimethylacetamide (DMA) and dimethylformamide (DMF) cryoprotectants, associated or not with glycerol (GL), used in the formulation of diluents for cryopreservation of ovine semen, on in vitro sperm parameters and fertility in vivo. For that, two experiments were carried out with seven treatments each. In the experiment 1 the objective was to evaluate the effect of the use of dimethylacetamide, in different concentrations, associated or not to glycerol, for the preparation of diluents for sperm cryopreservation, on sperm parameters and fertility index of post-thaw sheep semen. The treatments were divided into G1: GLY6%; G2: DMA3%; G3: GLY5% + DMA1%; G4: GLY4% + DMA2%; G5: GLY3% + DMA3%; G6: GLY2% + DMA4% and G7: GLY1% + DMA5%. Experiment 2 had the objective of studying the efficiency of dimethylformamide in different concentrations in the diluents, associated or not to glycerol, for the maintenance of ovine sperm viability in vitro and in vivo after thawing. The groups were divided into G1: GLY6%; G2: DMF3%; G3: GLY5% + DMF1%; G4: GLY4% + DMF2%; G5: GLY3% + DMF3%; G6: GLY2% + DMF4%; G7: GLY1% + DMF5%. Samples from both experiments were evaluated after thawing, for sperm kinetics through computer assisted sperm analysis and membrane integrity by flow cytometry. The results were analyzed through the Statistical Analysis System - SAS with significance level of 5%. No difference ($P > 0.05$) was observed between the treatments of experiment 1 using DMA in the in vitro and in vivo evaluations. In experiment 2 with DMF, there was difference ($P < 0.05$) in membrane integrity only between G4 and G7, which was not demonstrated in the in vivo test. It was concluded that the cryoprotectants based on dimethylacetamide and dimethylformamide did not differ from glycerol in relation to cryopreservation of ovine semen and could be used as alternative cryoprotectants.

Key words: extenders, spermatozoa, amides, reproduction biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com dimetilacetamida associada ou não ao glicerol

- Figura 1** - Representação esquemática do protocolo de sincronização do estro e ovulação de 72 fêmeas da raça Santa Inês. D0: dia do início do protocolo, momento em que foi introduzido o dispositivo intravaginal (CIDR®, Pfizer, Guarulhos, Brasil); D7: sétimo dia do protocolo, aplicação de 300 UI de Gonadotrofina coriônica Equina (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,125mg de cloprostenol sódico (Ciosin ®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil); D8: oitavo dia do protocolo, retirada do CIDR; D9: nono dia do protocolo, aplicação de 200 UI de Gonadotrofina coriônica Humana (hCG, Chorulon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil); D10: décimo dia do protocolo - inseminação artificial por tempo fixo (IATF) D40: avaliação ultrassonográfica das fêmeas inseminadas.... 32

CAPÍTULO 2

Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com a dimetilformamida associada ou não ao glicerol.

- Figura 1** - Representação gráfica da análise espermática em citômetro de fluxo. (A): avaliação identificando o tamanho e a granulosidade da célula. (B): avaliação dos espermatozoides corados com os fluocromos representados nos diferentes quadrantes, onde DIC+|IP+, DIC-|IP+ e DIC-|IP- são espermatozoides com membranas lesadas e DIC+|IP- espermatozoides com membranas íntegras.
..... 51

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com dimetilacetamida associada ou não ao glicerol	
Tabela 1 Parâmetros de cinética espermática de ovinos Santa Inês, avaliados após a congelação-descongelação em diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida	34
Tabela 2 Parâmetros de integridade da membrana plasmática de células espermáticas ovina, avaliados após a congelação-descongelação, com diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida	35
 CAPÍTULO 2	
Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com a dimetilformamida associada ou não ao glicerol.	
Tabela 1 Parâmetros de cinética espermática ovina, avaliados após a congelação em diferentes concentrações de glicerol e dimetilformamida	49
Tabela 2 Parâmetros de integridade de membrana plasmática das células espermáticas ovina, avaliados após a congelação em diferentes concentrações de glicerol e dimetilformamida	51

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ALH	<i>Amplitude of lateral head</i> (Deslocamento Lateral de Cabeça).
ATP	Adenosina trifosfato.
BCF	<i>Beat cross frequency</i> (Frequência de Batimento Flagelar Cruzado).
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> (Análise de sêmen computadorizada).
D0	Dia do início do protocolo.
D7	Sétimo dia do protocolo.
D8	Oitavo dia do protocolo.
D9	Nono dia do protocolo.
DIC	Diacetato carboxifluoresceína.
DMA	Dimetilacetamida.
DMF	Dimetilformamida.
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina.
EOS	Eosina.
GL	Glicerol.
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana.
HYPERACT	Hiperatividade.
IA	Inseminação Artificial.
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo.
IM	Intramuscular.
IMP	Integridade de Membrana Plasmática.
IP	Iodeto de Propídio.
LIN	Linearity (Linearidade).
mL	Mililitros.
MP	Motilidade Progressiva.
MT	Motilidade total.
N ₂ L	Nitrogênio Líquido.
P	Nível de significância.
PBS	Tampão Fosfato-Salina.
PGF ₂ α	Prostaglandina.
pH	Potencial Hidrogeniônico.

PS	Fosfatidilserina.
RAP	Percentual de Espermatozoides Rápidos.
SCA	<i>Sperm Class Analyzer.</i>
STR	<i>Straight Lline Velocity</i> (Retilinearidade).
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio.
SAS	<i>Statistical Analysis System.</i>
SPTZ	Espermatozoide.
UI	Unidade Internacional.
VSL	<i>Straightline Velocity</i> (Velocidades em Linha Reta).
VCL	<i>Curvilinear Velocity</i> (Velocidade Curvilínea).
VAP.	Velocidade do percurso médio.
µL	Microlitros.
µm	Micrometros.
%	Porcentagem.
<	Menor que.
>	Maior que.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	18
2.2 DILUIDORES DE CONGELAÇÃO	20
2.3 CRIOPROTETORES	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 HIPÓTESE	25
5 CAPÍTULO 1 FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES OVINOS CRIOPRESERVADOS COM DIMETILACETAMIDA ASSOCIADA OU NÃO AO GLICEROL	
5.1 RESUMO	26
5.2 INTRODUÇÃO	27
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.3.1 Local e manejo dos animais	28
5.3.2 Colheita e avaliação do sêmen pré-congelação	29
5.3.3 Elaboração dos grupos experimentais	29
5.3.4 Resfrieração e congelação do sêmen	30
5.3.5 Avaliação do sêmen pós-descongelação	30
5.3.6 Sincronização das fêmeas e inseminação artificial	31
5.3.7 Análise estatística	33
5.4 RESULTADOS	34
5.5 DISCUSSÃO	35
5.6 CONCLUSÃO	38
5.7 CONFLITO DE INTERESSE	38
5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

**6 CAPÍTULO 2 FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES OVINOS
CRIOPRESERVADOS COM A DIMETILFORMAMIDA ASSOCIADA OU NÃO AO
GLICEROL.**

6.1 RESUMO	42
6.2 ABSTRACT	43
6.3 INTRODUÇÃO	44
6.4 MATERIAL E MÉTODOS	45
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.6 CONCLUSÕES	53
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
8 REFERÊNCIAS GERAIS	59

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura mundial tem importante característica econômica e social, apresentando cerca 1,2 bilhões de cabeças de ovinos, com presença em diversos continentes, principalmente pelas características intrínsecas da espécie, de adaptação aos diferentes climas (FAO, 2015). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), o efetivo de ovinos é de 18,43 milhões de cabeças, com a maior concentração localizada na região Nordeste do país, contendo 63% dos animais, seguida da região Sul com 23,9% do rebanho total. Resultados preliminares do Censo Agropecuário de 2017 informam que a Bahia passou obter o maior rebanho do Brasil com 2,8 milhões de cabeças, ultrapassando o Rio Grande do Sul com 2,6 milhões (IBGE, 2017).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2017), existe uma projeção de crescimento da população que aumentará a exigência na produção de alimentos e outros produtos agrícolas em 50% até o ano de 2050, ampliando assim o consumo de proteína animal, o que tornará um desafio global o aumento da sua produtividade. O melhoramento genético, aliado às condições do ambiente pode fazer com que haja um aumento do desempenho individual dos animais e eleve a produtividade, assim como o retorno econômico aos países produtores (CARNEIRO JUNIOR, 2009).

Diante desse cenário, diversas biotécnicas aplicadas à reprodução animal tornam-se imprescindíveis para o avanço genético de forma rápida, dentre elas a criopreservação de sêmen se destaca, devido a potencializar o mérito genético de reprodutores com perfil melhorador e sua capacidade de transmissão dessas características através dos seus espermatozoides. Dentre as vantagens da criopreservação seminal destacam-se a preservação do material genético por tempo indeterminado, a facilidade de transporte do sêmen criopreservado para qualquer região do globo terrestre, a redução de custos e riscos relacionados à aquisição e ao transporte de reprodutores, soma-se a isso o uso associado da inseminação artificial (IA), que leva ao aumento no número de progênies por macho e disseminação facilitada de características genéticas desejadas (LEBOEUF et al., 1998; LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000; LIMA et al., 2010). Entretanto, um

percentual de espermatozoides torna-se inviável após o processo de congelação e descongelação celular (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

No processo de criopreservação de sêmen ovino, o glicerol tem sido o crioprotetor penetrante mais usado, entretanto, a sua atividade crioprotetora sobre o espermatozoide é reduzida pelo seu efeito citotóxico pós-descongelação (KAROW, 2001). Com isso, tem-se buscado alternativas de crioprotetores para a congelação de sêmen e a classe das amidas vêm desempenhando efeito crioprotetor satisfatório na congelação espermática em coelhos e equinos, que apresentam espermatozoides considerados de difícil congelabilidade (ALVARENGA et al., 2005; KASHIWAZAKI et al., 2006; OKUDA et al., 2007). Para ovinos, as amidas representam uma alternativa promissora no processo de criopreservação seminal (BITTENCOURT et al., 2013).

A dimetilacetamida e a dimetilformamida apresentam pesos moleculares menores que o glicerol, com 87,12g/mol, 73,09g/mol e 92,02g/mol, respectivamente, e este fato predispõe à baixa indução de danos às células espermáticas submetidas à criopreservação, pela facilidade de penetração desses crioprotetores à célula (JEREZ et al., 2016). Ambos crioprotetores têm sido utilizados em diversas espécies (MEDEIROS et al., 2002; MELO et al., 2007; BEZERRA et al., 2011; ALVES et al., 2016; JEREZ et al., 2016; MOSCA et al., 2016), entretanto, na literatura consultada não foram encontrados trabalhos estudando a fertilidade do sêmen ovino criopreservado com uso de diluente a base de amidas associado ao glicerol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A criopreservação de sêmen, quando associada à técnica de inseminação artificial (IA), pode promover a disseminação de características genéticas desejáveis em um rebanho, servindo como ferramenta para o melhoramento genético. A IA tem sido utilizada em diversas espécies de mamíferos, entretanto, em ovinos ainda se apresenta pouco disseminada, pois existem fatores que diminuem a taxa de fertilidade, dentre eles, o próprio processo de criopreservação seminal (TSAKMAKIDIS, 2010).

Etapas do processo de criopreservação podem produzir mudanças na célula espermática, diminuindo a sua fertilidade, já que parte das células espermáticas após o processo de congelação e descongelação se tornam inviáveis (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A qualidade espermática pós-descongelação está associada à causas multifatoriais, as quais devem ser avaliadas separadamente, para que se obtenha um sêmen com maior viabilidade. Dentre os fatores que interferem na viabilidade espermática têm-se os processos de resfriamento, congelação e descongelação, que podem causar danos irreversíveis às células espermáticas (EL-ALAMY; FOOTE, 2001; JEREZ et al., 2016). As etapas de congelação podem ser fatores determinantes nas crioinjúrias das células, porque as alterações de membrana e lesões oxidativas podem promover a morte celular (WATSON, 2000).

Uma característica marcante dos espermatozoides é que eles são sensíveis às mudanças de temperatura e, diante deste fato, o meio diluidor utilizado é de suma importância para o sucesso do processo de criopreservação, já que o mesmo pode minimizar esses efeitos deletérios (BITTENCOURT et al., 2013; SALAMON; MAXWELL, 1995; SALAMON; MAXWELL, 2000). Portanto, além da metodologia da criopreservação, a escolha do diluente é fator determinante para manutenção da qualidade e da viabilidade espermática (LEIBO et al., 2007). O crioprotetor utilizado, bem como o método de adição, que pode ser antes ou durante a fase de refrigeração e a sua concentração também são fatores importantes a serem considerados, pois os

crioprotetores são responsáveis pela proteção da célula durante a queda de temperatura (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

O estresse osmótico, a formação e a dissolução de cristais de gelo promovem danos à membrana espermática e perda de motilidade, com conseqüente comprometimento da fertilidade durante a realização de procedimentos de IA (CRESPILHO et al., 2006). A formação de cristais de gelo acontece enquanto o sêmen passa pelo processo de criopreservação, que, na congelação lenta, são formados fora da célula. Portanto, a força osmótica da solução restante fica maior no ambiente extracelular, aumentando o efluxo de água da célula, evitando a formação de gelo intracelular. Por isso a taxa de resfriamento deve ser lenta o suficiente para permitir que a água deixe as células por osmose, impedindo a formação de gelo intracelular, que é letal. Quando o resfriamento é muito rápido, a água presente na célula não sai e a formação de cristais intracelulares acaba lesionando a membrana espermática. Já quando o resfriamento é muito lento, as células acabam ficando muito desidratadas, o que também pode causar lesões (WATSON, 2000).

Existe também o fator variabilidade individual à criotolerância espermática, que ocasiona elevadas oscilações nos parâmetros espermáticos *in vitro* e nos índices de fertilidade (BARRIOS et al., 2005). A variação individual dos índices de congelabilidade pode ser estudada com análises moleculares mais detalhadas, como a eletroforese em gel de agarose, para identificação de proteínas que constituem o plasma seminal (JOBIM et al., 2011). Além da variabilidade individual entre animais da mesma espécie, também existem os efeitos tóxicos causados por crioprotetores para espécies específicas nas quais está sendo realizada a criopreservação do sêmen (WATSON, 2000).

As células espermáticas apresentam uma versatilidade funcional, como a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, a movimentação e a capacidade de concluir a capacitação e a reação acrossomal, para que tenham maior probabilidade de fertilização. Entretanto, em virtude dos efeitos nocivos inerentes ao processo de congelação/descongelação, os locais que sofrem as primeiras alterações danosas são as membranas plasmática e acrossomal, essenciais para a sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides (OLLERO et al., 1998).

Avaliações da funcionalidade de membrana, como o teste hiposmótico, demonstraram que os espermatozoides ovinos após a congelação/descongelação reduzem

o potencial funcional das membranas, o que pode afetar a capacidade de fertilização dessas células (BRITO et al., 2003; OBERST et al. 2003; MENEZES et al. 2013).

Esse comprometimento da habilidade da membrana plasmática em controlar os mecanismos de permeabilidade seletiva ocorre pelo aumento de cálcio intracelular, como relatado na espécie humana por Mclaughlin e Ford (1994). Apesar da redução de espermatozoides com motilidade e viabilidade pós-descongelção, ainda existem subpopulações com características favoráveis para fertilização (BAILEY; BLODEAU; CORMIER, 2000).

Os danos que as células espermáticas dos ovinos sofrem durante o processo de congelção/descongelção podem ser estruturais, bioquímicos ou funcionais, com espermatozoides móveis, mas danificados de tal maneira que a penetração e fertilização sejam improváveis. Cerca 40 a 60% dos espermatozoides ovinos apresentam motilidade após a descongelção, e, desses, somente 20 a 30% permanecem biologicamente inalterados (SALAMON, MAXWELL, 1995). Portanto, os danos provocados ao espermatozoide durante a criopreservação podem ser minimizados com a utilização de meios diluidores mais elaborados (HU et al., 2011).

2.2 DILUIDORES DE CONGELÇÃO

O diluidor ideal deve ser capaz de preservar a integridade e a funcionalidade das membranas, que são de suma importância para a fertilização (CELEGHINI, 2008). Além disso deve ter pH e osmolaridade compatíveis com o sêmen, mantendo o equilíbrio eletrolítico, ser nutritivo para o fornecimento de energia para as células e manutenção da cinética, ter inibidores de crescimento bacteriano para garantir a sanidade da amostra seminal, ser atóxico, de preparo fácil e de baixo custo para o aumento da viabilidade do uso a campo (GRAHAM, 1995; HAFEZ, HAFEZ, 2004).

Diferentes diluidores de sêmen têm sido testados em várias espécies, sendo os mais comuns aqueles à base de TRIS Hidroximetil Aminometano com gema de ovo em sua composição (SALAMON, MAXWELL, 1995), a glicina-gema e a glicina-gema-leite, leite integral ou desnatado e água de coco (NUNES, 1998).

O diluidor formulado à partir da gema de ovo é o mais utilizado para a preservação do sêmen ovino e advém de um diluidor formulado para congelção do sêmen bovino

(DAVIS; BRATTON; FOOTE, 1963). Desta forma, a gema de ovo é um componente essencial dos principais diluidores disponíveis no mercado para a espécie ovina por desempenhar papel crucial na proteção dos espermatozoides contra o choque térmico (PILLET et al., 2011), prevenindo as lesões causadas pelo processo de congelação/descongelação (SALAMON, MAXWELL, 2000).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram identificadas por Pace e Graham (1974) na gema de ovo e foram correlacionadas com os constituintes que minimizavam as crioinjúrias sofridas pela membrana celular espermática. Estudos recentes comprovaram este achado e verificaram que as LDLs agem como crioprotetor por meio da aderência à membrana do espermatozoide, formando uma película interfacial (ANTON et al., 2003), incorporação fosfolipídios e colesterol à membrana espermática (BERGERON et al., 2004) e diminuição do estresse oxidativo, apresentando um ambiente favorável à sobrevivência espermática (HU et al., 2011).

Estes resultados têm incentivado o desenvolvimento de diluidores que empregam como um dos constituintes as LDLs em substituição à gema de ovo (AHMAD et al., 2008; HU et al., 2010; MOUSTACAS et al., 2011; PILLET et al., 2011; TONIETO et al., 2010; VARELA JUNIOR et al., 2009). Estudos iniciais sobre o tema geraram resultados animadores ao demonstrarem que os diluidores a base de LDL, parecem ser mais eficazes na manutenção dos parâmetros espermáticos *in vitro* e dos índices de fertilidade em ruminantes (MOUSSA et al., 2002; MOUSTACAS et al., 2011; TONIETO et al., 2010; HU et al., 2010; HU et al., 2011).

O leite desnatado ou integral também é utilizado como componente do meio base em diversos experimentos, entretanto precisa passar por um tratamento térmico, afim de desnaturar a lactenina, proteína que é nociva para os espermatozoides (FLIPSED, PATTON, ALMQUIST, 1954; THACKER, FLIPSED, ALMQUIST, 1994). Essa proteína é desnaturada quando o leite é aquecido, entretanto esse leite não deve ser fervido, pois acaba denaturando a caseína, que é de interesse para a criopreservação (DEL VALLE et al., 2013).

Nos últimos anos houve um interesse em desenvolver meios que fossem quimicamente definidos, de fácil manipulação e de grande confiabilidade, sobretudo que não tivessem componentes de origem animal, para que houvesse uma melhora na biossegurança do sêmen, bem como uma padronização nos meios que fossem formulados

(CSEH, FAIGL, AMIRIDIS, 2012; MOUSTACAS et al., 2011), como por exemplo a lecitina de soja, que tem sido utilizada em substituição a gema de ovo nos meios diluidores para ovinos e que apresentaram parâmetros espermáticos pós-descongelção similares aos meios contendo gema de ovo (KHALIFA; ABDEL-HAFEZ, 2014).

2.3 CRIOPROTETORES

Os crioprotetores são importantes componentes presentes nos meios diluidores que podem ser classificados de duas formas, não penetrantes e penetrantes celulares (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). Os crioprotetores não penetrantes são aqueles que não atravessam a parede da membrana plasmática da célula espermática e em sua maioria são moléculas grandes que tem como principal função proteger as células contra as crioinjúrias (GRAHAM, 1995).

As proteínas da gema de ovo e do leite agem como colóides e ajudam a estabilizar a membrana plasmática espermática (COTTORELLO; HENRY, 2002), já os açúcares, além de promoverem um aporte energético para a células, também fazem com que essas células se desidratem lentamente, evitando a formação de cristais de gelo intracelular e também contribuem para a estabilização das membranas quando essas células estão desidratadas (ABOAGLA; TERADA, 2003).

Os crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas, que atravessam a membrana plasmática e tem a sua ação intracelular, alguns exemplos deles são o etilenoglicol, o glicerol, o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e a dimetilacetamida (DE LEEUW et al., 1993; SZTEIN et al., 2001).

Dentre os crioprotetores penetrantes, o glicerol tem sido amplamente utilizado como crioprotetor nos meios diluidores para o sêmen ovino, e o seu efeito nos espermatozoides parece estar associado às suas propriedades coligativas, fazendo com que ocorra uma redução do ponto de congelação, e por consequência, uma menor concentração de eletrólitos na fração que não fica congelada das células, o que ajuda a diminuir a pressão osmótica extracelular (HOLT, 2000).

O glicerol começou a ser utilizado primeiramente em bovinos, com posterior uso em ovinos e até os dias atuais é o crioprotetor mais utilizado para os ruminantes. Entretanto, apesar de possibilitar níveis de manutenção da cinética pós-descongelção,

ele apresenta toxicidade à célula, afetando sua membrana (MORRIER et al., 2002). Diante deste motivo, outra estratégia que pode melhorar os resultados obtidos na criopreservação espermática é o emprego de crioprotetores alternativos ao glicerol, devido a esses efeitos tóxicos ao espermatozoide (ALVARENGA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2014).

Neste contexto, as amidas têm demonstrado atividade protetora as células espermáticas de equinos (ALVARENGA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002) e ovinos sendo utilizadas para a congelação de sêmen de ambas as espécies cuja célula é considerado de difícil congelabilidade. Na espécie ovina os melhores resultados foram encontrados quando utilizou-se amidas nas concentrações de 3% (BITTENCOURT et al., 2011).

A dimetilacetamida (DMA) é um crioprotetor penetrante, que contém em sua estrutura bioquímica o grupo amida, ao qual confere alta solubilidade, baixo peso molecular e capacidade de ligação ao hidrogênio da molécula de água, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, reponsáveis por importantes lesões às membranas plasmáticas (LAFFALDANO; DI LORIO; PINA-ROSATO, 2012). Outra característica interessante da DMA, relatadas por Ogier de Baulny, Labbé e Maisse (1999), é que, quando acrescentada ao meio diluidor, causa um incremento relevante de ATP que pode ser produzido através da utilização do DMA em uma via metabólica, estimulando de maneira direta a síntese de ATP, que posteriormente poderá ser utilizado pelos espermatozoides, ajudando na motilidade pós-descongelação.

Também, a baixa viscosidade da DMA, aliada ao baixo peso molecular resultam em um alto coeficiente de permeabilidade das membranas plasmáticas ($14,7 \times 10^5$ cm/s), quando comparado ao glicerol ($0,59 \times 10^5$ cm/s), produz um menor estresse osmótico e consequente dano celular (BALL; VO, 2001; NACCACHE; SHA'AFI, 1973).

A DMF tem características similares a DMA e estão sendo utilizadas com sucesso para a criopreservação do sêmen equino e quando comparadas ao glicerol, apresentam resultados superiores nos parâmetros de motilidade e viabilidade espermática (GOMES, JACOB, MEDEIROS, 2002; SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos crioprotetores dimetilacetamida e dimetilformamida associadas ou não ao glicerol, utilizados na formulação de diluidores para criopreservação do sêmen ovino, sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e fertilidade *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a utilização da DMA e DMF em diferentes concentrações, associados ou não ao glicerol, em diluidores para congelação do sêmen ovino, sobre os parâmetros de cinética espermática avaliados por análise computadorizada;
- Analisar o efeito da utilização da DMA e DMF em diferentes concentrações, associados ou não ao glicerol, em diluidores de congelação do sêmen ovino, sobre os parâmetros de integridade da membrana plasmática, avaliados por citometria de fluxo;
- Avaliar a fertilidade *in vivo* do sêmen ovino criopreservado com DMA e DMF, associado ou não ao glicerol, em diluidores de congelação do sêmen ovino.

4 HIPÓTESES

Ao realizar este trabalho hipotetizou-se que:

- Diluidores contendo crioprotetores à base de DMF ou DMA são eficientes para a crioproteção de células espermáticas de ovinos.
- A substituição do glicerol, parcial ou total, pela DMA ou DMF reduz o efeito deletério, pós-descongelção, sobre a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide ovino.
- As ovelhas inseminadas com sêmen congelado com crioprotetores à base de amidas apresentam resultados de fertilidade superiores aos obtidos com diluidor convencional com glicerol.

1 **5 CAPÍTULO 1 – Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com**
2 **dimetilacetamida associada ou não ao glicerol.**

3
4 RESUMO

5
6 A dimetilacetamida tem sido utilizada em diferentes diluidores para criopreservação do
7 sêmen em espécies distintas com resultados promissores. Assim, este trabalho foi
8 desenvolvido com o objetivo de avaliar a utilização da dimetilacetamida (DMA) em
9 diferentes concentrações, associadas ou não ao glicerol (GL), para a criopreservação do
10 sêmen ovino, e seu efeito sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e índice de fertilidade
11 *in vivo* pós-descongelção. Foram utilizados 25 ejaculados de cinco ovinos adultos da
12 raça Santa Inês. Os ejaculados colhidos foram divididos entre os sete tratamentos para
13 posterior criopreservação. Os tratamentos apresentavam diferentes concentrações de
14 DMA e GLY, sendo divididos em: G1: GLY6%; G2: DMA3%; G3: GLY5%+ DMA1%;
15 G4: GLY4%+DMA2%; G5: GLY3%+DMA3%; G6: GLY2%+DMA4%; G7:
16 GLY1%+DMA5%. Após a descongelção das palhetas, alíquotas foram avaliadas quanto
17 a cinética espermática computadorizada (CASA) e integridade de membrana plasmática,
18 utilizando sondas fluorescentes e citometria de fluxo. Após a avaliação *in vitro* dos
19 parâmetros espermáticos procedeu-se com o teste *in vivo*, através da inseminação
20 artificial laparoscópica, em tempo fixo, de 72 fêmeas da raça Santa Inês. Os resultados
21 obtidos foram analisados através do *Statistical Analysis System* – SAS com nível de
22 significância de 5%. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do
23 teste de Shapiro-Wilk. Todos os resultados *in vitro* apresentaram distribuição não normal
24 e foram avaliados pelo Kruskal-Wallis. As taxas de gestação nos grupos experimentais
25 foram comparadas por meio de estudo de dispersão de frequências, utilizando-se o teste
26 qui-quadrado (X^2). O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Não
27 foram verificadas diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos, para os parâmetros de cinética
28 espermática e integridade de membrana. A avaliação da fertilidade também demonstrou
29 semelhança ($P>0,05$) entre os tratamentos utilizados. Conclui-se que a dimetilacetamida,
30 independente da concentração utilizada, não promoveu melhoria nos índices de
31 manutenção da viabilidade e fertilidade espermática ovina pós-descongelção, quando

32 comparado ao glicerol, podendo ser utilizada em substituição ao glicerol quando houver
33 uma necessidade e ou oportunidade de uso.

34 **Palavras-chave:** sêmen, crioprotetores, amidas, biotecnologia da reprodução.

35 _____

36 Capítulo redigido no formato da revista Theriogenology da editora Elsevier, QUALIS-CAPES: A2

37 **5.1 Introdução**

38

39 O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para a congelação do sêmen ovino,
40 entretanto por causar lesões aos espermatozoides pós-descongelação, devido à alta
41 osmolaridade, tem-se justificado a pesquisa por outros crioprotetores que possibilitem
42 melhores índices espermáticos pós-descongelação [1,2,3].

43 A utilização das amidas como alternativa ao glicerol é justificada por
44 apresentarem menor viscosidade e peso molecular, resultando em uma maior
45 permeabilidade à membrana plasmática, o que reduz o estresse osmótico ao
46 espermatozoide [1].

47 O uso da dimetilacetamida (DMA) para conservação de sêmen foi relatado em
48 várias espécies com resultados satisfatórios, dentre elas: equinos [4,5], aves [6], peixes
49 [7,8] e suínos [9]. Em ovinos, a dimetilacetamida foi testada para a criopreservação
50 espermática, porém não a avaliaram associada ao glicerol ou em outras concentrações
51 além de 3 e 6% de DMA [10]. Todavia maioria dos trabalhos só realizaram avaliações do
52 sêmen *in vitro*, com poucos relatos utilizando a avaliação de fertilidade *in vivo*, sobretudo
53 na espécie ovina.

54 Considerando a necessidade de manter-se a viabilidade do espermatozoide ovino
55 pós-descongelação, surge o interesse em identificar um crioprotetor mais eficaz e sua
56 concentração ideal para ser usada com sucesso durante a criopreservação espermática.
57 Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da utilização da
58 dimetilacetamida em diferentes concentrações, associados ou não ao glicerol, na
59 confecção de diluidores para criopreservação espermática, sobre os parâmetros
60 espermáticos *in vitro* e índice de fertilidade *in vivo* do sêmen ovino pós-descongelação.

61

62 **5.2 Material e Métodos**

63

64 *5.2.1 Local e manejo dos animais*

65

66 Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
67 Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da
68 Bahia, protocolo: CEUA 41/2014. O experimento foi realizado em diferentes localidades,

69 de acordo com as etapas de pesquisa. A criopreservação do sêmen foi realizada na
70 Fazenda Experimental do Município de Entre Rios – Ba região com latitude 11°56'31"
71 sul, longitude 38°05'04" oeste e no Laboratório de Reprodução Animal, com latitude
72 13°00'16.7" sul, 38°30'31.6" oeste, pertencentes à Escola de Medicina Veterinária e
73 Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA. Foram utilizados 25 ejaculados de
74 cinco ovinos adultos da raça Santa Inês, com escore corporal de 3 (na escala de 1-5),
75 clinicamente sadios e aprovados no exame andrológico, os quais foram mantidos a pasto
76 de *Brachiária decumbens*, suplementados com sal mineral específico para a espécie e
77 com fornecimento de água *ad libitum*.

78

79 5.2.2 Colheita e avaliação do sêmen pré-congelação

80

81 As colheitas do sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, utilizando
82 uma fêmea como manequim. Após a colheita, a amostra de sêmen foi avaliada quanto ao
83 volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática. Os ejaculados que não
84 apresentaram conformidade com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução
85 Animal – CBRA [11] para sêmen *in natura* foram descartados.

86 Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer,
87 com sêmen diluído na proporção de 10µL para 3990µL (1:400) de água deionizada.
88 Também foram coletadas alíquotas para realização do teste supravital com corante eosina
89 - EOS [12].

90

91 5.2.3 Elaboração dos grupos experimentais

92

93 O ejaculado foi diluído em meio contendo Tris-gema de ovo [13] acrescido de
94 dois crioprotetores: o glicerol (GLY) e a dimetilacetamida (DMA), sozinhos ou em
95 associações, respeitando o limite máximo de 5% da dimetilacetamida. Para tanto, foram
96 formados sete grupos experimentais: Grupo 1: GLY6%, G2: DMA3%, G3:
97 GLY5%+DMA1%, G4: GLY4%+DMA2%, G5: GLY3%+DMA3%, G6:
98 GLY2%+DMA4%, G7: GLY1%+DMA5%.

99 O G2 foi utilizado como meio controle para utilização do DMA, com base em
100 resultados de estudos anteriores realizados pela equipe de pesquisa [10].

101 5.2.4 Resfrieração e congelação do sêmen

102

103 O sêmen diluído em cada grupo experimental foi envasado em palhetas francesas
104 (0,25mL), com a concentração de 100×10^6 espermatozoides. Na sequência, as amostras
105 foram levadas a um refrigerador (Modelo 518C, Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre,
106 Brasil), submetidas a refrigeração a 5°C ($0,46^\circ\text{C}/\text{min}$), onde permaneceram por um
107 período de duas horas[14] e posteriormente foram congeladas em vapor de nitrogênio
108 líquido.

109

110 5.2.5 Avaliação do sêmen pós-descongelação

111

112 As amostras seminais foram descongeladas em um banho-maria à 37°C por 30
113 segundos [15]. Após a descongelação, o sêmen de cada grupo foi depositado em
114 microtubos (1,5mL), previamente aquecidos e mantidos à 37°C .

115 A cinética espermática foi avaliada no Laboratório de Reprodução Animal da
116 Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, utilizando-se o sistema de análise
117 computadorizada de sêmen - CASA (*Sperm Class Analyzer SCA*®, Microptics, S.L.
118 Versão 5.1, Barcelona, Espanha), configurado com *set-up* para ovinos: Área da partícula
119 de 3 a $70\mu\text{m}^2$, classificado quanto à velocidade em lento quando tinham velocidade entre
120 10 e $45\mu\text{m}/\text{s}$, médio entre 45 e $75\mu\text{m}/\text{s}$ e rápidos acima de $75\mu\text{m}/\text{s}$; progressivos quando
121 obtinham mais de 80% de retilinearidade (STR); circular quando obtinham menos que
122 50% de linearidade (LIN); a hiperatividade (HYPERACT) foi calculada quando a
123 velocidades curvilínea (VCL) = 35 a $500\mu\text{m}/\text{s}$, STR = 85 a 100% e o deslocamento
124 lateral de cabeça (ALH) = 2,5 a $100\mu\text{m}$.

125 Uma alíquota retirada da amostra descongelada foi diluída em tampão fosfato-
126 salino – PBS [16], a fim de se obter uma concentração final da diluição de
127 aproximadamente 48×10^6 spz/mL [17]. Após cinco a dez minutos de incubação (37°C),
128 $5\mu\text{L}$ do sêmen diluído [18] foram transferidos para preparação entre lâmina e lamínula,
129 previamente aquecidas (37°C), e levados para análise no microscópio (Eclipse 50i,
130 Nikon®, Tóquio, Japão), sob aumento de 100x. Imagens de quatro campos diferentes
131 foram capturadas através de uma câmera (602fc, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha),
132 totalizando 100 imagens/segundo/campo, com contagem mínima de 250 células.

133 Foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade total (MT, %)
134 e progressiva (MP, %), velocidades curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e do percurso médio (VAP,
135 $\mu\text{m/s}$) e em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm),
136 linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), frequência de batimento flagelar cruzado
137 (BCF, Hz) e hiperatividade (HYPERACT, %).

138 A avaliação da integridade de membrana plasmática foi realizada no Laboratório
139 de Biologia Molecular e Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde - ICS da UFBA.
140 As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo (BD FACSCalibur®, BD
141 Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). Foram utilizadas duas sondas
142 fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC, 21879, Sigma Aldrich), que
143 fluoresce em verde, e iodeto de propídeo (IP, P4170, Sigma Aldrich), que fluoresce em
144 vermelho, presentes em uma solução de trabalho que continha PBS®, DIC na
145 concentração final de 20,0 μM e IP na concentração final de 15 μM [19,20].

146 Foram adicionados 5 μL de IP e 5 μL de DIC a cada amostra de 200 μl de sêmen
147 diluído em PBS, a uma concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL em cada tubo
148 criogênico. Para essa análise foi estabelecido a contagem de no mínimo 50.000 eventos.
149 Os espermatozoides foram classificados como não lesados (DIC+/IP-) e lesados
150 (DIC+/IP+; DIC-/IP+; DIC-/IP-).

151

152 5.2.6 Sincronização das fêmeas e inseminação artificial

153

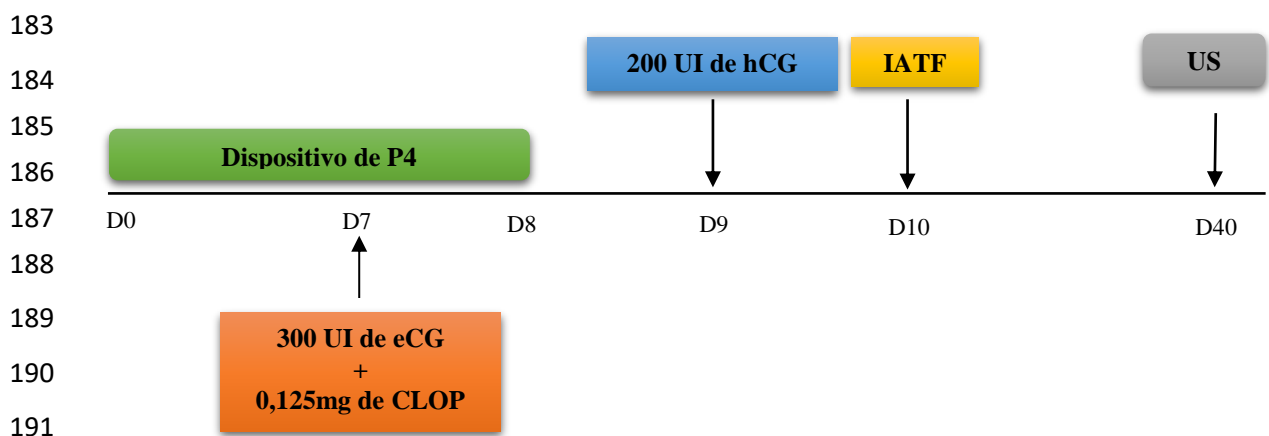
154 Foram utilizadas 72 fêmeas ovinas Santa Inês com escore corporal 3 (escala de 1-
155 5), clinicamente sadias, pertencentes à Fazenda Experimental de Entre Rios da
156 Universidade Federal da Bahia. Estes animais eram mantidos a pasto de *Brachiária*
157 *decumbens*, suplementadas com sal mineral específico para a espécie e com fornecimento
158 de água *ad libitum*. Todas passaram por uma avaliação prévia, clínica e ginecológica, bem
159 como, seguiram um calendário de vacinação e vermifugação. Essas fêmeas foram
160 divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais denominados em Grupo 1 e
161 Grupo 3 inseminadas por laparoscopia [21].

162 Grupo 1: 36 fêmeas inseminadas com o sêmen congelado com o diluidor Tris-gema
163 acrescido de glicerol a 6% (GLY6%);

164 Grupo 3: 36 fêmeas inseminadas com o sêmen congelado com o diluidor Tris-gema
 165 acrescido de glicerol a 5% e dimetilacetamida a 1% (GLY5%+DMA1%);

166 Os grupos experimentais foram escolhidos após o resultado da avaliação *in vitro*,
 167 que não obteve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, entretanto foi considerado o
 168 tratamento que alcançou os maiores percentuais (G3) em relação aos parâmetros de VCL,
 169 VAP e VSL, para comparar com o grupo controle.

170 As ovelhas foram sincronizadas utilizando-se protocolo curto, que se iniciou no dia
 171 zero (D0), com a colocação de dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona
 172 (CIDR®, Pfizer, Guarulhos, Brasil) e com o qual permaneceram por oito dias. No D7 foi
 173 realizada a administração por via intramuscular (IM) de 300UI de gonadotrofina
 174 coriônica equina (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,125mg
 175 de cloprostenol sódico (PGF2 α , Ciosin®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Após
 176 34 horas da retirada do P4 (D9), foram administradas 200UI de gonadotrofina coriônica
 177 humana (hCG, Chorulon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) por via IM. No D10,
 178 aproximadamente 52 horas após retirada do dispositivo intravaginal, foram realizadas as
 179 inseminações intrauterinas laparoscópicas [21], de acordo com os tratamentos utilizados
 180 (Figura 2). Todos os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal, no modo B,
 181 utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5MHz (Mindray DP-50 Vet,
 182 Shenzhen, China) 30 dias após às inseminações para a confirmação da prenhez.



192 **Figura 1:** Representação esquemática do protocolo de sincronização do estro e ovulação de 72 fêmeas da raça
 193 Santa Inês. D0: dia do início do protocolo, momento em que foi introduzido o dispositivo intravaginal (CIDR®,
 194 Pfizer, Guarulhos, Brasil); D7: sétimo dia do protocolo, aplicação de 300 UI de Gonadotrofina coriônica Equina
 195 (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,125mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD
 196 Saúde Animal, São Paulo, Brasil); D8: oitavo dia do protocolo, retirada do CIDR; D9: nono dia do protocolo,
 197 aplicação de 200 UI de Gonadotrofina coriônica Humana (hCG, Chorulon®, MSD Saúde Animal, São Paulo,
 198 Brasil); D10: décimo dia do protocolo - inseminação artificial por tempo fixo (IATF) D40: avaliação
 199 ultrassonográfica das fêmeas inseminadas.

200 *5.2.7 Análise estatística*

201

202 As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o Statistical Analysis System
203 (SAS) - versão 9.0 (2002). Para os parâmetros espermáticos, primeiro foi realizada uma
204 análise descritiva, sendo os resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão. A
205 normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk.
206 Todos os parâmetros estudados apresentaram distribuição não normal (TM, PM, VCL,
207 VAP, VSL, ALH, LIN, STR, BCF, HYPERACT, DIC, IP) e por isso foi utilizado o teste
208 de Kruskal-Wallis para a verificação de possíveis diferenças dos parâmetros
209 espermáticos, entre os grupos experimentais analisados. As taxas de gestação nos grupos
210 experimentais foram comparadas por meio de estudo de dispersão de frequências,
211 utilizando-se o teste qui-quadrado (X^2). O nível de significância adotado para todas as
212 análises foi de 5%.

213

214

215 **5.3 Resultados**

216

217 As análises dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento
 218 demonstraram que não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle
 219 (Tabela 1). Não houve efeito individual ($P>0,05$) dos carneiros sobre os resultados
 220 espermáticos encontrados.

221

222

223 **Tabela 1**

224 Parâmetros de cinética espermática de ovinos Santa Inês, avaliados após a congelação-descongelamento em
 225 diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida.

PARÂMETROS	TRATAMENTOS							
	<i>In Natura</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MT (%)	85,5% ± 0,6 ^a	51,4 ± 21,8 ^b	51,4 ± 24,3 ^b	50,1 ± 18,7 ^b	53,6 ± 21,5 ^b	52,3 ± 21,6 ^b	52,8 ± 24,3 ^b	46,9 ± 23,2 ^b
MP (%)	-	10,2 ± 8,6	8,5 ± 5,3	8,1 ± 5,2	9,9 ± 6,0	8,9 ± 6,1	7,0 ± 5,0	6,7 ± 4,0
VCL (µm/s)	-	58,3 ± 15,1	51,8 ± 14,7	57,8 ± 17,5	56,2 ± 14,9	53,3 ± 14,1	49,7 ± 19,5	50,0 ± 15,8
VAP (µm/s)	-	37,9 ± 16,6	31,8 ± 11,8	36,8 ± 16,8	35,5 ± 12,9	31,9 ± 10,9	30,7 ± 13,8	29,4 ± 10,4
VSL (µm/s)	-	27,3 ± 17,5	22,4 ± 9,9	25,8 ± 16,3	25,2 ± 11,7	22,1 ± 9,9	20,9 ± 10,9	19,9 ± 7,8
ALH (µm)	-	3,6 ± 0,7	3,6 ± 0,9	3,5 ± 0,5	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,8
LIN (%)	-	43,6 ± 16,7	42,0 ± 9,2	42,0 ± 12,6	43,4 ± 12,4	40,2 ± 9,9	38,7 ± 11,5	39,4 ± 7,0
STR (%)	-	67,2 ± 12,5	68,8 ± 7,2	66,9 ± 9,7	68,8 ± 8,9	67,1 ± 8,0	64,8 ± 10,9	67,0 ± 5,8
BCF (Hz)	-	8,5 ± 1,7	8,8 ± 2,5	8,8 ± 1,4	8,9 ± 1,6	9,5 ± 1,7	9,9 ± 3,3	8,9 ± 1,9
HYPERACT (%)	-	6,8 ± 8,5	5,5 ± 4,4	5,4 ± 5,1	6,2 ± 5,0	5,2 ± 4,5	4,6 ± 3,6	3,9 ± 2,6

227 **G1: GLY6%; G2: DMA3%; G3: GLY5%+DMA1%; G4: GLY4%+DMA2%; G5: GLY3%+DMA3%; G6:**
 228 **GLY2%+DMA4%; G7: GLY1%+DMA5%. MT = Motilidade total; MP = Motilidade Progressiva; VCL**
 229 **= Velocidade curvilinear; VAP = Velocidade do percurso médio; VSL = Velocidade em linha reta; ALH**
 230 **= Deslocamento lateral de cabeça; LIN = Linearidade; STR = Retilinearidade; BCF = Frequência de**
 231 **batimento flagelar cruzado e HYPERACT = Hiperatividade.**

232 *Não houve diferenças entre os parâmetros avaliados através do teste de Kruskal-Wallis ($P>0,05$).*

233

234

235 Assim como observado para a cinética espermática, observa-se com a Tabela 2
 236 que os parâmetros de integridade de membrana plasmática, não diferiram ($P>0,05$) entre
 237 as amostras de sêmen criopreservadas com diferentes concentrações de glicerol e
 238 dimetilacetamida.

239

240

241

242

243 **Tabela 2**
 244 Parâmetros de integridade da membrana plasmática de células espermáticas de ovinos Santa Inês, avaliados
 245 após a congelação-descongelação, com diferentes concentrações de glicerol e dimetilacetamida.

PARÂMETROS	TRATAMENTOS						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Lesadas	75,6 ± 12,9	64,9 ± 14,9	72,7 ± 10,2	65,1 ± 15,0	69,1 ± 14,9	76,0 ± 14,0	75,5 ± 15,3
Não lesadas	19,7 ± 11,5	28,4 ± 15,7	22,3 ± 9,1	29,4 ± 14,0	24,3 ± 14,1	17,9 ± 13,6	16,9 ± 15,3

246 **G1:** GLY6%; **G2:** DMA3%; **G3:** GLY5%+DMA1%; **G4:** GLY4%+DMA2%; **G5:** GLY3%+DMA3%; **G6:**
 247 GLY2%+DMA4%; **G7:** GLY1%+DMA5%.

248 **IP** = Iodeto de Propídio; **DIC** = Diacetato carboxifluoresceína.

249 Não houve diferenças entre os parâmetros avaliados através do teste de Kruskal-Wallis ($P>0,05$).

250

251 Para o teste de fertilidade *in vivo*, observou-se que o escore corporal das fêmeas
 252 do estudo não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos experimentais. Os resultados observados
 253 *in vitro* repetiram-se *in vivo*, cuja avaliação da fertilidade do sêmen congelado após a
 254 inseminação artificial em tempo fixo, por laparoscopia, não diferiu ($P>0,05$),
 255 independente do grupo experimental utilizado. Para as fêmeas inseminadas com o sêmen
 256 do grupo controle (G1, GLY6%), o percentual de fêmeas gestantes foi de 36,1% e,
 257 resultado semelhante ao obtido com o tratamento G3 (GLY5%+DMA1%).

258

259 5.4 Discussão

260

261 As amidas e o glicerol são crioprotetores penetrantes responsáveis pela
 262 crioproteção das células espermáticas, porém as amidas apresentam pesos moleculares
 263 menores que o glicerol, e são mais permeáveis à membrana plasmática, assim como
 264 tendem a induzir menor choque osmótico às células após a descongelação, o que provoca
 265 menores danos [1]. Entretanto, no presente estudo, o menor estresse osmótico esperado
 266 para os grupos com a DMA isolada ou em maiores concentrações associada ao glicerol
 267 não foi demonstrada, cujos parâmetros de cinética espermática computadorizada
 268 avaliados, apresentaram-se semelhantes ($P>0,05$), independente do grupo experimental
 269 analisado. A queda na motilidade espermática total quando comparado ao sêmen fresco
 270 foi observada em todos os tratamentos, independente da concentração ou crioprotetor
 271 utilizado, que pode estar associada à perda de componentes intracelulares ou de lesões
 272 estruturais na cauda dos espermatozoides [19].

273 A eficiência da associação do DMA com o glicerol (GLY) foi testada para a
 274 criopreservação do sêmen equino [4]. Os autores observaram que a cinética espermática
 275 através do CASA foi beneficiada ($P<0,05$) quando houve associação do DMA e do GL,

276 quando comparado a utilização do GLY sozinho. Ainda segundo os autores, o resultado
277 superior ($P < 0,05$) da DMA sobre o glicerol no estudo, deveu-se a utilização de um maior
278 número de cavalos com baixa tolerância ao glicerol, conhecidos como *bad freezers*.

279 Neste estudo, observou-se que a interação entre o DMA e o glicerol não promoveu
280 efeito deletério sobre a célula espermática ovina, diferente do que foi encontrado em
281 trabalho com Javalis [22], no qual o DMA, quando associado ao glicerol, afetou
282 negativamente a crioproteção das células espermáticas, aumentando a formação de
283 cristais de gelo intracelular bem como o aumento da citotoxicidade. É importante
284 considerar que existem diferenças estruturais de membrana plasmática espermática entre
285 espécies distintas [23], bem como suas diferentes interações com os componentes
286 presentes no diluidor, como o sêmen ovino que em comparação ao dos equinos,
287 apresentam resultados melhores pós-descongelção, quando é utilizado o glicerol em
288 concentrações mais elevadas [24].

289 Foi observado que altas concentrações do DMA (6%) no meio diluidor causam
290 efeitos deletérios à viabilidade da célula espermática ovina, pós-descongelção [10].
291 Resultados semelhantes foram observados em ovinos [25] utilizando-se a acetamida no
292 meio diluidor (3% e 5%). Os autores verificaram que esta amida causou efeito deletério
293 sobre a motilidade progressiva, a integridade de membrana acrossomal e plasmática,
294 provavelmente pela maior permeabilidade à membrana plasmática e consequente elevada
295 concentração dentro das células, causando danos irreversíveis [25]. Porém, no presente
296 trabalho não foram observados efeitos deletérios sobre a integridade de membrana
297 espermática na concentração de 5% de DMA no meio diluidor.

298 Estas variações entre os achados nos diferentes trabalhos podem ser justificadas,
299 pois, sabe-se que o efeito deletério do crioprotetor sobre a membrana plasmática
300 espermática também está correlacionado ao método de criopreservação, que pode levar à
301 desestabilização da membrana plasmática de tal forma que favorece a ação citotóxica do
302 crioprotetor [26].

303 Quando o processo de criopreservação é rápido, facilita a ação do DMA em
304 comparação ao glicerol, pois o DMA penetra a membrana plasmática com maior
305 facilidade e, portanto, causa uma maior crioproteção à célula de maneira ágil, ao contrário
306 do glicerol que tem uma penetração mais lenta, e por isso, um método mais prolongado
307 seria favorável para a crioproteção celular utilizando esse crioprotetor [24]. Apesar de

308 dificultar a comparação com outros trabalhos e suas particularidades na metodologia do
309 processamento, no presente experimento, todo processo de criopreservação foi similar,
310 independente do tratamento utilizado, de forma que o efeito do método não pôde ser
311 estudado, além do que, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) sobre os parâmetros de
312 cinética e integridade celular, entre os grupos.

313 As avaliações utilizadas *in vitro* para a análise seminal tem o objetivo de prever
314 o potencial de fertilidade do espermatozoide *in vivo*, contudo nem todas as avaliações
315 apresentam alta correlação com a taxa de fertilidade, sendo a IA imprescindível para a
316 confirmação do potencial fértil do sêmen pós-descongelamento [27].

317 Assim, após a inseminação artificial com o sêmen congelado nos dois grupos de
318 diluidores (G1: GLY6% e G3: GLY5%+DMA1%), não foi observada diferença ($P>0,05$)
319 para a taxa de concepção das fêmeas inseminadas. Achados semelhantes foram
320 verificados em um trabalho realizado com sêmen de Javalis, que não obtiveram diferença
321 ($P>0,05$) entre os animais inseminados com sêmen em diluidor contendo GLY (3%) e
322 meio diluidor contendo GLY (3%) + DMA (1%). Os autores citaram que a quantidade de
323 fêmeas inseminadas ($n=7$) pode ter dificultado a constatação de diferença entre os grupos
324 [22], fato que não influenciou no presente experimento, já que o número de fêmeas foi o
325 suficiente para demonstrar qualquer diferença entre os grupos, caso houvesse.

326 É de conhecimento que vários fatores podem interferir na taxa de concepção das
327 ovelhas inseminadas, dentre eles estão o escore corporal dessas fêmeas, o tipo de
328 protocolo utilizado [28], a experiência do inseminador [29], a qualidade do sêmen pós
329 descongelamento e época do ano [30]. E todos os fatores citados foram controlados para
330 ambos os grupos.

331 A taxa de concepção deste trabalho (36,11%) foi moderadamente inferior ao que
332 se tem na literatura, com índices de 42% [31] e 50% [32], entretanto, os protocolos de
333 sincronização utilizados nos trabalhos citados foram diferentes, com maiores doses de
334 eCG, protocolos mais longos, com dois manejos e com inseminações realizadas no 13º
335 dia. Tais fatores podem ter influenciado as taxas de concepção pós-inseminação.

336 Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram observados após a
337 inseminação de ovelhas [10] com sêmen congelado com diluidores contendo amida (3%)
338 e glicerol (6%), sozinhos. Segundo os autores, a utilização das amidas demonstrou que,
339 para ovinos, as amidas podem ser consideradas alternativas seguras para criopreservação

340 de espermatozoides, pois não comprometeram as taxas de fertilidade pós-inseminação.
341 Os achados deste trabalho corroboram com os citados, já que com a associação do glicerol
342 e a DMA não foram promovidas melhorias nas taxas de concepção, quando comparado
343 ao sêmen congelado com o glicerol sozinho, ratificando os achados de cinética
344 computadorizada e viabilidade espermática *in vitro*.

345

346 **5.5 Conclusão**

347

348 Concluiu-se que a dimetilacetamida, independente da concentração utilizada, não
349 diferiu do glicerol para a criopreservação do sêmen ovino, após análises dos parâmetros
350 *in vitro* e *in vivo*, podendo ser utilizada em substituição ao glicerol quando houver uma
351 necessidade e/ou oportunidade de uso.

352

353 **5.6 Conflito de interesse**

354

355 Os autores declaram não haver conflito de interesses.

356 5.7 Referências Bibliográficas

357

- 358[1] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as
359 cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*,
360 2005;89:105-113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- 361[2] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*,
362 2000;62:77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- 363[3] Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S,
364 Kashiwazaki N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol
365 through artificial insemination in the Japanese White Rabbits. *Experimental Animals*,
366 2007;56:29-34. <https://doi.org/10.1538/expanim.56.29>
- 367[4] Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of
368 stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 2002;58:1-4.
369 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00898-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00898-1)
- 370[5] Melo C, Zahn F, Martin I, Orlandi C, Dell'aqua Jr J, Alvarenga MA, Papa FO. Influence
371 of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion
372 spermatozoa. *Journal Equine Veterinarian Science*, 2007;27:171-175.
373 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2007.02.008>
- 374[6] Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. Data on the
375 positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved
376 chicken sperm. *Data in Brief*, 2016;9:1118-1121.
377 <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.059>
- 378[7] Varela Junior AS, Corcini, CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia JRT, Streit Jr DP,
379 Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of
380 tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 2012;78:244-251.
381 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.029>
- 382[8] Alves JP, Corcini CD, Silva EF, Caldas JS, Cardoso TF, Piedras SRN, Jardim RD, Varela
383 Junior AS. The role of amides in seminal cryopreservation of wild silverside, *Odontesthes*
384 *bonariensis*. *Cryobiology*, 2016;73:383-387.
385 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.001>
- 386[9] Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim RR, Corcini CD. Evaluation
387 of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation.
388 *Theriogenology*, 2008;69:632-638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.012>
- 389[10] Bittencourt RF, Oba E, Biscarde CEA, Azevedo HC, Bittencourt MV, Menezes
390 GFO, Lima AS, Fuchs KM, Ribeiro Filho AL. Dimethylacetamide and trehalose for ram
391 semen cryopreservation. *Cryobiology*, 2018;85:1-6.
392 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266>
- 393[11] Henry M, Neves JP, Jobim MIM. *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*.
394 *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte,
395 Minas Gerais, Brasil, 104p, 2013.
- 396[12] Cedenho AP, Tokunaga IM. Coloração supravital para espermatozoides:
397 comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina / Comparison of supravital
398 staining techniques for spermatozoa: eosin and eosin-nigrosin. *Jornal Brasileiro de*
399 *Urologia*; 1995;16:234-236.
- 400[13] Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE,
401 Leal LS, Oba E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja
402 sobre a congelabilidade do sêmen caprino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*
403 *Animal Science*, 2008;45:305-312. ISSN 1678-4456

- 404[14] Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Vasconcelos MF,
405 Biscarde CA, Bicudo SD. Trehalose and a calcium chelator for ram semen
406 cryopreservation. *Archives of Veterinary Science*, 2014;19:69-77.
407 <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v19i2.31064>
- 408[15] Lucidi P, Barboni B, Mattioli M. Ram-induced ovulation to improve artificial
409 insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, 2001;55:1797-
410 1805. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00522-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00522-2)
- 411[16] Cavalcante TV, Esper CR, Azevedo HC, Cordeiro MF. Análise Computadorizada
412 (Casa) e convencional da Motilidade Espermática de Sêmen Caprino das Raças Boer e
413 Alpina no Outono e Primavera. *Ars Veterinaria*, 2005;21:203-208.
414 <http://doi.org/10.15361/2175-0106.2005v21n4p203-208>
- 415[17] Davis RO, Katz D. Standardization and comparability of CASA instruments.
416 *Journal of Andrology*, 1992;13:81-86. [http://doi.org/10.1002/j.1939-
417 4640.1992.tb01632.x](http://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb01632.x)
- 418[18] Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm
419 motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, 2013;112:128-135.
420 <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014>
- 421[19] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane
422 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*, 1990;88:343-352.
423 <http://doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>
- 424[20] Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Asumpcao M, Muino-
425 Blanco T, Cebrian-Perez JA, Perez-Pe R. Quality characteristics and fertilizing ability of
426 ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *Journal
427 of Chromatography B*, 2012;880:74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.019>
- 428[21] Killen, ID; Caffery, GJ. Uterine insemination of ewes with the aid of a
429 laparoscope. *Australian Veterinary Journal*, 1982; 59:95.
430 <https://doi.org/10.1017/S002185960004168X>
- 431[22] Thurston LM, Holt WV, Watson PF. Post-thaw functional status of boar
432 spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison.
433 *Theriogenology*, 2003;60:101-113. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01331-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01331-6)
- 434[23] Ladha, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell,
435 the mammalian spermatozoon, *Journal of Membrane Biology*, 1998;165:1-10.
436 <https://doi.org/10.1007/s002329900415>
- 437[24] Vidament, M, Vincent, P, Martin, FX, Magistrini, M, Blesbois E. Differences in
438 ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol
439 or not, *Animal Reproduction Science*, 2009;112:22-35.
440 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.016>
- 441[25] Silva, E.C.B.; Cajueiro, J.F.P.; Silva, S.V.; Vidal, A.H.; Soares, P.C.; Guerra,
442 M.M.P. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or
443 acetamide. *Animal Reproduction Science*, 2012;132:155-158.
444 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.014>
- 445[26] Li YH, Cai KJ, Kovacs A, Ji WZ. Effects of various extenders and permeating
446 cryoprotectants on cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*)
447 spermatozoa. *J. Androl.* 2005;26:387-395. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04147>
- 448[27] Wu TW, Cheng FP, Chen IH, Yang CH, Tsai MY, Chang MH, Wang JH, Wu JT.
449 The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cyroprotectants
450 and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reproduction in
451 Domestic Animals*, 2013;48:53-58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02022.x>

- 452[28] [Hill, JR, Thompson, JA, Perkins, NR, Factors affecting pregnancy rates following](#)
453 [laparoscopic insemination of 28447 Merino ewes under commercial conditions.](#)
454 [Theriogenology, 1998;49:697–708. \[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\\(98\\)00019-3\]\(https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00019-3\)](#)
- 455[29] Godfrey, RW, Collins, JR, Hensley, EL, Wheaton, JE.. Estrus synchronization and
456 artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology*, 1999;51: 985–
457 997. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00044-8)
- 458[30] Anel, L, Kaabi, M, Abroug, B, Alvarez, M, Anel, E, Boixo, JC, de la Fuente, LF,
459 de Paz, P. Factor influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial
460 insemination in Churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 2005;63:1235–1247.
461 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.001>
- 462[31] Masoudi R, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M.
463 Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-
464 thawed semen. *Cryobiology*, 2017;74:77-80.
465 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>
- 466[32] Rabassa, VR.; Tabeleão, VC.; Pfeifer, LFM.; Schneider, A; Zieger, EA.;
467 Schossler, ED.; Severo, NC.; Pino, FAB.; Corrêa, MV. Efeito das técnicas transcervical
468 e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. *Ciência*
469 *Animal Brasileira*, 2007;8:127-133.
470

1 **6 CAPÍTULO 2 Fertilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com a**
2 **dimetilformamida associada ou não ao glicerol.**

3
4 RESUMO

5
6 O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da utilização da dimetilformamida
7 (DMF) em diferentes concentrações, associadas ou não ao glicerol (GLY), na confecção
8 de diluidores para criopreservação espermática, sobre os parâmetros espermáticos *in vitro*
9 e índice de fertilidade *in vivo* do sêmen ovino pós-descongelamento. Foram utilizados 25
10 ejaculados de ovinos da raça Santa Inês, divididos entre sete tratamentos para posterior
11 criopreservação. Os tratamentos apresentavam diferentes concentrações de DMA e GL:
12 G1: GLY6%; G2: DMF3%; G3: GLY5%+ DMF1%; G4: GLY4%+DMF2%; G5:
13 GLY3%+DMF3%; G6: GLY2%+DMF4%; G7: GLY1%+DMF5%. Após a
14 descongelamento das palhetas, alíquotas foram avaliadas quanto a cinética espermática
15 através da análise computadorizada do sêmen - CASA e da integridade de membrana
16 através da citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do
17 Statistical Analysis System – SAS com nível de significância de 5%. Não foram
18 verificadas diferenças ($P>0,05$), para os parâmetros de cinética espermática
19 computadorizada, entretanto para a análise de integridade de membrana o grupo G4 foi
20 superior ($P<0,05$) em relação ao grupo G7, sendo assim esse foi o tratamento utilizado no
21 teste *in vivo*, feito por inseminação laparoscópica. O teste de fertilidade não mostrou
22 diferença entre os tratamentos ($P>0,05$). Conclui-se que a dimetilformamida na
23 concentração e associação testada pode ser utilizada para a criopreservação de
24 espermatozoides ovinos, por proporcionarem índices adequados de concepção das fêmeas
25 inseminadas.

26 **Palavras-chave:** crioprotetores, sêmen, amidas, biotecnologia da reprodução.

27 _____
28 ² Capítulo realizado no formato da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia da editora FEPMVZ
29 da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. QUALIS-CAPES: A2 Formatação da
30 revista no Anexo 2.

32 **Fertility of ovine spermatozoa cryopreserved with dimethylformamide associated or**
33 **not with glycerol.**

34

35

ABSTRACT

36

37 The objective of the present work was to evaluate the effect of the use of
38 dimethylformamide (DMF) in different concentrations, associated or not to glycerol
39 (GLY), in the preparation of diluents for sperm cryopreservation, through in vitro sperm
40 parameters post-thawing and in vivo fertility of ram semen. Twenty-five ejaculates of
41 Santa Inês sheep were used, divided into seven treatments for subsequent
42 cryopreservation. The treatments presented different concentrations of DMA and GL: G1:
43 GLY6%; G2: DMF3%; G3: GLY5% + DMF1%; G4: GLY4% + DMF2%; G5: GLY3%
44 + DMF3%; G6: GLY2% + DMF4%; G7: GLY1% + DMF5%. Samples of the
45 experiments were evaluated after thawing, for sperm kinetics through computer assisted
46 sperm analysis and membrane integrity by flow cytometry. The results were analyzed
47 through the Statistical Analysis System - SAS with significance level of 5%. There were
48 no differences ($P > 0.05$) for the parameters of computerized sperm kinetics, however for
49 the membrane integrity analysis the G4 group was higher ($P < 0.05$) than the G7 group.
50 The fertility test showed no difference between treatments ($P > 0.05$). It is concluded that
51 dimethylformamide in the concentration and association tested can be used for the
52 cryopreservation of ovine spermatozoa, since they provide adequate conception rates of
53 the inseminated females.

54 **Kew-words:** extenders, spermatozoa, amides, reproduction biotechnology.

55

56 ² Chapter carried out in the format of the magazine Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Animal Science of
57 the FEPMVZ publishing house of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais - UFMG. QUALIS-
58 CAPES: A2 Formatting the journal in Annex 2.

INTRODUÇÃO

59

60

61 Os programas de melhoramento genético têm demandado uma maior utilização
62 da inseminação artificial (IA), conseqüentemente se faz necessário o aperfeiçoamento da
63 criopreservação espermática (WATSON, 2000), a qual possibilita o armazenamento do
64 sêmen de animais por tempo indeterminado (SALAMON, MAXWELL, 2000), além de
65 promover e difundir material genético de animais com alto valor zootécnico (LEBOEUF
66 *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2010). Entretanto, inúmeros fatores podem interferir nesse
67 processo complexo que essa biotecnologia reprodutiva necessita (WATSON, 2000;
68 PURDY, 2006).

69 Entre os principais fatores que podem interferir na qualidade seminal pós-
70 descongelação, destacam-se o tipo de diluente, o método de adição e a concentração de
71 crioprotetores (SALAMON; MAXWELL, 1995; CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).
72 Assim, diferentes meios diluidores têm sido utilizados com o intuito de minimizar as
73 crioinjúrias sobre a célula espermática ovina (BITTENCOURT *et al.*, 2013; SALAMON;
74 MAXWELL, 1995; SALAMON; MAXWELL, 2000). Os crioprotetores penetrantes, que
75 estão presentes nos diluidores para congelação, tem influência direta nos índices de
76 fertilidade do sêmen ovino congelado. Estes agentes são essenciais para a
77 criopreservação, por possibilitarem a sobrevivência dos espermatozoides durante
78 processo de congelação-descongelação (AMANN; PICKET, 1987).

79 Dentre os crioprotetores penetrantes, as amidas têm sido utilizadas com sucesso
80 em diferentes espécies, como ratos (OKUDA *et al.*, 2007), equinos (ALVARENGA *et*
81 *al.*, 2005), peixes (VARELA JUNIOR *et al.*, 2012) e também em ovinos (MOUSTACAS
82 *et al.*, 2011), contudo, trabalhos utilizando sêmen ovino criopreservado com
83 dimetilformamida para o teste de fertilidade *in vivo* são escassos, por isso o presente
84 trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da dimetilformamida em diferentes
85 concentrações nos meios diluidores associadas ou não ao glicerol sobre a viabilidade
86 espermática ovina *in vitro* e *in vivo* pós-descongelação.

87

MATERIAL E MÉTODOS

88

89

90 Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
91 Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal
92 da Bahia, protocolo: 41/2014. O experimento foi realizado em diferentes localidades, de
93 acordo com as etapas de pesquisa. A criopreservação do sêmen foi realizada na Fazenda
94 Experimental do Município de Entre Rios – Ba, região com latitude 11°56'31" sul,
95 longitude 38°05'04" oeste e no Laboratório de Reprodução Animal, com latitude
96 13°00'16.7" sul, 38°30'31.6" oeste, pertencentes à Escola de Medicina Veterinária e
97 Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA. Foram utilizados 25 ejaculados de
98 cinco ovinos adultos da raça Santa Inês, com escore corporal de 3 (na escala de 1-5),
99 clinicamente sadios e aprovados no exame andrológico, os quais foram mantidos a pasto
100 de *Brachiária decumbens*, suplementados com sal mineral específico para a espécie e
101 com fornecimento de água *ad libitum*.

102 As colheitas do sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, utilizando
103 uma fêmea como manequim. Após a colheita, a amostra de sêmen foi avaliada quanto ao
104 volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática. Os ejaculados que não
105 apresentaram conformidade com o pregonizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução
106 Animal - CBRA (HENRY; NEVES; JOBIM, 2013) para sêmen *in natura* foram
107 descartados.

108 Para o cálculo da concentração espermática, empregou-se a câmara de Neubauer,
109 com sêmen diluído na proporção de 10µL para 3990µL (1:400) de água deionizada.
110 Também foram coletadas alíquotas para realização do teste supravital com corante eosina
111 - EOS (CEDENHO; TOKUNAGA, 1995).

112 O ejaculado foi diluído em meio contendo Tris-gema de ovo (BITTENCOURT *et*
113 *al.*, 2008) acrescido de dois crioprotetores: o glicerol e a dimetilformamida, sozinhos ou
114 em associações, respeitando o limite máximo de 5% da dimetilformamida. Para tanto,
115 foram formados sete grupos experimentais:

116 G1 - glicerol a 6% (GLY6%);

117 G2 - dimetilformamida a 3% (DMF3%);

118 G3 - glicerol a 5% e dimetilformamida a 1% (GLY5%+DMF1%);

119 G4 - glicerol a 4% e dimetilformamida a 2% (GLY4%+DMF2%);

120 G5 - glicerol a 3% e dimetilformamida a 3% (GLY3%+DMF3%);

121 G6 - glicerol a 2% e dimetilformamida a 4% (GLY2%+DMF4%);

122 G7 - glicerol a 1% e dimetilformamida a 5% (GLY1%+DMF5%).

123 O G2 foi utilizado como meio controle para utilização do DMF, com base em
124 resultados de estudos anteriores realizados pela equipe de pesquisa.

125 O sêmen diluído em cada grupo experimental foi envasado em palhetas francesas
126 (0,25mL), com a concentração de 100×10^6 espermatozoides. Na sequência, as amostras
127 foram levadas a um refrigerador (Modelo 518C, Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre,
128 Brasil), submetidas a refrigeração a 5°C (0,46°C/min) a onde permaneceram por um
129 período de duas horas, correspondendo ao tempo de equilíbrio (BITTENCOURT *et al.*,
130 2014). Para a curva de resfrição negativa as palhetas, contendo sêmen refrigerado,
131 foram transferidas para uma caixa de isopor com capacidade de 37 litros (32 cm de altura,
132 29 cm de largura e 38 cm de comprimento), contendo nitrogênio líquido (N₂L) a uma
133 altura de 3 cm. As palhetas foram expostas ao vapor de N₂L durante 20 minutos, sendo
134 posteriormente submersas (-196 °C) (BITTENCOURT *et al.*, 2008). As palhetas
135 previamente identificadas foram colocadas em raques, imersas em N₂L e armazenadas
136 dentro de um botijão criogênico.

137 As amostras seminais foram descongeladas em um banho-maria à 37°C por 30
138 segundos. Após a descongelação, o sêmen de cada grupo foi depositado em microtubos
139 (1,5mL), previamente aquecidos e mantidos à 37°C.

140 A cinética espermática foi avaliada no Laboratório de Reprodução Animal da
141 Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, utilizando-se o sistema de análise
142 computadorizada de sêmen - CASA (*Sperm Class Analyzer SCA*®, Microoptics, S.L.
143 Versão 5.1, Barcelona, Espanha), configurado com *set-up* para ovinos: Área da partícula
144 de 3 a 70µm², classificado quanto à velocidade em lento quando tinham velocidade entre
145 10 e 45 µm/s, médio entre 45 e 75 µm/s e rápidos acima de 75 µm/s; progressivos quando
146 obtinham mais de 80% de retilinearidade (STR); circular quando obtinham menos que
147 50% de linearidade (LIN); a hiperatividade (HYPERACT) foi calculada quando a
148 velocidades curvilínea (VCL) = 35 a 500 µm/s, STR = 85 a 100% e o deslocamento
149 lateral de cabeça (ALH) = 2,5 a 100 µm.

150 Uma alíquota retirada da amostra descongelada foi diluída em tampão fosfato-
151 salino – PBS (CAVALCANTE *et al.*, 2005), a fim de se obter uma concentração final da

152 diluição de aproximadamente 48×10^6 sptz/mL (DAVIS; KATZ, 1992). Após cinco a dez
153 minutos de incubação (37 °C), 5 μ L do sêmen diluído (PALACÍN *et al.*, 2013) foram
154 transferidos para preparação entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas (37°C), e
155 levados para análise no microscópio (Eclipse 50i, Nikon®, Tóquio, Japão), sob aumento
156 de 100x. Imagens de quatro campos diferentes foram capturadas através de uma câmera
157 (602fc, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha), totalizando 100 imagens/segundo/campo,
158 com contagem mínima de 250 células.

159 Foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade total (MT, %) e progressiva (MP, %), velocidades curvilínea (VCL, μ m/s) e do percurso médio (VAP, μ m/s) e em linha reta (VSL, μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz) e hiperatividade (HYPERACT, %).

164 A avaliação da integridade de membrana plasmática foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde - ICS da UFBA. 165 As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo (BD FACSCalibur®, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). Foram utilizadas duas sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC, 21879, Sigma Aldrich), que fluoresce em verde, e iodeto de propídeo (IP, P4170, Sigma Aldrich), que fluoresce em vermelho, presentes em uma solução de trabalho que continha PBS®, DIC na 169 concentração final de 20,0 μ M e IP na concentração final de 15 μ M (HARRISON, VICKERS, 1990). 172

173 Foram adicionados 5 μ L de IP e 5 μ L de DIC a cada amostra de 200 μ l de sêmen diluído em PBS, a uma concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL em cada tubo 174 criogênico. Os espermatozoides foram classificados como não lesados (DIC+/IP-) e lesados (DIC+/IP+; DIC-/IP+; DIC-/IP-). 176

177 Foram utilizadas 71 fêmeas ovinas Santa Inês com escore corporal 3 (na escala de 178 1-5), clinicamente sadias, pertencentes à Fazenda Experimental de Entre Rios da 179 Universidade Federal da Bahia. Estes animais eram mantidos a pasto de *Brachiária decumbens*, suplementadas com sal mineral específico para a espécie e com fornecimento 180 de água *ad libitum*. Todas passaram por uma avaliação prévia, clínica e ginecológica, bem 181 como, seguiram um calendário de vacinação e vermifugação. Essas fêmeas foram 182

183 divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais denominados em Grupo 1 e
184 Grupo 4 inseminadas por laparoscopia (KILLEN, CAFFERY. 1982).

185 Grupo 1: 36 fêmeas inseminadas com o sêmen congelado com o diluidor Tris-gema
186 acrescido de glicerol a 6% (GLY6%);

187 Grupo 4: 35 fêmeas inseminadas com o sêmen congelado com o diluidor Tris-gema
188 de ovo acrescido de glicerol a 4% e dimetilformamida a 2% (GLY4%+DMF2%).

189 O tratamento escolhido para ser utilizado na inseminação foi aquele que obteve
190 melhores valores numéricos quanto a integridade da membrana plasmática na citometria
191 de fluxo (G4) e que diferiu estatisticamente ($P>0,05$) do G7.

192 As ovelhas foram sincronizadas utilizando-se protocolo curto, que se iniciou no dia
193 zero (D0), com a colocação de dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona
194 (CIDR®, Pfizer, Guarulhos, Brasil) e com o qual permaneceram por oito dias. No D7 foi
195 realizada a administração por via intramuscular (IM) de 300UI de gonadotrofina
196 coriônica equina (eCG, Novormon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 0,125mg
197 de cloprostenol sódico (PGF2 α , Ciosin®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Após
198 34 horas da retirada do P4 (D9), foram administradas 200UI de gonadotrofina coriônica
199 humana (hCG, Chorulon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) por via IM. No D10,
200 aproximadamente 52 horas após retirada do dispositivo intravaginal, foram realizadas as
201 inseminações intrauterinas laparoscópicas (KILLEN, CAFFERY. 1982). de acordo com
202 os tratamentos utilizados. Todos os animais foram avaliados por ultrassonografia
203 transretal, no modo B, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5MHz
204 (Mindray DP-50 Vet, Shenzhen, China) 30 dias após às inseminações para a confirmação
205 da prenhez.

206 As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o Statistical Analysis System
207 (SAS) - versão 5.0 (1996). Para os parâmetros espermáticos, primeiro foi realizada uma
208 análise descritiva, sendo os resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão. A
209 normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk.

210 Os parâmetros que apresentaram normalidade foram: VCL, VAP, VSL, utilizando
211 para a comparação das médias a análise de variância (ANOVA), com teste de Student
212 Newman Keuls para verificar as possíveis diferenças entre os diferentes grupos. Para os
213 outros parâmetros espermáticos que não apresentaram distribuição normal (MT, MP,

214 ALH, LIN, STR, BCF, HYPERACT, DIC, IP) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis,
215 seguido do teste de Bonferroni para verificar diferença inter-grupos.

216 As taxas de gestação nos grupos experimentais foram comparadas por meio de um
217 estudo de dispersão de frequências, utilizando-se o teste qui-quadrado (X^2).

218 O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%.

219

220 RESULTADOS E DISCUSSÃO

221

222 Na Tabela 1 estão representados os parâmetros da cinética espermática do sêmen
223 ovino, pós-congelação, com diferentes concentrações da dimetilformamida e do glicerol.

224 A análise estatística demonstrou que os tratamentos e o grupo controle não diferiram entre
225 si ($P>0,05$), mantendo uma equivalência em relação à qualidade da cinética espermática.

226

227 **Tabela 1.** Parâmetros de cinética espermática ovina, avaliados após a congelação em diferentes concentrações
228 de glicerol e dimetilformamida.

PARÂMETROS	TRATAMENTOS						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
MT (%)	43,7 ± 23,5	35,2 ± 24,4	44,4 ± 26,7	47,6 ± 27,9	48,9 ± 27,0	49,9 ± 29,5	36,5 ± 27,8
MP (%)	6,7 ± 3,9	4,9 ± 4,5	8,1 ± 6,3	8,0 ± 4,6	8,7 ± 5,4	8,5 ± 4,8	4,9 ± 4,1
VCL (µm/s)	56,7 ± 14,5	54,5 ± 16,5	58,9 ± 12,0	56,9 ± 14,0	57,0 ± 13,6	55,0 ± 20,6	45,7 ± 15,2
VAP (µm/s)	33,9 ± 10,1	31,3 ± 10,9	34,4 ± 7,4	33,4 ± 9,0	34,2 ± 10,4	31,8 ± 12,2	25,8 ± 10,1
VSL (µm/s)	22,9 ± 8,7	20,5 ± 9,3	23,4 ± 6,9	22,7 ± 8,0	24,0 ± 8,7	21,6 ± 8,3	17,2 ± 8,3
ALH (µm)	3,8 ± 0,7	3,7 ± 0,9	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,7	3,8 ± 1,0	3,9 ± 1,0	3,5 ± 0,7
LIN (%)	39,7 ± 8,6	36,7 ± 10,2	39,6 ± 8,7	39,4 ± 7,3	41,6 ± 8,6	38,1 ± 9,5	36,3 ± 6,9
STR (%)	66,2 ± 7,6	63,6 ± 13,0	67,0 ± 8,2	66,9 ± 7,2	69,6 ± 6,9	69,7 ± 9,5	65,0 ± 7,5
BCF (Hz)	9,3 ± 2,2	9,3 ± 2,9	10,1 ± 1,8	9,6 ± 1,7	9,9 ± 2,6	9,6 ± 2,7	9,2 ± 1,9
HYPERACT (%)	4,8 ± 3,6	3,2 ± 3,2	4,9 ± 3,6	5,1 ± 3,4	5,9 ± 3,9	5,4 ± 3,6	3,0 ± 2,7

229 **G1:** GLY6%; **G2:** DMF3%; **G3:** GLY5%+DMF1%; **G4:** GLY4%+DMF2%; **G5:** GLY3%+DMF3%; **G6:**
230 GLY2%+DMF4%; **G7:** GLY1%+DMF5%. **MT** = Motilidade total; **MP** = Motilidade Progressiva; **VCL** =
231 Velocidade curvilínea; **VAP** = Velocidade do percurso médio; **VSL** = Velocidade em linha reta; **ALH** =
232 Deslocamento lateral de cabeça; **LIN** = Linearidade; **STR** = Retilinearidade; **BCF** = Frequência de batimento
233 flagelar cruzado e **HYPERACT** = Hiperatividade.

234 Não houve diferenças entre os parâmetros avaliados ($P>0,05$).

235

236 Resultados similares foram encontrados por Medeiros *et al.* (2002), em equinos,
237 ao testarem a eficiência da associação da dimetilformamida (DMF) com o glicerol (GLY)
238 para a criopreservação do sêmen. Esses autores observaram que não houve alteração da

239 motilidade progressiva ($P>0,05$) entre o sêmen congelado com GLY sozinho ou associado
240 ao DMF. Os equinos parecem apresentar maior sensibilidade ao glicerol em comparação
241 aos ruminantes, aves e coelhos (ALVARENGA *et al.*, 2005).

242 Em ovinos, o glicerol é o crioprotetor mais utilizado para congelação do sêmen
243 (SALAMON, MAXWELL, 2000). Segundo Hammerstedt, Graham, Nolan (1990), as
244 membranas plasmáticas dos espermatozoides podem sofrer diferenças entre a quantidade
245 e o tipo de fosfolipídios, de acordo com a espécie, adquirindo características diferentes
246 em relação a estabilidade da membrana plasmática. Este fato pode explicar as diferentes
247 respostas entre as espécies, frente aos diferentes crioprotetores utilizados para a
248 criopreservação espermática.

249 Graças *et al.* (2013) utilizaram a metilformamida na formulação de meios
250 diluidores para ovinos e chegaram a conclusão que, em altas concentrações (7 e 9%), as
251 amidas apresentaram efeito tóxico sobre a célula espermática. Não foi possível observar
252 no presente trabalho, com a utilização de concentrações que variaram de 1 a 5% do DMF
253 no diluidor, demonstrando que dentro dessas concentrações não foi possível observar
254 citotóxicidade sobre as células espermáticas.

255 A crioinjúria pode estar relacionada com o processo de criopreservação utilizado
256 no experimento de Graças *et al.* (2013) que obtiveram uma curva de resfriamento mais
257 rápida do que no presente estudo, que foi mais lento e proporcionou uma melhor interação
258 entre o GLY e o DMF para a preservação da integridade de membrana plasmática.
259 Segundo Thurston, Holt e Watson (2003), o DMF tem uma penetração celular mais rápida
260 e o GLY tem uma penetração mais lenta e a velocidade da curva de congelação pode
261 interferir na qualidade da crioproteção celular desses compostos.

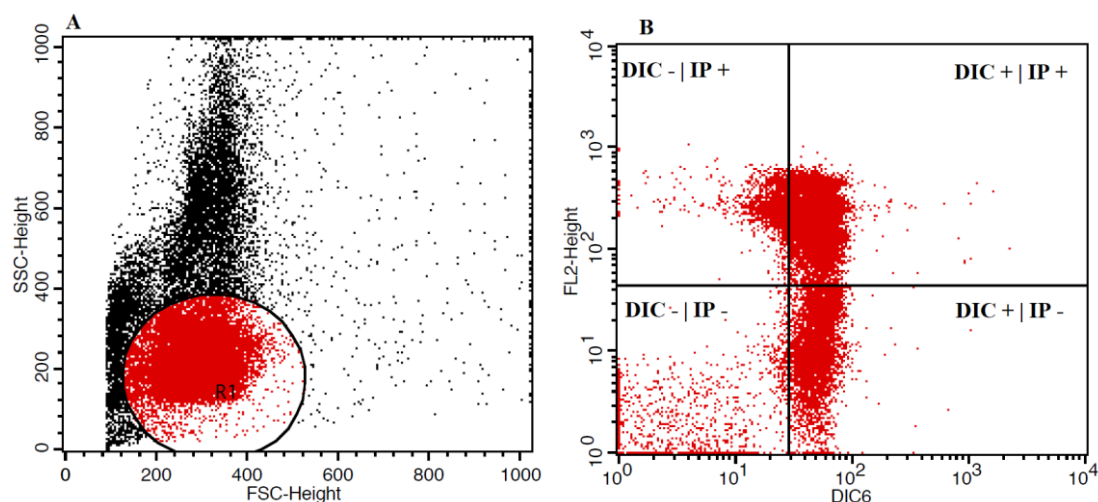
262 Esse possível efeito de sinergia entre GLY e DMF foi observado também em
263 trabalho realizado com equinos por Morillo Rodriguez *et al.* (2012), os quais relataram
264 superioridade ($P<0,05$) na motilidade total, com 27,5% no tratamento com a amida
265 associada ao GLY (2,5% de DMF + 1,5% de GLY) e 16,1% no tratamento utilizando
266 GLY sozinho (2,5 %).

267 Moustacas *et al.* (2011) testaram o DMF em diferentes concentrações (variando
268 de 1 a 4%), associada ou não ao glicerol, para a criopreservação espermática em ovinos.
269 Contudo, obtiveram resultados negativos na avaliação da motilidade total e integridade
270 da membrana plasmática ($P<0,05$), com a utilização da dimetilformamida em comparação

271 ao GLY (5%), sugerindo que o DMF se comportou de maneira tóxica para os animais
 272 avaliados. Diferente do que foi observado no presente experimento, no qual as
 273 características de cinética espermática não diferiram, independente da concentração de
 274 crioprotetor utilizada.

275 A Figura 1 é a representação gráfica da análise espermática após a citometria de
 276 fluxo, demonstrando como foram identificadas as células lesadas e íntegras.

277



278

279 **Figura 1.** Representação gráfica da análise espermática em citômetro de fluxo. (A): avaliação identificando
 280 o tamanho e a granulidade da célula. (B): avaliação dos espermatozoides corados com os fluocromos
 281 representados nos diferentes quadrantes, onde DIC+|IP+, DIC-|IP+ e DIC-|IP- são espermatozoides com
 282 membranas lesadas e DIC+|IP- espermatozoides com membranas íntegras.

283

284 Na Tabela 2 observam-se os resultados da integridade de membrana plasmática
 285 espermática, avaliada por citometria de fluxo. O tratamento G4 diferiu do tratamento G7
 286 ($P < 0,05$), entretanto ambos não diferiram dos demais tratamentos ($P > 0,05$).

287

288 **Tabela 2.** Parâmetros de integridade de membrana plasmática das células espermáticas ovina, avaliados
 289 após a congelação em diferentes concentrações de glicerol e dimetilformamida.

PARÂMETROS	TRATAMENTOS						
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Lesados (%)	77,1 ± 9,8 ^{ab}	75,5 ± 15,2 ^{ab}	76,7 ± 9,4 ^{ab}	70,9 ± 13,6 ^a	77,1 ± 10,6 ^{ab}	77,7 ± 13,5 ^{ab}	85,0 ± 9,2 ^b
Íntegros (%)	16,6 ± 8,3 ^{ab}	17,9 ± 14,8 ^{ab}	17,3 ± 8,3 ^{ab}	24,6 ± 13,0 ^a	16,3 ± 9,2 ^{ab}	15,9 ± 13,2 ^{ab}	8,5 ± 8,5 ^b

290 **G1:** GLY6%; **G2:** DMF3%; **G3:** GLY5%+DMF1%; **G4:** GLY4%+DMF2%; **G5:** GLY3%+DMF3%; **G6:**
 291 GLY2%+DMF4%; **G7:** GLY1%+DMF5%. **IP** = Iodeto de Propídio; **DIC** = Diacetato carboxifluoresceína.
 292 *Letras diferentes entre as linhas indicam diferenças estatísticas, pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).*

293

294 As análises da integridade estrutural da membrana plasmática espermática são
 295 importantes para monitoramento da capacidade de fertilização e viabilidade dos

296 espermatozoides (OBERST *et al.*, 2003). Apesar dos achados demonstrarem diferença
297 entre os grupos em relação à integridade, o mesmo não foi observado na cinética
298 espermática. Isso pode ser justificado, pois os espermatozoides moribundos com lesões
299 discretas de membrana plasmática podem continuar com atividade cinética (MORRELL,
300 1991).

301 Um único parâmetro não pode ser utilizado para análise espermática, uma vez que
302 ao trabalhar com espermatozoides, existe uma grande variabilidade de respostas. Por isso
303 vários métodos devem ser associados para poder prever o potencial de fertilidade do
304 espermatozoide após a descongelação (GILLAN *et al.*, 2008).

305 Segundo Karow (2001), o crioprotetor pode se tornar um agente tóxico, a
306 depender da sua concentração, momento em que ele é adicionado, bem como a
307 temperatura que a célula espermática é exposta ao crioprotetor. Isto justifica o fato de
308 que, mesmo em trabalhos com indivíduos da mesma espécie e raça, os resultados podem
309 diferir após a criopreservação espermática, por conta de toda variação no processamento
310 espermático.

311 A metodologia que foi utilizada no presente estudo, em relação ao processo de
312 criopreservação pode ter colaborado para que a qualidade dos parâmetros espermáticos
313 não diferissem entre os grupos experimentais, ao contrário do que foi observado nos
314 outros estudos (MOUSTACAS *et al.*, 2011; GRAÇAS *et al.*, 2013) que tiveram curvas
315 de refrigeração e congelamento diferentes, podendo influenciar na velocidade de penetração
316 dos crioprotetores, aumentando assim a sua concentração intracelular e por consequência
317 um possível efeito tóxico à célula espermática (THURSTON; HOLT; WATSON, 2003).

318 O tratamento G4 foi o único que diferiu do tratamento G7 ($P < 0,05$) e este achado
319 pode estar correlacionado ao equilíbrio das concentrações de DMA e GLY já que a
320 metodologia de criopreservação utilizada foi a mesma para todos os grupos, trazendo uma
321 maior crioproteção celular para o tratamento G4, assim como a sinergia positiva que foi
322 relatada no trabalho de Morillo Rodriguez *et al.* (2012) em um trabalho com equinos.

323 A avaliação da fertilidade do sêmen congelado com diferentes tratamentos,
324 utilizando a técnica da inseminação artificial em tempo fixo por via laparoscópica,
325 demonstrou que não houve diferença estatística ($P > 0,05$), independente do meio diluidor
326 que foi utilizado, G1 (GLY6%) no qual 36,11% das fêmeas inseminadas ficaram

327 gestantes e no G4 (GLY4%+DMF2%).com 42,86% das fêmeas gestantes após as
328 inseminações.

329 O resultado encontrado na fertilidade *in vivo* corroboram com os resultados
330 encontrados na cinética espermática (tabela 1) e integridade de membrana plasmática
331 (tabela 2), onde os grupos G1 e G4 não diferiram entre si. Medeiros *et al.* (2002),
332 realizando teste de fertilidade *in vivo* em equinos (n=30), observaram melhores resultados
333 (P<0,05) para o sêmen que foi criopreservado com o DMF, em comparação ao GLY,
334 obtendo 40% de taxa de concepção para os animais inseminados com sêmen
335 criopreservado com as amidas e 0% para o sêmen criopreservado somente com o GLY.

336 Resultados de fertilidade utilizando o sêmen congelado de jumentos com o DMF
337 foram relatados, realizando a inseminação em éguas ou jumentas, demonstrando uma
338 maior taxa de fertilização (P<0,05) do sêmen contendo o DMF no diluidor em
339 comparação com o glicerol. Os autores hipotetizaram que o glicerol pode agir
340 negativamente sobre a célula espermática do jumento ou pode agir no trato reprodutivo
341 das jumentas, de forma negativa, trazendo um maior acúmulo de líquido quando
342 comparado as inseminações com sêmen fresco ou monta natural, induzindo uma
343 inflamação uterina e por consequência inviabilizando a fertilização desses animais
344 (VIDAMENT *et al.*, 2009), fato que não é relatado na espécie ovina e por esse motivo
345 não interferiu nos resultados obtidos no presente experimento.

346 Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada com a fertilidade *in vivo*
347 dos espermatozoides ovinos criopreservados com a dimetilformamida. Contudo, a taxa
348 de prenhez alcançada no trabalho é condizente com outro estudo realizado por Masoudi
349 *et al.* (2017) com ovinos, utilizando a inseminação artificial intra-uterina por meio da
350 laparoscopia, com sêmen congelado-descongelado com meio a base de gema de ovo, onde
351 alcançaram 42% de taxa de concepção, demonstrando também que os índices obtidos no
352 presente trabalho estão dentro da realidade encontrada para essa espécie.

353

354

CONCLUSÕES

355

356 Pode-se concluir que a dimetilformamida na concentração e associação testada
357 pode ser utilizada para a criopreservação de espermatozoides ovinos, por proporcionarem
358 índices adequados de concepção das fêmeas inseminadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

359

360

361 ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS,
362 A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal*
363 *Reproduction Science*, Amsterdam, v.89, p.105-113, 2005.

364 AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of
365 cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal Equine Veterinary Science*, v.7,
366 p.145-173, 1987.

367 BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M. et al.
368 Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e Crioprotetores. *Ciência*
369 *Animal Brasileira*, v.14, n.4, p.522-536, 2013.

370 BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L. ; CHALHOUB, M. et al.
371 Trehalose and a calcium chelator for ram semen cryopreservation. *Archives of*
372 *Veterinary Science*, v.19, p.69-77, 2014.

373 BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS,
374 M.F. et al. E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja
375 sobre a congelabilidade do sêmen caprino. *Brazilian Journal of Veterinary Research*
376 *and Animal Science*, São Paulo, v.45, p.305-312, 2008.

377 CAVALCANTE, T.V.; ESPER, C.R.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M.F. Análise
378 Computadorizada (Casa) e convencional da Motilidade Espermática de Sêmen Caprino
379 das Raças Boer e Alpina no Outono e Primavera. *Ars Veterinaria, Jaboticabal, SP*, v.21,
380 p.203-208, 2005.

381 CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação
382 do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

383 CEDENHO, A.P.; TOKUNAGA, I.M. Coloração supravital para espermatozoides:
384 comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina / Comparison of supravital
385 staining techniques for spermatozoa: eosin and eosin-nigrosin. *Jornal Brasileiro de*
386 *Urologia*; v.16, n.4, p.234-236, 1995.

387 DAVIS R. O.; KATZ, D. Standardization and comparability of CASA instruments.
388 *Journal of Andrology*, v.13, p.81-86, 1992.

- 389 GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of in
390 vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction*
391 *Science*, v.103, p.201-214, 2008.
- 392 GRAÇAS, C.P.; LIM, A. P. G.; FIDELIS, A. A. G.; CARDOSO, J. R. et al. Metil-
393 formamida na criopreservação de sêmen ovino. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia,
394 v.14, n.4, p.481-487, 2013.
- 395 HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of
396 mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v. 11, n. 1,
397 p.73-88, 1990.
- 398 HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
399 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*, v.88, p.343-352,
400 1990.
- 401 HENRY, M.; NEVES, J.P.; JOBIM, M.I.M. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.
402 *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte,
403 Minas Gerais, Brasil, 104p, 2013.
- 404 KAROW, A.M. Cryobiology. 2001 for mammalian embryologists. Augusta, Georgia,
405 USA, 38p., 2001.
- 406 LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the
407 mammalian spermatozoon, *Journal of Membrane Biology*, v.165, p.1-10, 1998.
- 408 LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen
409 for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1, p.113-141, 2000.
- 410 LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R. Influência de sistemas de
411 refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ciência*
412 *Animal Brasileira*, v. 11, n. 4, p. 835 - 844, 2010.
- 413 MASOUDIA, R., SHAHNEHA, AZ, TOWHIDIA, A., HAMID KOHRAMA, H.
414 AKBARISHARIF, L.A.. Fertility response of artificial insemination methods in sheep
415 with fresh and frozen-thawed semen., *Cryobiology* 74: pag; 77-80, 2017.
- 416 MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; et al.
417 Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, v.58, p.1-
418 4, 2002.
- 419 MORILLO RODRIGUEZ, A.; BALAO DA SILVA, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.;
420 GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; et al. Dimethylformamide improves the in vitro

- 421 characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage.
422 *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.995-1002, 2012.
- 423 MORRELL, J. M. Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review.
424 *Veterinary Record*, v.129, n.17, p.375- 378, 1991.
- 425 MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALONB, F.G.; LAGARESA, M.A.; LOAIZA-
426 ECCHEVERRIA, A.M. et al. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins
427 were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen.
428 *Theriogenology*, v.75, p.300–307, 2011.
- 429 OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E. et al. Teste hiposmótico
430 e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática
431 do carneiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.375-376, 2003.
- 432 OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S. et al. Fertility of spermatozoa
433 cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the
434 Japanese White Rabbits. *Experimental Animals*, Tóquio, v.56, n.1, p.29-34, 2007.
- 435 PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Standardization
436 of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, v.112,
437 p.128–135, 2013.
- 438 PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*,
439 v.63, p.215–225, 2006.
- 440 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing,
441 freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction*.
442 *Science*, v.37, p.185–249, 1995.
- 443 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction*
444 *Science*, v.62, p.77-111, 2000.
- 445 THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar
446 spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison.
447 *Theriogenology*, v.60, p.101-113, 2003.
- 448 VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R.; ALVARENGA, M.V.F.;
449 BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C. Effect of low
450 density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction*
451 *Science*, v.115, p.323–327, 2009.

- 452 VIDAMENT, M, VINCENT, P, MARTIN, FX, MAGISTRINI, M, BLESBOIS E.
453 Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen
454 containing glycerol or not, *Animal Reproduction Science*, 2009;112:22–35.
- 455 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal*
456 *Reproduction Sciece*, v.60, p.481-492, 2000.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Meios diluidores contendo crioprotetores à base de dimetilformamida ou dimetilacetamida foram nas condições desse trabalho eficientes para a crioproteção de células espermáticas de ovinos.

A substituição do glicerol parcial ou total pela dimetilacetamida ou dimetilformamida não reduz o efeito deletério pós-descongelação sobre a viabilidade e fertilidade do espermatozoide ovino, mas mantém a mesma qualidade encontrada no meio somente com glicerol.

As ovelhas inseminadas com sêmen congelado-descongelado com crioprotetores a base de amidas, apresentaram resultados de fertilidade semelhantes às aquelas inseminadas com sêmen em diluidor convencional com glicerol.

A utilização do DMA e DMF pode ser avaliada com outros tipos de crioprotetores, utilizando de forma associada ou não, na tentativa de se melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelação.

8 REFERÊNCIAS GERAIS

ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245-1250, 2003.

AHMAD, M. A. A.; CHATAGNON, G.; AMIRAT-BRIAND, L.; MOUSSA, M.; TAINTURIER, D.; ANTON, M.; FIENI, F. Use of Glutamine and Low Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p.429-436, 2008.

ALVARENGA, M.A; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O. Improvement of stallion semen post-thaw motility with utilization of dimethylformamide as cryoprotector. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.459, 2002.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.105-113, 2005.

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.

ANTON, M., MARTINET, V., DALGALARRONDO, M., BEAUMAL, V., DAVID-BRIAND, E., RABESONA, H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemical**, v.83, p.175-183, 2003.

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, p.1061-1069, 2001.

BAILEY, J. L.; BLODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview, **Journal of andrology**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical Localization and Biochemical Characterization of Two Seminal Plasma Proteins That Protect Ram Spermatozoa Against Cold Shock. **Journal of Andrology**, v.26, p. 539-549, 2005.

BERGERON, A., CRÊTE, M.H., BRINDLE, Y., MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

BEZERRA, F. S. B.; CASTELO, T. S.; ALVES, H. M.; OLIVEIRA, I. R.S.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C.X.; BEZERRA, A. C. S.D.; Silva, A. R. Objective assessment of the

cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat sêmen. **Cryobiology**, v.63, p.263-266, 2011.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e Crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.522-536, 2013.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; VASCONCELOS, M. F.; BISCARDE, C. A.; BICUDO, S. D. Trehalose and a calcium chelator for ram semen cryopreservation. **Archives of Veterinary Science**, v.19, p.69-77, 2014.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; MENEZES, G.F.O.; ANDRADE, R.C.; MASCARENHAS, L.O.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; BITTENCOURT, M.V.; CHALHOUB, M. Associação dos crioprotetores dimetilformamida e glicerol para criopreservação do sêmen ovino. In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE, 2011, Cumbuco-CE. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre: UFRG, 2011. v. 39. p. 335.

BRITO, L. F.; BARTH A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH P. L. & KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n.8, p.1539-1551, 2003.

CARNEIRO JUNIOR, J. M. Melhoramento genético animal. In: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. de (Ed.). Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, cap.11, p.197-208, 2009.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CELEGHINI, E.C.C. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do semen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p.14-25, 2002.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; ALBERTI, K.; SIQUEIRA FILHO, E. R.; MARTINS JR, A.; NOVAES, J. L. C.; DELL'AQUA, J. A. Eficiência Comparativa entre dois diluidores para congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade da membrana plasmática. **ARS Veterinária**. v. 22, p. 229-235, 2006.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in goats. **Animal Reproduction Science** v.130, p.187-192, 2012.

DAVIS, I.S.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333-336, 1963.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

DEL OLMO, E.; BISBALA, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ALVAREZA, O.; RAMONB, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLERA, A. J.; GARDEA, J. J.; FERNANDEZ-SANTOSA, M.R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science** v.138 p.102-109, 2013.

DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.213- 219, 2013.

EL-ALAMY, M. A.; FOOTE, R. H.; Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.245-254, 2001.

FLIPSED, R.J.; PATTON, S.; ALMQUIST, J.O. Effect of lactenin and lactoperoxidase upon spermatozoa livability, **Diluters for bovine semen**. v.57, p.1205- 1211, 1954.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Leveraging food systems for inclusive rural transformation. **The State of Food and Agriculture**. Roma, 2017.

GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. *In* Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Proceedings Equine Sciences**. Colorado State University Fort Collins, Colorado, USA. p.83-95, 1995.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 277-279, 2002.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513 p.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p.73-88, 1990.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HU, J.; JIANG, Z.; LV, R.; LI, Q.; ZHANG, Q.; LI, Y.; LI, X.; ZAN, L. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, v.62, p.83–87, 2011.

HU, J. H.; LI, K. W.; ZAN, L. S.; JIANG, Z. L.; AN, J. H.; WANG, L. Q.; JIA, Y. H. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**. v. 117, p. 11-17, 2010.

KAROW, A. M. Cryobiology. 2001 for mammalian embryologists. Augusta, Georgia, USA, 38p., 2001.

KASHIWAZAKI, N. et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Tóquio, v.52, n.4, p.511-516, 2006.

KHALIFA, E. I.; ABDEL-HAFEZ, M. A. M. Effect of soybean lecithin-based semen extender on freezability and fertility of rahmani ram spermatozoa. **Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences**, v.9, n.1, p.59- 66, 2014

JEREZ, R.; GONZÁLEZ, N.; OLACIREGUI, M.; LUÑO, V.; BLAS, I.; GIL, L. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.134, p.34-38, 2016.

JOBIM, M. I. M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R. M.; SIEME, H.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.76, p.765-771, 2011.

LAFFALDANO, N; DI LORIO, 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.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v.55, p.193-203, 1998.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1, p.113-141, 2000.

LEIBO, S. P.; KUBISCH, H. M.; SCHRAMM, R. D.; HARRISON, R. M.; VANDEVOORT, C. A. Male-to-male differences in post-thaw motility of rhesus spermatozoa after cryopreservation of replicate ejaculates. **Journal of Medical Primatology**, v.36, n.3, p.151–163, 2007.

LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 835 - 844, 2010.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.1-4, 2002.

MENEZES, G. F. O.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, M. F.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos. **Brazil Journal Veterinary Research Animal Science**, v.50, p.396-405, 2013.

MELO, C., ZAHN, F., MARTIN, I., ORLANDI, C., DELL'AQUA JR., J., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinarian Science**. v.27, p.171–175, 2007.

MORRIER, A.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J. L. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 82, n.3, p.347-356, 2002.

MOSCA, F.; MADEDDU, M.; SAYED, A. A.; ZANIBONI, L.; IAFFALDANO, N.; CEROLINI, S. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm. **Data in Brief**, n. 9, p.1118-1121, 2016.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. v. 57, p. 1695-1706, 2002.

MOUSTACAS, V. S.; ZAFFALONB, F. G.; LAGARESA, M. A.; LOAIZA-ECCHEVERRIA, A. M.; VARAGOA, F. C.; NEVES, N. V.; HENEINEC, L. G. D.; ARRUDAB, R. P.; HENRYA, M.; Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v.75, p.300–307, 2011.

MCLAUGHLIN, E. A.; FORD, W. C. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.241–246, 1994.

NACCACHE, P.; SHA'AFI, R. I. Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. **The Journal Of General Physiology**, v.62, p.714-736, 1973.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109- 112, 1998.

OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C.; KROTH, E.; LARA, G.; SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos

da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.375-376, 2003.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, 39, 177-184, 1999.

OLLERO, M.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CÉBRIAN-PÉREZ, J. A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v.37, p.1-12, 1998.

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbits. **Experimental Animals**, Tóquio, v.56, n.1, p.29-34, 2007.

PACE, M. M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal Animal Science**, v.39, p.1144-1149, 1974.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v.75, p. 105-114, 2011.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.

SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.41, p.28-39, 2001.

THACKER, D.L.; FLIPSED, R.J.; ALMQUIST, J.O. Diluters for bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoa livability. **Journal Dairy Science**, v.37, p.220, 1994.

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; GASTAL, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; DESCHAMPS, J.C.; J.C.; LUCIA JR., J.C. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research**, v.93, p.206-209, 2010.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**. v.92, p.126–130, 2010.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R.; ALVARENGA, M.V.F.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.323–327, 2009.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p. 481-492, 2000.