

## Metilformamida na criopreservação seminal de galos

Norton Luis Souza Gatti<sup>1</sup>; Jorge Squeff Filho<sup>1</sup>; Rafael Mielke Barbosa<sup>2</sup>; Nathalia Wacholz Knabah<sup>2</sup>; Amauri Telles Tavares<sup>3</sup> e Antonio Sergio Varela Junior<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - nortongatti@hotmail.com; jorgesqueff.br@gmail.com

<sup>2</sup> Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - rafaelmielke@gmail.com; nathaliaknabah@gmail.com

<sup>3</sup> Graduação em Zootecnia Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - importante.tavares@bol.com.br

<sup>4</sup> Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande (FURG) - varelajras@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço na criopreservação seminal ter ocorrido com o descobrimento das propriedades crioprotetoras do glicerol no congelamento de sêmen de galos (POLGE, 1951), o aprimoramento da técnica nessa espécie continua um desafio para pesquisadores. Devido as características únicas dos espermatozoides de cada espécie, é necessário um protocolo específico para atender as diferentes demandas e minimizar as injúrias decorrentes desse processo extremamente danoso para as células (BENSON, 2012; HOLT, 2000).

Embora o glicerol seja o crioprotetor mais estudado, exerce efeito contraceptivo no trato reprodutivo de galinhas, sendo necessária sua remoção prévia a inseminação, o que reduz a viabilidade espermática (HAMMERSTEDT, 1992). Como alternativa ao glicerol, muitas amidas foram testadas para o congelamento de sêmen de galos com bons resultados, dentre as quais se destaca a dimetilacetamida (DMA) (ABOUELEZZ, 2016; RAKHA, 2017). Uma desvantagem das amidas, associada a dimetilacetamida é o efeito citotóxico sobre os espermatozoides de galos (BLESBOIS, 2007), principalmente durante o contato inicial entre espermatozoide e crioprotetor e durante o processamento após o descongelamento (MOCÉ, 2010).

No presente estudo a amida utilizada como crioprotetor foi a metilformamida (MF), que possui peso molecular ainda menor que a DMA, podendo teoricamente diminuir a possibilidade de estresse osmótico (BIANCHI, 2008). A MF foi relatada na criopreservação seminal de galos apenas em trabalhos da década de 80 com resultado inferior ao glicerol, porém mais recentemente demonstrou bons resultados em outras espécies, como cães (FUTINO, 2010) e peixes (VARELA JUNIOR, 2012). Nós hipotetizamos que devido a toxicidade das amidas, um período de contato curto com o sêmen poderia minimizar essa ação indesejada.

O objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade da MF como crioprotetor penetrante, em várias concentrações (3%, 6%, 9% e 12%), mantidas em contato com o sêmen por diferentes períodos (1min, 3min, 5min, 7min e 9min).

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados quarenta e quatro galos da linhagem Embrapa 051 (galos semi-pesados), sexualmente maduros (26-30 semanas de idade). A coleta de semen era realizada através de massagem dorso-abdominal, duas vezes por semana (BURROWS, 1937). Logo após a coleta o sêmen era diluído 1:1 com diluente de Lakes. Em seguida era transportado em caixa de isopor ao

laboratório, sendo avaliada motilidade e concentração. Somente ejaculados com motilidade superior ou igual a 80% foram utilizados para a formação dos pools, sendo as concentração ajustadas para  $800 \times 10^6$  espermatozoide/mL. Foram 3 dias de coleta, com um total de 14 pools formados.

Os pools eram então levados a câmara fria, e permaneciam por 2 horas a 5°C para estabilização. Alíquotas de 125 µL de cada pool eram diluídas 1:1 com os respectivos tratamentos (diluente de Lakes com o dobro da concentração final da amida utilizada), atingindo a concentração final de  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen permanecia em contato com o tratamento pelo período de exposição estabelecido (1 min, 3 min, 5 min, 7 min ou 9 min) e era colocado no vapor de nitrogênio à 3 cm de altura do nitrogênio líquido (MADEDDU, 2016) por 7 min. Após, as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido a -196°C e armazenadas por pelo menos 2 meses.

As palhetas eram descongeladas em banho-maria com agitação a 37°C por 20s. Para a diluição das amostras descongeladas foi utilizado o diluente de Lakes com adição de albumina sérica bovina (BSA) 3mg/mL e eram diluídos 40µL de sêmen em 200µL de Lakes com BSA. Posteriormente, era realizada a análise de ruptura da membrana plasmática através de citometria de fluxo.

Para esta análise, eram utilizadas as probes fluorescentes iodeto de propídeo (PI) e SYBER-14. Apenas células com a membrana lesada permitem a entrada de PI que penetra o núcleo da célula, enquanto o SYBER-14 penetra o espermatozoide intacto e é convertido em um composto fluorescente não-permeável que fica retido no citoplasma. Sendo assim, eram considerados com membrana plasmática intacta, espermatozoides marcados apenas com SYBER-14. A análise estatística será no software Statistix 10, com avaliação médias pelo ANOVA.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ruptura da membrana plasmática (tabela 1) foi maior nas menores concentrações de MF e no menor período de exposição, isto fica claro, quando verificamos as médias de cada concentração independente do tempo e de cada período de exposição independente da concentração. No período de exposição mais curto testado, as menores concentrações de MF foram insuficientes para proporcionar adequada proteção, da mesma forma que maiores concentrações do crioprotetor (9% e 12%) demonstraram superioridade exceto pelo período de 5 minutos de exposição onde não houve diferença entre as concentrações utilizadas. Em estudo utilizando outra amida (DMA) na concentração de 6%, foi encontrada menor integridade da membrana plasmática em apenas 1 minuto de contato que em um período de 30 minutos (SANTIAGO-MORENO, 2011), sendo similar com o padrão apresentado neste estudo, onde também a MF na concentração de 6% mantida com o semen por apenas 1 minuto resultou em menor integridade de membrana que um período maior como 9 minutos. Provavelmente, em maior concentração e período de exposição, a MF otimiza a desidratação dos espermatozoides pré congelamento, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular, o que reduz a ruptura da membrana plasmática. A membrana plasmática serve como uma barreira seletiva ao ambiente, por isso a manutenção de sua integridade após a criopreservação é fundamental (VAN MEER, 2008).

Embora tenhamos dados de uma análise espermática importante que é a integridade da membrana plasmática, tratamentos com as menores rupturas

podem exercer ação deletéria em outra estrutura espermática. Por isso, outras análises podem ser feitas para proporcionar uma visão mais complexa da ação da MF sobre as células espermáticas. Análises cinéticas realizadas no Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) e outras avaliações obtidas através de citometria de fluxo, ajudam a entender melhor quais as condições mais adequadas para o uso da MF como crioprotetor seminal de galos. Por exemplo, não bastaria o espermatozoide ter a membrana plasmática íntegra e não possuir motilidade, alterações subletais também irão prejudicar a fertilização (PINI, 2018).

Tabela 1- Média  $\pm$  SE das membranas íntegras após o descongelamento, utilizando concentrações diferentes de MetilFormamida em diferentes períodos antes do congelamento (n=14 pools)

MF	Período de exposição				
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min
3%	68.4 $\pm$ 2.4 <sup>Aa</sup>	56.2 $\pm$ 4.4 <sup>Ab</sup>	54.4 $\pm$ 3.2 <sup>Ab</sup>	52.1 $\pm$ 3.6 <sup>ABb</sup>	61.8 $\pm$ 2.6 <sup>Aab</sup>
6%	65.2 $\pm$ 1.9 <sup>Aa</sup>	56.4 $\pm$ 3.4 <sup>Ab</sup>	57.8 $\pm$ 2.5 <sup>Aab</sup>	55.5 $\pm$ 2.8 <sup>Ab</sup>	55.8 $\pm$ 2.8 <sup>ABb</sup>
9%	48.9 $\pm$ 3.7 <sup>Ba</sup>	53.7 $\pm$ 4.9 <sup>ABA</sup>	51.4 $\pm$ 2.2 <sup>Aa</sup>	50.4 $\pm$ 2.5 <sup>Ab</sup>	49.6 $\pm$ 5.0 <sup>Ba</sup>
12%	55.0 $\pm$ 4.1 <sup>Ba</sup>	43.7 $\pm$ 3.4 <sup>Ba</sup>	50.0 $\pm$ 3.8 <sup>Aa</sup>	45.9 $\pm$ 3.5 <sup>Ba</sup>	46.4 $\pm$ 4.9 <sup>Ba</sup>

<sup>AB</sup>Different letters within the same column are statistically different by LSD analysis (P<0.05). <sup>ab</sup>Different letters on the same line are statistically different by LSD analysis (P<0.05).

#### 4. CONCLUSÕES

A MF não exerceu ação tóxica dentro dos limites de concentração e períodos de exposição testados. Foi observada ação crioprotetora na membrana plasmática dos espermatozoides, principalmente em concentrações elevadas. Dessa forma, menos cristais de gelo são formados e menor é a ruptura celular. Outras avaliações são necessárias para determinar possíveis efeitos tóxicos, não evidenciados nessa análise.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUELEZZ, F. M. K.; SAYED, M. A. M.; SANTIAGO-MORENO, J. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in rooster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. **Animal reproduction science**, v. 184, p. 228-234, 2017.
- BENSON, James D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, 2012.
- BIANCHI, Ivan et al. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 632-638, 2008.
- BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 2, p. 213-222, 2007.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v. 16, n. 1, p. 19-24, 1937.
- FUTINO, D. O. et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 214-220, 2010.
- HAMMERSTEDT, Roy H.; GRAHAM, James K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 26-38, 1992.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.
- IAFFALDANO, Nicolaia; DI IORIO, Michele; ROSATO, M. Pina. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1381-1389, 2012.
- JUNIOR, AS Varela et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1-4, p. 323-327, 2009.
- MADEDDU, M. et al. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. **Animal reproduction science**, v. 171, p. 58-64, 2016.
- MOCÉ, E.; GRASSEAU, I.; BLESBOIS, E. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 3-4, p. 359-366, 2010.
- PINI, Taylor; LEAHY, Tamara; DE GRAAF, Simon P. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. **Theriogenology**, v. 118, p. 172-181, 2018.
- POLGE, C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at- 79° C. **Nature**, v. 167, n. 4258, p. 949, 1951.
- RAKHA, B. A. et al. Dimethyleacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. **Theriogenology**, v. 103, p. 83-89, 2017.
- SANTIAGO-MORENO, J. et al. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. **Poultry science**, v. 90, n. 9, p. 2047-2053, 2011.
- VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R.; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 2, p. 112, 2008.