



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Wasley Carlos Gonçalves de Matos

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE DIMETILFORMAMIDA NO
DILUENTE DE SÊMEN CAPRINO SOBRE O POTENCIAL
FECUNDANTE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS APÓS
A CRIOPRESERVAÇÃO**

PETROLINA-PE

2014

Wasley Carlos Gonçalves de Matos

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE DIMETILFORMAMIDA NO
DILUENTE DE SÊMEN CAPRINO SOBRE O POTENCIAL
FECUNDANTE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS APÓS
A CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes

PETROLINA-PE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wasley Carlos Gonçalves de Matos

AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE DIMETILFORMAMIDA NO DILUENTE DE SÊMEN CAPRINO SOBRE O POTENCIAL FECUNDANTE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Elenice Andrade Moraes, Dr^a., Universidade Federal do Vale do São Francisco

Edilson Soares Lopes Júnior, Dr., Universidade Federal do Vale do São Francisco

Adriana Gradela, Dr^a., Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina-PE
2014

Aos meus avós: Mariano e Ivanete,
Francisco e Rosa
Aos meus pais: Roberto e Simone
Aos meus irmãos: Kadya, Phablo e
Breno
À todos os meus tios
À Sophia Louise

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À aquele que nunca vi, porém, sinto a todo momento, seja bom ou ruim, calmo ou turbulento, por permitir meu crescimento pessoal e profissional. A você e, por vezes, só com você descobrir que tudo tem um motivo de ser e estar. Obrigado por tudo. Deus, obrigado por nunca ter me abandonado.

À minha família, meus pais Sandra Simone de Matos e José Carlos Roberto Gonçalves, Irmãos, Kadya, Phablo e Breno, aos meus tios e primos, pelo apoio em todas as fases da minha vida, sei que a qualquer momento posso contar com vocês. Obrigado pelo amor a mim dedicado. Amo muito vocês!

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e a todos os seus servidores, pelo acolhimento e presteza.

Ao Programa de Pos-Graduação em Ciência Animal

À CAPES pela bolsa

À minha orientadora Elenice Andrade Moraes, por ser uma pessoa simples, humana, e sempre disposta a ajudar. Obrigado pela transmissão do conhecimento e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A todos os professores que, de alguma forma passaram algum ensinamento desde os primeiros passos à pós-graduação. A paciência e a boa vontade de passar adiante o conhecimento é um dom que merece todo meu reconhecimento e gratidão. Obrigado! (“Se pude ver mais longe foi porque subi no ombro de gigantes” Isaac Newton).

Aos companheiros do Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestres (CEPSENS), Bruno, Carina, Gabriel, Jonathan, Laiane, Laícia, Lucas, Ricardo, Saulo, Wildefrancis e Wilson.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Veterinário Universitário-HVU, Ana Amélia, Eugênio, Ivoneide, José, Marta, Mário, Matheus, Regina, pelo apoio, compreensão, paciência e momentos de descontração. Dizem e eu concordo que quem faz o que gosta não trabalha, diverte-se. Grato!

Aos meus amigos desde a graduação, André, Fábio, Gabriela, Rafael, Rodrigo, Salvador, Vanessa, Vinisius, obrigado galera!

Aos colegas de Pós-graduação, Allan, Felipe, Jámille, Larissa, Lívia, Luciana, Mayara e Percivaldo.

A Minha filha que nem nasceu e já é a razão de tudo. Aguardo ansioso pela sua chegada, que papai do céu traga a este mundo com saúde e alegria. Filha, por você que buscarei crescer cada vez mais, Deus me abençoe e permita que seja um exemplo para você, permita-nos ser levados pelos bons ventos em direção à felicidade. Te amo minha filha linda!!!!!!

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista, mesmo que com um simples e sincero desejo de bom dia.

Obrigado!

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de dimetilformamida no diluente de sêmen caprino sobre o potencial fecundante após a criopreservação. Foram utilizados quatro bodes sem padrão racial definido, inteiros, mantidos em baias individuais, coletando um total de cinquenta e dois ejaculados por meio de vagina artificial, utilizando, para isso, uma fêmea em estro como manequim. Em seguida, o sêmen foi centrifugado, diluído em TRIS-Gema a uma concentração final de 120×10^6 espermatozoides/mL nos seguintes tratamentos: Controle; 2% dimetilformamida; 3% dimetilformamida; 4% dimetilformamida; 5% dimetilformamida; e 2% dimetilformamida + 2% glicerol os quais posteriormente, submetidos à curva de congelamento lento e descongelados à 37°C por 30 segundos. As variáveis motilidade total e progressiva foram estabelecidas com auxílio do CASA. A integridade da membrana espermática e a capacidade de ligação espermática à membrana perivitelina da gema de ovo foram observadas com auxílio do microscópio de fluorescência. As amostras foram submetidas à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve efeito sobre a motilidade total e progressiva, a viabilidade, e o teste de ligação ($P > 0,05$). A dimetilformamida associada ou não ao glicerol em meio diluente TRIS-Gema não altera a qualidade espermática de caprinos após a criopreservação.

Palavras-chave: bode, crioprotetor, espermatozoide, viabilidade, CASA.

ABSTRACT

Aimed to evaluate the effect of addition of dimethylformamide in the diluent of goat semen on fertilizing potential after cryopreservation . Four goats were used without defined breed , whole , kept in individual stalls , collecting a total of fifty-two ejaculates through artificial vagina using a female in estrus as a model , then the semen was centrifuged , diluted in TRIS-Gem a final concentration of 120×10^6 sperm / ml in the following treatments : control (C) 2 % dimethylformamide (T1); 3% dimethylformamide (T2) , 4% dimethylformamide (T3) , 5% dimethylformamide (T4) , and 2 % dimethylformamide + 2 % glycerol (T5) subsequently underwent slow freezing curve and thawed at 37 ° C for 30 seconds . The total and progressive motility variables were established with the aid of (CASA) in sperm membrane integrity , and sperm binding capacity perivitelline membrane of the egg yolk were observed with the fluorescence microscope. The samples were subjected to ANOVA and means were compared by Tukey test at 5 % probability . There was no effect on the following parameters evaluated ($P > 0.05$), total and progressive motility , viability , connection test . The dimethylformamide with or without glycerol in TRIS - yolk diluent did not affect sperm quality after cryopreservation goats .

Keywords: goat, cryoprotector, sperm, viability, CASA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do espermatozóide: 1, membrana citoplasmática; 2, acrossoma; 3, membrana nuclear; 4, núcleo; 5, capa pós-nuclear; 6, centríolo proximal; 7, filamento axial; 8, hélice mitocondrial; e 9, envoltório fibroso. (Adaptado de GARNER e HAFEZ, 1993)	17
Figura 2 – Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) (Arquivo Pessoal)	28
Figura 3 – Fotômetro SDM6 (Minitub®) (Arquivo Pessoal)	29
Figura 4 – Recipiente plástico submetido a processo de resfriamento 5°C	30
Figura-5 -Descongelamento das palhetas em banho-maria e acondicionamento para análise (Arquivo Pessoal)	31
Figura 6 – Análise dos parâmetros de motilidade total e progressiva (Computer Assisted Sperm Analysis; CASA) (Arquivo Pessoal).....	32
Figura 7 –Teste de ligação em membrana perivitelina da gema de ovo de galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>) (Arquivo Pessoal)	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Motilidade total e progressiva (%) de espermatozóides de caprinos submetidos a diferentes níveis de dimetilformamida, associada ou não ao glicerol antes da criopreservação **37**

TABELA 2 – Viabilidade (%) e número de espermatozóides de caprinos ligados a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha (NSLM), submetidos a diferentes concentrações de dimetilformamida no sêmen, associada ou não ao glicerol, após o descongelamento **38**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Grau celsius
ANOVA	Análise de variância
BSA	Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
C	Controle
CASA	Computer Assisted <i>Semen</i> Analysis (Análise computadorizada do sêmen)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEPSNS	Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestres
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetraacético)
EYCE	Egg yolk-coagulating enzyme; (enzima coagulante da gema do ovo)
g	Gramma (s)
GL	Glicerol
h	Hora (s)
Hz	Hertz
L	Litro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MPV	Membrana perivitelina da gema do ovo
P	Nível de significância
PNA	<i>Arachis hypogea</i> agglutinin (Aglutinina <i>Arachis hypogea</i>)
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin (Aglutinina <i>Pisum sativum</i>)
TALP	Tyrode medium with albumin, lactate and pyruvate (Meio tyrode com albumina, lactato e piruvato)
UI	Unidades internacionais
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Estrutura do espermatozoide	15
2.2. Particularidades do sêmen caprino	16
2.3 Aspectos básicos da criopreservação	18
2.4. Crioprotetores.....	19
2.5. Amidas	21
2.6. Teste de ligação	22
2.7. Integridade da membrana e viabilidade espermática	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Aspectos éticos	27
4.2. Reagentes	27
4.3. Local e período experimental	27
4.4. Colheita, avaliação e diluição do sêmen a fresco.....	27
4.5. Congelamento e descongelamento do sêmen diluído.....	30
4.6. Avaliação do sêmen	31
4.6.1. Avaliação da motilidade espermática	31
4.6.2. Avaliação da viabilidade espermática.....	32
4.6.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial.....	33
4.6.4. Teste de fecundação <i>in vitro</i>	34
4.7. Análise estatística	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS.....	44
9. ANEXOS	58
ANEXO I.....	58
ANEXO II.....	68
ANEXO III.....	69
ANEXO IV	70

1. INTRODUÇÃO

Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação direta na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade. Um bom exemplo dessas biotécnicas é a criopreservação de sêmen, Inseminação Artificial, a Múltipla Ovulação e a Transferência de Embriões.

A sobrevivência espermática no plasma seminal é limitada somente a algumas poucas horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A criopreservação é o método pelo qual o sêmen passa por um processo de resfriamento e, conseqüente, congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) com intuito de preservar as estruturas dos espermatozoides por tempo indeterminado e, conseqüentemente, o potencial genético de machos de alto valor comercial.

Nas últimas décadas, esforços têm sido realizados no sentido de aprimorar as biotécnicas da reprodução animal já existentes, tendo como objetivo principal aumentar a sua aplicabilidade, tornando a sua utilização viável aos produtores que poderão aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos (FIGUEIREDO et al., 2002). Para manter o sêmen por um período de tempo mais longo, resfriá-lo e até criopreservá-lo, é necessária a sua diluição com uma solução protetora. Diferentes soluções têm sido utilizadas como diluidores de sêmen, os quais são variações de diluidores pré-estabelecidos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

De acordo com Smith e Polge (1950) Apud Silva et al., (2006), a ocorrência de injúrias estruturais causadas pelo processo de congelamento e descongelamento estimulam o desenvolvimento de diversos estudos de preservação do sêmen caprino, desenvolvendo formas mais eficientes. Diversos estudos demonstram que o processo de criopreservação afeta diretamente a estrutura espermática decorrente das interações entre o espermatozóide e os diluidores. Pode-se citar os choques térmicos e osmóticos bem como a formação de cristais de gelo no meio intracelular, afetando a estrutura físico-química nas fases de resfriamento, congelamento e descongelamento como resultado dessa interação. A membrana espermática também é alterada em função da adição do crioprotetor, das mudanças volumétricas associadas à distensão e contração em resposta a soluções hiperosmóticas, da desidratação induzida pela congelação, da elevada concentração de solutos e da formação de gelo intracelular, induzindo a necessidade de substâncias

crioprotetoras que reduzam os efeitos deletérios do resfriamento, congelamento e descongelamento aos espermatozóides (WEITZE e PETZOLDT, 1992).

Protocolos e substâncias utilizadas para preservar a célula espermática em baixas temperaturas e que reduzem os danos causados pelo choque térmico têm sido estudados (SALAMON e MAXWEEL, 2000). Inúmeras substâncias têm sido utilizadas como alternativa aos crioprotetores convencionais. Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração, como o custo, disponibilidade, simplicidade de manipulação e a capacidade de eliminar ou minimizar os efeitos deletérios irreversíveis envolvidos na criopreservação. Dentre as substâncias estudadas em outras espécies, verifica-se que a dimetilformamida pode ser uma alternativa para criopreservar a célula espermática de inúmeras espécies inclusive a caprina.

As amidas são crioprotetores penetrantes derivados dos ácidos carboxílicos e das aminas, cuja estrutura molecular apresenta três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água. Porém, apresentam menor viscosidade, baixo peso molecular e maior solubilidade à água, são menos tóxicas em relação ao crioprotetor muito utilizado, o glicerol, o que permite maior permeabilidade da membrana (NASH, 1966 Apud ACIPRESTE, 2006) reduzindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (BALL e VO, 2001). A utilização do grupamento amida como crioprotetor foi avaliada em inúmeros animais tais como: cães (ZIMMERMAM et al., 2007; FUTINO 2008; LOPES, 2008), coelhos (HANADA e NAGASE, 1980; KASHIWAZAKI, OKUDA e SEITA, 2006), galos (CHALAH, SEIGNEURIN e BLESBOTS, 1999; TSELUTIN, SEIGNEURIN e BLESBOTS, 1999) peixes (JOHNSON e LARSSON, 1985), equinos (ALVARENGA et al., 2000) e suínos (BIANCHI et al., 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura do espermatozoide

Os espermatozoides são células haploides especializadas, que tem uma habilidade limitada para biossíntese e regeneração celular (Figura 1; AMANN e GRAHAM, 1993). Os espermatozoides completamente desenvolvidos são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada, contendo o núcleo, bem como de uma cauda contendo o aparelho necessário para a motilidade celular. O espermatozoide é delimitado pela plasmalema, ou membrana plasmática. A célula espermática possui cinco regiões estruturais: cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (FAWCETT, 1975 Apud AMORIM, 2008).

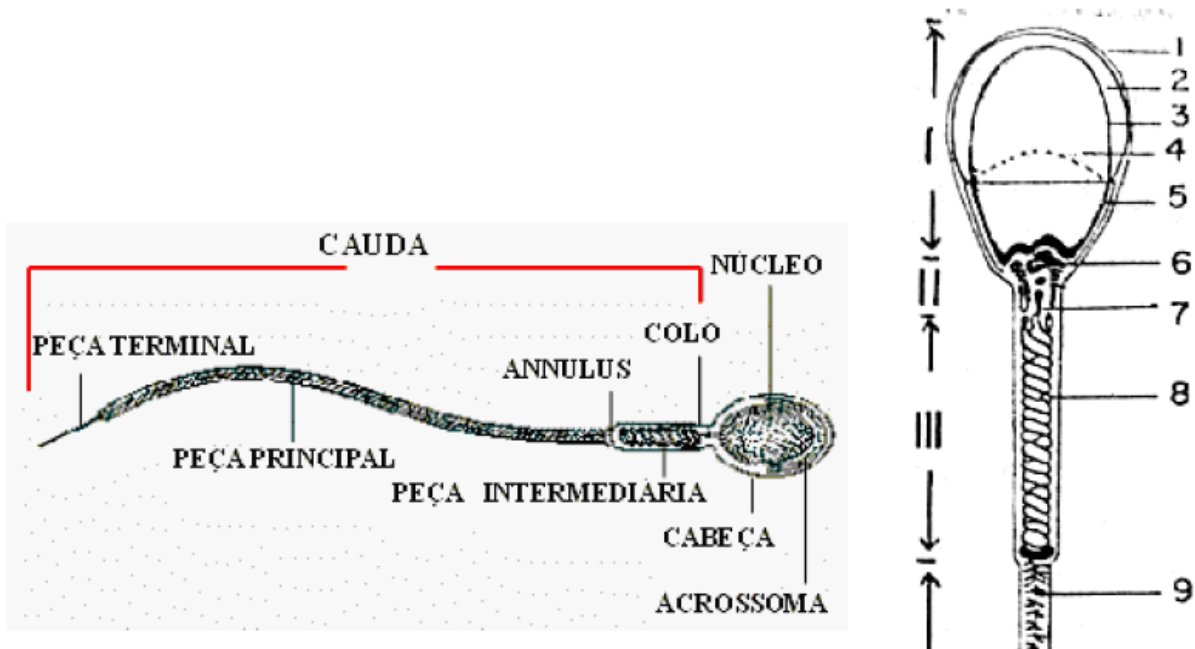
A cabeça do espermatozoide possui o núcleo, acrossoma, região pós acrossomal e a membrana plasmática. A forma da cabeça é determinada pela forma de núcleo. O núcleo do espermatozoide possui um DNA altamente condensado que é rodeado por um envelope nuclear (AMANN e GRAHAM, 1993). O acrossoma é uma organela altamente especializada que se assemelha a um lisossoma celular e cobre a porção anterior da cabeça (AMANN e GRAHAM, 1993; ABOU-HAILA e TULSIANI, 2000). O acrossoma é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do complexo de golgi. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (HAFEZ, 1995).

A peça principal é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras grosseiras. As fibras provêm a rigidez precisa para movimento da cauda (AMANN e GRAHAM, 1993). A peça terminal possui apenas o axonema delimitado pela membrana plasmática (FAWCETT, 1975 Apud AMORIM, 2008).

A peça intermediária se localizada entre o colo e o annulus e, juntamente com o comprimento total da cauda, forma o axonema (HAFEZ, 1995). A peça intermediária possui mitocôndrias dispostas em forma de hélice, capazes de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (EDDY e O'BRIEN, 1994). O axonema, uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina, está envolvido no mecanismo de motilidade espermática (HAFEZ, 1995).

A cauda do espermatozóide é composta de colo, peça intermediária, principal e terminal. O colo conecta a cabeça à peça intermediária, e forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo. O colo também contém o centríolo proximal que é responsável pela contratilidade necessária para o movimento da cauda do espermatozóide (AMANN e GRAHAM, 1993).

Figura 1 – Estrutura do espermatozóide: 1, membrana citoplasmática; 2, acrossoma; 3, membrana nuclear; 4, núcleo; 5, capa pós-nuclear; 6, centríolo proximal; 7, filamento axial; 8, hélice mitocondrial; e 9, envoltório fibroso. (Fonte: Adaptado de GARNER e HAFEZ, 1993).



2.2. Particularidades do sêmen caprino

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozóides (gameta masculino) e secreções dos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal. (CORTELL, 1981; GONZÁLEZ, 2004; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O sêmen caprino é composto por substâncias orgânicas como: frutose, sorbitol, inositol, ácido cítrico, fosfolípidios, glicerilfosforilcolina, prostaglandinas e proteínas. O pH se mantém muito próximo a 7,0 devido a um complexo sistema

tampão. A energia necessária proveniente dos açúcares, em especial da frutose, é fundamental para manter a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1987).

O aparelho reprodutor do macho caprino apresenta particularidades que o diferencia daquele de outras espécies, sendo, dentre elas, a mais importante, a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbouretrais liberadas no plasma seminal (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989). Uma fração glicoproteica presente no plasma seminal dos machos caprinos pode agir, inibindo a motilidade de seus espermatozoides. Essas frações proteicas são nomeadas SBU III (NUNES, 1982 Apud SANTOS 2010) da glândula bulbouretral do caprino. A SBU III também é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e também os triglicerídeos contidos no leite desnatado, resultando no ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO, MAGALLON e COMBARNOUS, 1997). A enzima EYCE (egg yolk-coagulating enzyme - enzima coaguladora da gema do ovo), que coagula a gema de ovo, é também secretada pela glândula bulbouretral. Na presença de cálcio a enzima EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo (ROY, 1957 Apud PURDY, 2006), resultando em liolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides (CORTEEL, 1974 Apud PURDY, 2006).

A presença de enzimas no plasma seminal de caprinos, como mencionado anteriormente, é desfavorável à sua conservação, tanto na forma resfriada quanto na congelada. Segundo Corteel (1977) apud Leboeuf, Restall, Salmon, (2000), na espécie caprina, a remoção do plasma seminal por centrifugação, imediatamente após a colheita, aumenta a percentagem de células vivas e sua motilidade durante o armazenamento em diluentes de gema de ovo ou leite.

A remoção do plasma seminal pela centrifugação do sêmen, antes do congelamento, se mostrou benéfica à sobrevivência das células espermáticas pós-descongelamento (CORTEEL 1974; RITAR e SALAMON, 1982 Apud PURDY, 2006). Entretanto, a eliminação do plasma seminal, a fim de minimizar os efeitos negativos sobre a conservação do sêmen, pode afetar a capacitação "in vivo" dos espermatozoides, visto que o plasma seminal possui enzimas e outras substâncias importantes para a fertilidade do sêmen (NUNES, 1982 Apud PURDY, 2006; MAXWELL e JOHNSON, 1999).

Por outro lado, Roy (1957) Apud Santos 2010, Iritani e Nishikawa (1961) Apud Silva (2004), observaram melhor sobrevivência espermática quando ejaculados de sêmen caprino foram centrifugados uma vez antes da diluição, do que quando não centrifugados. Aboagla e Terada (2003) estudaram o efeito da remoção do plasma seminal, por duas centrifugações, sobre a motilidade espermática e encontraram que a remoção do plasma seminal foi benéfica em preservar a integridade espermática após a congelação.

2.3 Aspectos básicos da criopreservação

O processo de criopreservação de sêmen inclui as etapas que inicia com a coleta de sêmen, diluição, centrifugação, resfriamento e congelamento até a manutenção da capacidade funcional do espermatozóide pós descongelamento. Embora alguns desses estágios possam ser relativamente inócuos, existem pelo menos dois estágios de estresse pelos quais as células espermáticas passam durante o congelamento e descongelamento. O primeiro está relacionado aos efeitos das mudanças na temperatura e o segundo aparece por causa da formação e dissolução do gelo (WATSON, 1995).

Para adquirir uma boa taxa de sobrevivência dos espermatozóides após a congelação é necessário estabelecer as velocidades de resfriamento, congelamento e descongelamento (MAZUR, 1984). O resultado do processo de criopreservação depende de interações entre meios diluidores, crioprotetores, curva de resfriamento e descongelamento. Estas etapas são responsáveis por reduzir os danos causados pelo choque térmico, reduzindo a formação de cristais de gelo intercelulares e propiciando uma adequada desidratação celular (HOLT, 2000). O resfriamento dos espermatozóides a temperaturas acima de 0° C causa perdas prematuras e irreversíveis na motilidade, altera as propriedades físicas da membrana, aumento da sua permeabilidade e perda de moléculas e íons intracelulares (WATSON, 1981).

A adição do crioprotetor ao meio de congelação provoca saída de água das células e diminuindo seu volume, devido à exposição a um ambiente hiperosmótico. À medida que o crioprotetor penetra dentro das células ocorre entrada de água e aumento do volume celular. Durante a remoção do crioprotetor do meio, após a descongelação, ocorre o reverso, pois quando este sai do interior das células ocorre

concomitante saída de água provocando diminuição do volume celular. As mudanças no volume celular, induzidas pela adição e remoção do crioprotetor no meio, são distintas daquelas ocorridas durante o resfriamento e o reaquecimento, portanto, estas duas etapas do processo de criopreservação podem ser potencialmente prejudiciais as células (GILMORE et al., 1998).

O problema mais evidente na congelação do sêmen é a perda da motilidade espermática. A criopreservação e a descongelação promovem a cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, resultando em alterações nos componentes da membrana plasmática, aumentando a sua permeabilidade, provocando uma redução na atividade metabólica, danos no acrossoma e de outras estruturas, como alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares com conseqüente perda de fertilidade (HOFMO & ALMLID, 1992).

A cristalização do meio extracelular ocorre dependendo da velocidade de resfriamento e dos crioprotetores utilizados. As células ficam expostas a soluções hiperosmóticas, resultando na saída de água de seu interior e influxo de íons; já na descongelação acontece o efeito inverso, com influxo de água para o meio intracelular podendo acarretar ruptura da membrana plasmática. No intuito de obter-se uma boa sobrevivência das células espermáticas após a descongelação faz-se necessário o controle osmótico e químico do meio extracelular. A escolha da composição do diluidor, natureza dos crioprotetores e outros nutrientes como açúcares, quelantes, cálcio, antioxidantes e proteínas da gema de ovo ou do leite, vêm demonstrando ter influência na sobrevivência da célula espermática (HOLT, 2000).

2.4. Crioprotetores

Segundo Hunter (1982) Apud Salmito-Vanderley et al., (2012), a viabilidade de espermatozoides congelados-descongelados está relacionada a fatores como: o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio; o tempo e a temperatura de equilíbrio, a natureza da curva de resfriamento; a natureza da curva de descongelação; a utilização de um meio de descongelação específico e o modo de eliminar o agente crioprotetor (diluição ou diálise).

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro*. Eles diferem em sua composição dependendo da espécie animal doador do sêmen e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS e EVANS, 1991).

Segundo Hopkins e Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozoides às mudanças de temperatura se deve à ação protetora do plasma seminal e à integridade da membrana espermática. Esta última está relacionada tanto com sua composição lípido-proteica quanto de colesterol e fosfolipídios.

Uma das etapas mais importantes para o sucesso da criopreservação espermática é a escolha do crioprotetor a ser usado (HINSCH et al., 1997), os quais são necessários para a prevenção da formação de cristais de gelo intracelular e redução das injúrias da membrana durante e após a congelação (AMIRAT et al., 2005). Assim, evitam danos à estrutura e à fisiologia dos espermatozoides (MEDEIROS et al., 2002), parâmetros esses necessários para a manutenção da fertilidade (THUN, HURTADO, JANETT, 2002).

Os agentes crioprotetores podem ser classificados em: penetrantes, que são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre a célula; e não penetrantes, que aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

De acordo com Amann e Pickett (1987), os crioprotetores não penetrantes elevam a osmolaridade do meio extracelular. Os agentes crioprotetores são responsáveis pela saída da água do interior dele para o meio extracelular, evitando a formação de gelo no interior do espermatozoide durante o processo de criopreservação. Os crioprotetores possuem um alto peso molecular e são normalmente compostos por açúcares, proteínas do leite, aminoácidos, lipoproteínas da gema do ovo de galinha, osmolaridade e pH (tampão), substâncias iônicas ou não, antibióticos e enzimas também podem ser adicionados aos compostos diluidores (VISHWANATH e SHANNON, 2000).

Os crioprotetores penetrantes mais utilizados em meios diluidores para congelação de sêmen em animais domésticos são: glicerol, álcoois, etanol, etilenoglicol, metanol e polietilenoglicol (DE LEEUW *et al.*, 1993), além das amidas,

incluindo a acetamida, formamida, lactamida e o dimetilsulfoxido (DMSO), (NIEMANN, 1991).

2.5. Amidas

Para Bittencourt (2006), outros crioprotetores penetrantes podem ser utilizados para congelar o sêmen de mamíferos domésticos, como os crioprotetores da família dos álcoois, tais como, propilenoglicol, etanol, metanol, bem como de algumas amidas, assim como a acetamida, metilacetamida, dimetilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida, lactamida e butiramida.

Segundo BIANCHI et al. (2008), as amidas são altamente lipofílicas devido à incorporação do grupamento metil (CH₃) que aumenta a permeabilidade da membrana e reduz a toxicidade. Além disso, às amidas também são de natureza hidrofílica, permitindo assim uma maior interação com a água, fazendo com que ocorra uma redução na formação de cristais de gelo intracelular. Com isso, elas podem representar alternativas promissoras também para o congelamento de sêmen em diversos animais, como cães (ACIPRESTE, 2006; ZIMMERMAM et al., 2007; FUTINO 2008; LOPES, 2008; MOTA-FILHO, 2009), coelhos (HANADA e NAGASE, 1980 Apud ACIPRESTE, 2006; KASHIWAZAKI, OKUDA e SEITA, 2006), galos (CHALAH, SEIGNEURIN, BLESBOTS, 1999; TSELUTIN, SEIGNEURIN, BLESBOTIS, 1999) peixes (JOHNSON e LARSSON, 1985), equinos (ALVARENGA et al., 2005) e suínos (BIANCHI et al., 2008) em substituição ao glicerol, elevando os níveis de viabilidade espermática.

Segundo Oliveira (2003), as amidas são alternativas potencialmente viáveis também para o congelamento de sêmen de cães, por apresentar uma forma molecular com três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, sendo, portanto, metade das ligações em comparação ao glicerol. Porém, decorrente da menor viscosidade e solubilidade à água em relação ao glicerol, permitem maior permeabilidade da membrana (NASH, 1966 Apud MOTA-FILHO, 2009) diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causado pelos crioprotetores (BALL e VO, 2001).

A acetamida tem proporcionado efeito crioprotetor satisfatório durante a congelação de sêmen de coelho (KASHIWAZAKI et al., 2006). Já a metilacetamida e

a dimetilformamida têm demonstrado excelente efeito protetor aos espermatozoides congelados de equinos, sendo alternativas promissoras para a congelação de sêmen de garanhões (KEITH, 1998; ALVARENGA et al., 2000; SNOECK, 2003).

MEDEIROS et al. (2002), em estudo comparativo, verificaram que o efeito crioprotetor da dimetilacetamida, metilformamida e dimetilformamida e suas combinações com o glicerol foi inferior no uso *in vitro da* dimetilformamida isolada. Este fato sugere que as amidas podem proteger melhor a célula espermática do garanhão em comparação ao glicerol, sendo, também possível utilizá-la em garanhões que apresentam resultados insatisfatórios com uso do glicerol (SQUIRES, KEITH e GRAHAM, 2004).

Já Bianchi et al. (2008), em estudo realizado com suínos, observaram que a dimetilacetamida e dimetilformamida podem ser utilizadas em substituição ao glicerol nesta espécie, pois obtiveram resultados pós-descongelação superiores tanto para motilidade quanto para integridade de membrana.

De acordo com Futino et al. (2008), a utilização de dimetilformamida a 3% no meio Tris gema com sêmen de cão apresentou valores de motilidade progressiva superiores aos descritos por Zimmermann et al. (2007), que utilizaram uma concentração de 3,5% em meio Tris gema, porém, foram inferiores a 7% de dimetilformamida. Já Oliveira (2003), utilizando meio lactose-gema e 5% de dimetilformamida, obteve motilidade progressiva de 45,5% pós-descongelação. Lopes (2008) relata que não há diferença estatística entre sêmen tratado com crioprotetores glicerol e dimetilformamida, congelado-descongelado quantos aos parâmetros de motilidade e velocidade dos espermatozoides.

2.6. Teste de ligação

A zona pelúcida (ZP) é uma matriz extracelular transparente que envolve o oócito e embrião, em mamíferos, compreende três glicoproteínas: ZPA, ZPB e ZPC. A ZP é um receptor espécie-específico de espermatozoides capacitados e induz a reação acrossômica, elimina a especificidade de espécies para espermatozoides e as interações entre a ZP. Ensaios *in vitro* com oócitos desnudos permitiram observar a ligação de heterólogos (SINOWATZ et al., 2003)

Métodos padrões de análises dos parâmetros preconizados para indicar a fertilidade de um macho ainda são a motilidade, morfologia e concentração espermática (CBRA, 1998). Dessa forma, a habilidade do espermatozóide em se ligar à zona pelúcida (capacidade fecundante) pode ser considerada um valioso parâmetro na análise da eficácia do processo de criopreservação do sêmen (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998).

Ensaio de ligação da ZP *in vitro* foram utilizados para determinar as interações espermatozóide-oócito em muitas espécies domésticas como suína (AMORIM, 2008), equina (MOORE, SQUIRIS e GRAHAM, 2005), bovina (AMORIM, 2009), caprina (SANTOS, 2010) e ovina (MOCÉ, PURDY e GRAHAM, 2010).

Os eventos bioquímicos relacionados à fertilização e a capacidade fecundante são difíceis de mensurar por meio de técnicas básicas de análise de sêmen. Assim, podem-se utilizar os testes de ligação e penetração da ZP como técnicas de avaliação do potencial de capacitação e reação acrossômica do espermatozóide (AMORIM, 2008).

O teste de penetração oocitária "*in vitro*" apresenta vantagens em comparação à fertilização, sendo de rápida execução e também não sendo necessária a maturação do oócito e avaliação do desenvolvimento embrionário, mas somente a avaliação da ligação/penetração do espermatozoide na membrana do oócito. O teste de penetração oocitária pode ser realizado por microscopia de fluorescência (corante Hoechst 33258) ou por microscopia de luz (corante acetato deorceína) (HEWITT e ENGLAND, 1997).

As glicoproteínas da ZP de muitos mamíferos e da membrana perivitelina da gema do ovo de galinha apresentam uma grande similaridade, permitindo que ocorra ligação dos espermatozoides a esta membrana (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998).

Dessa forma, o teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo, por ser uma técnica simples e rápida, pode ser utilizado para identificar a subfertilidade de machos (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998).

2.7. Integridade da membrana e viabilidade espermática

A avaliação das células espermáticas por técnicas que apresentem grande acurácia, maior objetividade e repetibilidade é de grande importância. Dentre as técnicas de avaliação do sêmen, vem sendo utilizadas as sondas fluorescentes, por suas características de marcar estruturas específicas das células e detectar integridade estrutural ou funcional de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide, como o brometo de etídio (HALANGK, FRANK e BOHNENSACK, 1984 Apud MOTA-FILHO, 2009), corantes supravitais, como o Hoechst 33342 (H342) e 33258 (MAXWELL, WELCH, JOHNSON, 1997; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006), SYBR-14 (PURDY e GRAHAM, 2004;) e diacetato de carboxifluoresceína (DCF) (HARRISON e VICKERS, 1990; COLETO, GUERRA e BATISTA, 2002). No entanto, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associado a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GRAHAM, KUNZE e HAMMERSTEDT, 1990; MAXWELL et al., 1997; ARRUDA, 2000; COLETO et al., 2002; ARRUDA, e CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006; PETERSON et al., 2007).

Coletto, Guerra e Batista (2002) relatam que o uso do diacetato de carboxifluoresceína em combinação com o iodeto propídio para avaliação da viabilidade espermática apresentou uma pequena correlação entre a técnica de fluorescência, motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$).

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é uma sonda fluorescente, comumente utilizada para avaliação da integridade acrossomal dos espermatozoides em muitas espécies (SUKARDI, CURRY e WATSON, 1997). FITC é prendido a uma lectina, isolada da semente de plantas que, especificamente, se liga aos resíduos de açúcar (TROWBRIDGE, 1974). Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, aglutinina da ervilha) e aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, aglutinina do amendoim) são as principais aglutininas usadas para determinar a integridade do acrossoma (GRAHAM, KUNZE e HAMMERSTEDT, 1990). A lectina de amendoim cora o acrossoma com uma maior

intensidade e com uma ligação menos específica que outras lectinas como a PSA (GRAHAM, FOOTE e PARRISH, 1986).

A associação de sondas fluorescentes, de forma a permitir a avaliação da membrana plasmática, do acrossoma e da mitocôndria, têm sido empregadas nas pesquisas realizadas nos últimos anos. Todavia, muitos dos protocolos são laboriosos e demorados, tornando difícil sua aplicação na rotina da avaliação seminal (CELEGHINI, 2005).

Para simplificar o uso combinado de sondas fluorescentes no sêmen de bovino, Celeghini (2005) testou várias associações para avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial: PI com FITC-PSA e Rodamina 123; PI com FITC-PSA e Mito Tracker Green FM (MITO); PI com FITC-PSA e a Mito Tracker Red (CMXRos) e; PI com FITC-PSA e JC-1. Dentre os protocolos testados, a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 foi a escolhida devido a sua simplicidade, alta repetibilidade e acurácia e por fornecer um maior número de dados em relação às demais combinações.

Peterson et al. (2007) utilizaram uma combinação de sondas SYBR®14/IP, para avaliar a integridade da membrana de espermatozoides caprinos e relataram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de dimetilformamida, associado ou não ao glicerol, no diluente de sêmen caprino sobre o potencial fecundante após a criopreservação.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a melhor concentração de dimetilformamida, associado ou não ao glicerol, adicionado ao diluente de sêmen caprino:
- Necessário para elevar a sobrevivência espermática após a diluição, o resfriamento e descongelamento;
- Sobre a motilidade espermática após a diluição, o resfriamento e descongelamento;
- Sobre a viabilidade, a integridade da membrana e o potencial fecundante dos espermatozoides em testes *in vitro* após o descongelamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas CEDEP/UNIVASF, aceito sob o protocolo de número 0005/161012.

4.2. Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich do Brasil (São Paulo, SP), com exceção da solução SYBR-14/PI (LIVE/DEAD Sperm Viability®) e do dimetilsufoxido, proveniente da Molecular Probes e Vetec (Recife, PE, Brasil), respectivamente.

4.3. Local e período experimental

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura, no Centro de Pesquisa em Suínos Nativos e Silvestres (CEPSENS) da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, localizada a 09°23' 55" de latitude S e 40°30'03" de longitude O, com altitude média de 376 m e índice pluviométrico anual de 300 mm. A região apresenta temperatura média anual em torno dos 27 °C e clima do tipo Bsh segundo a classificação de Köppen-Geiger. O período experimental foi de Março de 2013 a Janeiro de 2014.

4.4. Colheita, avaliação e diluição do sêmen a fresco

O sêmen foi coletado de quatro reprodutores caprinos, de fertilidade comprovada, sexualmente maduros, com idade média de 3 anos. Foram realizadas 13 coletas por animal, perfazendo um total de 52 ejaculados, utilizando-se uma fêmea em estro como manequim, A coleta do sêmen foi realizada pelo método da vagina artificial. O ejaculado foi armazenado em tubos graduados de plástico, tipo

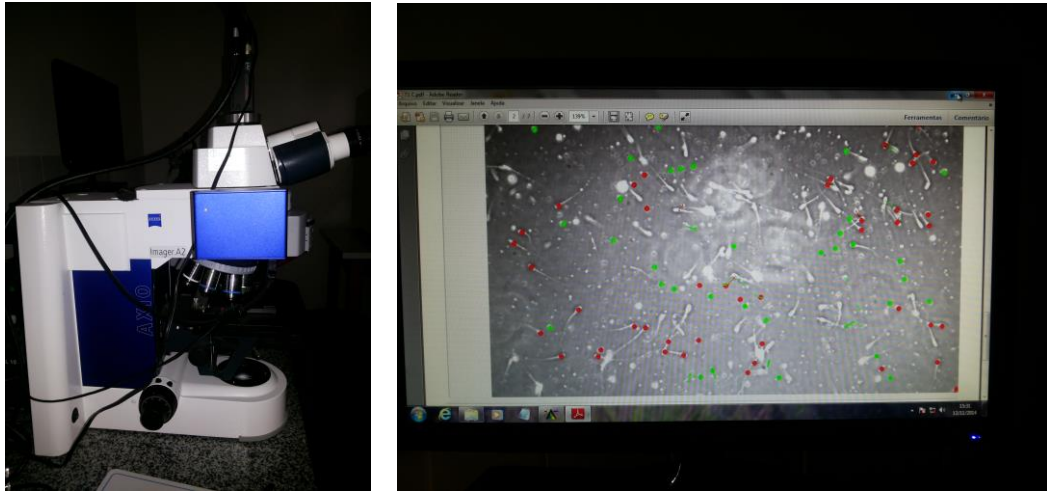
Falcon (15 mL), protegidos da luz solar, com papel laminado, acondicionados dentro de um recipiente de isopor, com o objetivo de manter a temperatura a 37°C durante a coleta.

O volume do ejaculado foi determinado utilizando pipetador automático (Labmate®, São Paulo, Brasil). O turbilhonamento foi determinado em uma escala de 0 a 5, onde 0 = totalmente sem movimento, ; 1 = apenas movimento individual de poucos espermatozoides (10% de espermatozoides ativos); 2 = observam-se os movimentos espermáticos, mas não forma ondas (20-40% de espermatozoides ativos); 3= Ondas de baixa amplitude e movimento lento (45-65% de espermatozoides ativos); 4= ondas rápidas e vigorosas, não forma redemoinho (70-85% de espermatozoides ativos); 5= ondas muito rápidas e densas que se juntam formando um redemoinho; difícil determinar ondas isoladas (90% ou mais de espermatozoides ativos). Para tanto, foi realizada a deposição de uma gota de sêmen em lâmina pré-aquecida a 37°C e observado ao microscópio óptico em objetiva de 10 a 20 vezes (OLIVEIRA, 2013).

O vigor foi determinado em escala que de 0 à 5 onde: 0= Espermatozóides imóveis ou mortos; 1= espermatozoides sem movimento progressivo, girando sobre si mesmo; 2= espermatozoides com movimento anormal ou eventualmente progressivo; 3= espermatozoides com movimento progressivo lento e sinuoso; 4= espermatozoides com movimento progressivo muito rápido; 5= espermatozoides com movimento progressivo e enérgico (OLIVEIRA, 2013).

Para avaliar a motilidade espermática, 8 µL de sêmen de cada ejaculado foram colocados entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, e foram observados através da análise espermática computadorizada (CASA; Figura 2). A motilidade espermática progressiva foi classificada em percentagem numa escala de 0 a 100% (CBRA, 1998). A motilidade expressa em percentual de células móveis da amostra.

Figura 2 - Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)



Ejaculados que apresentaram motilidade e o vigor espermático maiores ou iguais a 70% e 3, respectivamente, foram diluídos com 3 mL de TRIS, a 37 °C, homogeneizado e centrifugados a 800 G, por 7 minutos (MOOK e WILDEUS, 2008). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de espermatozoides ressuspenso em 1 mL de TRIS para a determinação da concentração espermática.

A concentração espermática foi determinada usando fotômetro (SDM6 MINITUB®; Berlim - Alemanha, Figura 3). Para tanto, foi adicionado 4 mL de NaCl 0,9% em curvetas, além de 0,8 µL de sêmen fresco. Em seguida, foi determinada a concentração final de 120×10^6 espermatozoides/mL.

Figura 3 - Fotômetro SDM6 (Minitub®)



Determinada a concentração espermática, foi realizada a diluição do sêmen de acordo com os grupos de tratamento. Os diluentes utilizados foram:

- Controle = TRIS-Gema (2,5% de gema de ovo) + 2% de glicerol
- DMF2% = 2% dimetilformamida
- DMF3% = 3% dimetilformamida
- DMF4% = 4% dimetilformamida
- DMF5% = 5% dimetilformamida
- DMF2+GL2%) = 2% dimetilformamida + 2% glicerol

4.5. Congelamento e descongelamento do sêmen diluído

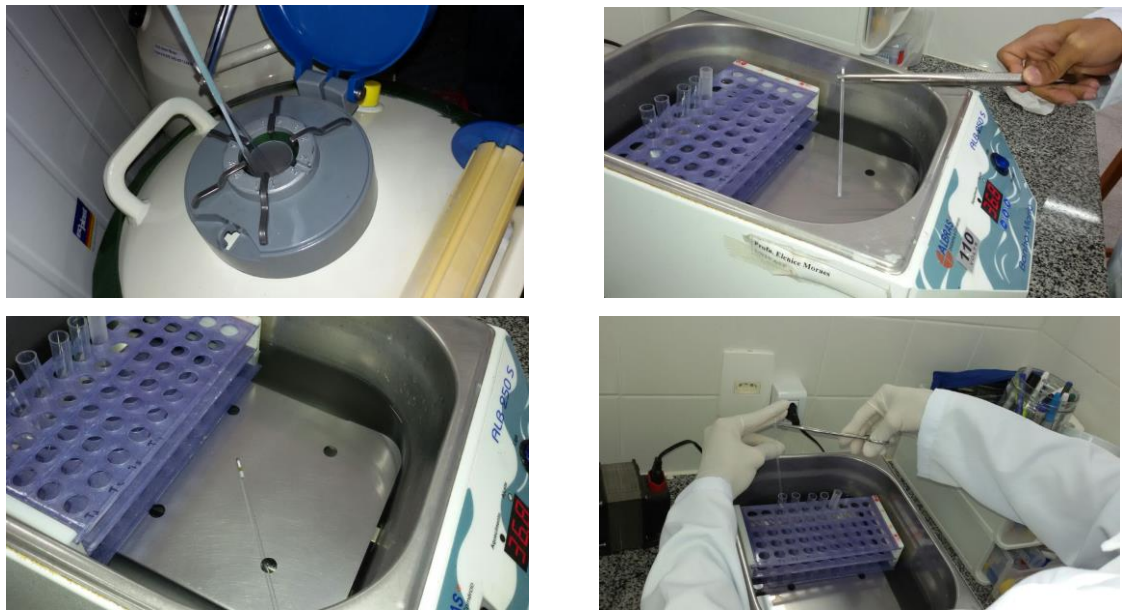
Após a diluição o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, modelo Francês, para uma concentração total de 60 milhões de espermatozoides/dose. Em seguida, as palhetas foram levadas à câmara fria em recipientes plásticos contendo 120 mL de álcool etílico absoluto, mantidos a 5°C durante duas horas (Figura 4). Depois, as palhetas foram dispostas horizontalmente em rampa de congelação por 7 minutos, sob os vapores de N₂ líquido a 5 cm de sua superfície, utilizando uma caixa de isopor. Em seguida, as palhetas foram mergulhadas diretamente no N₂ líquido e estocadas em botijões criogênicos até análises.

Figuras 4 - Recipientes plásticos submetidos ao processo de resfriamento à 5°C .



As amostras, de cada tratamento, foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, sendo o sêmen acondicionado em tubos de ensaio plásticos de 4,0 mL previamente aquecidos e mantidos a 37 °C (Figura 5).

Figura 5. Descongelamento das palhetas em Banho-maria 37°C eacondicionamento em tubo plástico de 4 mL para análise.



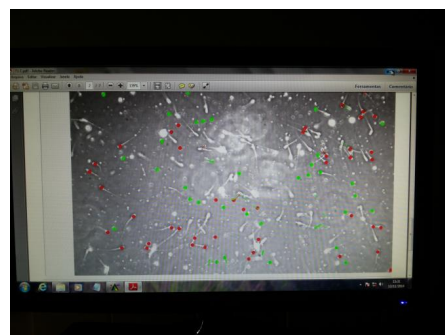
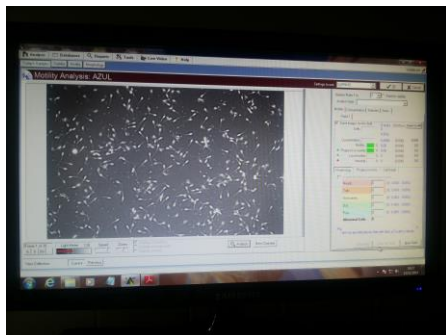
4.6. Avaliação do sêmen

4.6.1. Avaliação da motilidade espermática

A cinética espermática foi avaliada com auxílio do Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; Minitub®, Berlin, Alemanha), com o programa *SpermVision*® (Berlin, Alemanha), tanto para os sêmens, diluído, resfriado e congelado-descongelado. Foram retiradas alíquotas de 8 µL de cada amostra e analisada individualmente sob lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C (Figura 6). Para avaliação da cinética espermática foram, capturados em cinco campos ou um mínimo de 2000 espermatozoides, por amostra. Foram avaliados pelo sistema CASA, usando microscópio de contraste de fase, com objetiva de 10x. Dentre os parâmetros espermáticos fornecidos, foram avaliados: percentual de

espermatozoides móveis (MT) e percentual de espermatozoides com movimento progressivo (MP).

Figura 6 - Análise dos parâmetros de motilidade total e progressiva por meio do CASA.



4.6.2. Avaliação da viabilidade espermática

Após descongelamento, conforme supracitado, as amostras de cada tratamento foram diluídas na proporção de 1:1 com diluente B-TALP (NOLAN, GRAHAN, HAMMERSTEDT, 1992). Posteriormente a homogeneização, retirou-se uma alíquota de 100 μ L a qual foi acondicionada em tubo eppendorf contendo 2,5 μ L da solução corante SYBR-14/PI (LIVE/DEAD Sperm Viability® - Molecular probes), previamente, descongelado em banho-maria, a 37°C. Células fluorescentes foram mensuradas utilizando um filtro para detectar o corante SYBR-14 e para detectar PI. Utilizando este protocolo, todas as células coradas com SYBR-14, foram distinguidas das partículas de gema de ovo, e apenas as células não viáveis foram

coradas com PI, após incubação das amostras, em temperatura ambiente, por 15 minutos.

Uma alíquota de 8 µL de espermatozoides de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina pré-aquecida, a 37 °C e um mínimo de 200 células por amostra foram analisadas sob microscópio de epifluorescência (AXIO Imager. A2 - ZEISS®, Berlin, Alemanha).

4.6.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial

Após descongelamento, as amostras de cada tratamento foram diluídas 1:1 (v:v) com diluente B-TALP. Para a microscopia de fluorescência, foram associados os marcadores iodeto de Propídeo (PI), *Arachis hypogaea* (FITC-PNA) e Rodamina 123, protocolo adaptado de CELEGHINI (2005). Em seguida, adicionou-se 6 µL de PI, 2 µL de R123 e 50 µL FITC-PNA, sendo, posteriormente, homogeneizados e incubados por 30 minutos, a 37° C. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 800 G, por 7 minutos. O pellet foi ressuspenso em B-TALP. Finalmente, confeccionou-se uma lâmina, sendo, então, contadas 200 células no microscópio de fluorescência.

Os espermatozoides receberam a seguinte classificação: (PI+) Lesão na membrana plasmática, acrossoma danificado e com atividade mitocondrial (PI+, FITC-PNA+, R+), lesão na membrana plasmática, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI+, FITC-PNA-, R+), membrana plasmática sem lesão, acrossoma íntegro e com atividade mitocondrial (PI-, FITC-PNA-, R+).

Os espermatozoides receberam a seguinte classificação: (PI+): Lesão na membrana plasmática marcado com a cor vermelha; (PI-): Sem lesão na membrana plasmática sem marcação/incolor; (FITC-PNA+): Acrossoma danificado marcado com a cor verde; (FITC-PNA-): Acrossoma íntegro sem marcação/incolor; (R+): Peça intermediária com atividade mitocondrial marcado com a cor verde; (R-): Peça intermediária sem atividade mitocondrial sem marcação/incolor.

4.6.4. Teste de fecundação *in vitro*

Para o ensaio de ligação dos espermatozoides a membrana perivitelina da gema do ovo a amostra após descongelamento foi ressuspensa em 1 mL de B-TALP contendo 35 µg de Hoechst 33342 (B-2261), incubada por 15 minutos, a 37 °C e, depois, foi ressuspensas para uma concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL em B-TALP.

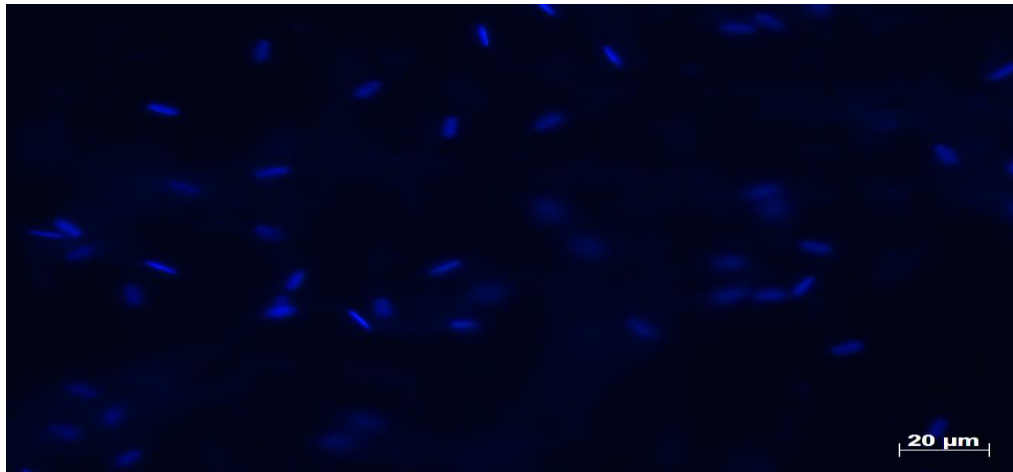
Alíquotas de 2 µL (50.000 espermatozoides) do sêmen de cada tratamento foram adicionadas em cada tubo contendo a membrana perivitelina do ovo de galinha (MPV).

Preparados os espermatozoides, deu-se a preparação da membrana perivitelina e ensaio de ligação espermatozoide-membrana para verificar a habilidade do espermatozoide caprino em se ligar à membrana de oócitos foi conduzida utilizando a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*), como descrito por Barbato et al. (1998) e modificado como segue. As membranas perivitelinas (MPVs) foram preparadas pela separação da gema de ovo da clara, e remoção do excesso de clara utilizando um papel toalha. A gema de ovo intacta foi colocada sobre um pedaço de parafilme, sendo, em seguida, rompida a membrana da gema e, cuidadosamente, lavada com B-TALP (GRAHAM, FOOTE e PARRISH,1986), mantendo a membrana no parafilme. A membrana foi, então, removida do parafilme e colocada em uma placa de petri de vidro e lavada, várias vezes, com TALP até a solução ficar clara e sem resíduo de gema de ovo. A MPV foi, cuidadosamente, aberta e cortada em pequenos fragmentos (1x1 cm), utilizando uma cubeta de espectrofotômetro. Cada quadrado de MPV foi colocado dentro de tubos de cultura (16x100 mm), contendo 1 mL de B-TALP. Utilizou-se três MPVs como replicatas para cada tratamento. Cada MPV foi "inseminada" com 50.000 espermatozoides (de cada tratamento). As membranas e os espermatozoides foram incubados por 1 hora, a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar, e os tubos agitados, gentilmente, a cada 30 minutos, para manter a membrana aberta.

Após a incubação, cada membrana foi colocada em outro tubo contendo 1 mL de TALP e lavada com B-TALP para remover os espermatozoides que não se ligaram. Cada quadrado de MPV foi colocado sobre uma lâmina, gentilmente aberta para remover as dobras, coberta com uma lamínula e examinada utilizando

microscópio de fluorescência, com um aumento de 400x. Para determinar o número de espermatozoides ligados à membrana, foram contados em 6 campos aleatórios de cada amostra MPV, foi determinado, e o número relativo de espermatozoides ligados por membrana para cada tratamento calculado, pela divisão do número total de espermatozoides ligados à MPV pelo número de espermatozoides ligados a mesma membrana pelo grupo controle. A média relativa para as 3 replicatas das membranas foi determinada para cada tratamento (Figura 7).

Figura 7. Teste de ligação em membrana perivitelina da gema de ovo de galinha corando as células espermáticas em azul com Hoechst 33342 (Fonte: Arquivo Pessoal)



4.7. Análise estatística

As variáveis foram submetidas à Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.1.

5. RESULTADOS

Não houve diferença quanto à motilidade total e progressiva entre os tratamentos para o sêmen fresco e resfriado. Entretanto, quando comparado os tratamentos para o sêmen congelado-descongelado foram observados resultados estatisticamente superiores para o sêmen criopreservados com 2% de dimetilformamida em relação ao controle e demais tratamentos ($p>0,05$). Os resultados provenientes da avaliação do movimento espermático para o sêmen congelado-descongelado são apresentados na Tabela 1.

Vale salientar que os valores médios das características observadas estão acima dos padrões mínimos de motilidade considerados para a espécie (CBRA, 1998).

Tabela 1 - Motilidade total e progressiva (%) de espermatozóides de caprinos submetidos a diferentes níveis de dimetilformamida, associada ou não ao glicerol antes da criopreservação

TRATAMENTO	TOTAL (%)		
	FRESCO	RESFRIADO	CONGELADO / DESCONGELADO
C	94,34±3,59	93,34±4,77	35,46±15,79 ^a
DMF2%	94,65±3,27	93,90±3,89	41,57±18,18 ^b
DMF3%	94,82±4,09	93,76±6,08	39,98±16,26 ^a
DMF4%	94,92±3,01	93,71±4,89	40,73±19,07 ^a
DMF5%	94,78±3,03	92,34±5,88	38,40±15,13 ^a
DMF2%+GL2%	90,90±3,25	94,63±3,76	39,01±16,45 ^a
PROGRESSIVA (%)			
C	89,55±4,91	87,90±6,30	23,71±14,93 ^a
DMF2%	90,03±4,91	88,90±4,85	29,96±17,25 ^b
DMF3%	90,80±5,08	89,13±7,18	29,21±16,16 ^a
DMF4%	90,34±4,28	88,42±6,34	29,57±19,07 ^a
DMF5%	89,80±4,63	86,01±7,71	27,46±14,94 ^a
DMF2%+GL2%	90,90±3,25	89,67±4,81	27,21±17,14 ^a

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$); C: Controle; DMF2%: 2% dimetilformamida; DMF3%: 3% dimetilformamida; DMF4%: 4% dimetilformamida; DMF5%: 5% dimetilformamida; e DMF2%+GL2%: 2% dimetilformamida + 2% glicerol.

As médias da viabilidade e o número de espermatozóides ligados à membrana perivitelina da gema do ovo não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 - Viabilidade (%) e número de espermatozoides de caprinos ligados a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha (NSLM), submetidos a diferentes concentrações de dimetilformamida no sêmen, associada ou não ao glicerol, após o descongelamento

TRATAMENTOS	VIABILIDADE (%)	NSLM
C	28,92±20,71	124,59±63,68
DMF2%	32,55±23,64	141,73±58,40
DMF3%	28,92±27,09	143,40±66,98
DMF4%	32,13±24,73	146,84±61,93
DMF5%	31,90±24,56	153,01±71,04
DMF2%+GL2%	34,52±22,42	140,96±56,19

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$); C: Controle; DMF2%: 2% dimetilformamida; DMF3%: 3% dimetilformamida; DMF4%: 4% dimetilformamida; DMF5%: 5% dimetilformamida; e DMF2%+GL2%: 2% dimetilformamida + 2% glicerol.

O teste de avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial não emitiu padrão de fluorescência confiável, variando o tempo e grau de fluorescência. Além disso, a necessidade de centrifugação para retirar o excesso dos reagentes Rodamina 123 associada ao FIFC-PNA e PI acarretou em um grande número de células mortas com padrão de fluorescência positivo para rodamina 123. Portanto, divergindo da motilidade e viabilidade real do sêmen descongelado. Por estes motivos, tal protocolo não é válido para espécie caprina.

6. DISCUSSÃO

A dimetilformamida por ter uma menor viscosidade, maior permeabilidade de membrana e menor peso molecular (73,09), em relação ao glicerol (92,05), pode reduzir os danos causados durante o estresse osmótico (DALIMATA e GRAHAM, 1997; BALL e VO, 2001). A viscosidade e a composição iônica dos meios diluentes, bem como as taxas de diluição e a temperatura podem ser fatores influentes na motilidade espermática (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001).

A motilidade total e progressiva encontrada no presente estudo foi influenciada pela substituição do glicerol em relação à dimetilformamida a 2%, onde, foram encontrados melhores resultados na utilização do DMF2%. A associação do glicerol à dimetilformamida, não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle. Corroborando com nossos dados das associações, Silva et al. (2006) verificaram a motilidade de espermatozoides de caprinos das raças Parda Alpina e Saanen após avaliação da adição de glicerol (controle: 67,8%) e/ou dimetilformamida (3,5%: 61,1%, e 5%: 53,6%). Similarmente, Acipreste (2006) não observou efeito da associação da dimetilformamida com glicerol em meio Tris-Gema quanto à motilidade progressiva de espermatozóide de cães após descongelamento. Entretanto, os valores para motilidade progressiva observados por estes autores nos tratamentos realizados foram superiores aos obtidos no nosso estudo. Isto pode ser explicado pela diferença genética dos animais ou pelo diluente utilizado.

A dimetilformamida e acetilformamida são crioprotetores promissores para motilidade do sêmen suíno descongelado, obtendo resultados superiores ao glicerol (BIANCHI et al., 2008). Zahn (2002) encontrou um aumento da motilidade progressiva de espermatozoides equinos quando da utilização de diferentes amidas associadas ao glicerol após descongelamento, comparado ao uso exclusivo de glicerol como crioprotetor. Entretanto, Keith (1998), ao utilizar a dimetilformamida e glicerol, isoladamente, em sêmen equino, constatou que o glicerol apresentou superioridade nos parâmetros de motilidade progressiva.

Gonzalez (2004) em experimento realizado com bovinos, comparando glicerol 3%, etilenoglicol 7% e dimetilformamida 7%, descreve que o glicerol apresentou os melhores resultados de motilidade logo após a diluição discordando dos resultados encontrados em nosso estudo.

Discordando do nosso estudo Mota Filho (2009), utilizando diferentes concentrações de dimetilformamida no sêmen canino, diluído em ACP-106C, foi insatisfatória, tendo melhores resultados para motilidade progressiva com a utilização do glicerol como crioprotetor. Entretanto, Betancur, Oquendo e Araque, (2011), trabalhando com sêmen canino descongelado, não encontraram melhoria da motilidade e integridade da membrana, quando da utilização de glicerol e dimetilformamida a 5%.

O teste de ligação à membrana perivitelina da gema do ovo, trata-se de uma técnica simples e rápida, podendo ser utilizada para identificar a subfertilidade de machos (BARBATO et al., 1998). O presente estudo em ensaio de ligação à membrana perivitelina (MPV) da gema do ovo demonstrou que os espermatozoides caprinos, após criopreservação, podem ligar-se à MPV. O teste sugere que a membrana perivitelina da gema do ovo de galinha possui receptores similares ao dessa espécie.

A zona pelúcida é um receptor espécie-específico de espermatozoides capacitados, induz a reação acrossômica, elimina a especificidade de espécies para espermatozoides e as interações da zona pelúcida. Fato confirmado pela maior parte das espécies de mamíferos que apresentam glicoproteínas da zona pelúcida similares a da membrana perivitelina da gema do ovo de galinha. Sinowatz et al. (2003), em ensaios *in vitro* com oócitos desnudos, permitiram observar a ligação de heterólogos, o que permite uma eficácia do ensaio para predizer a qualidade espermática.

Os eventos bioquímicos relacionados à fecundação e à capacidade fecundante são difíceis de mensurar por meio de técnicas básicas de análise de sêmen. Assim, podem-se utilizar os testes de ligação e penetração da zona pelúcida como técnicas de avaliação do potencial de capacitação e reação acrossômica do espermatozoide (AMORIM, 2008).

A associação das sondas fluorescentes SYBR-14/PI demonstrou-se eficiente para distinção entre células espermáticas vivas e mortas da espécie caprina com um tempo médio de visualização de sessenta segundos. Garner e Jhonson. (1994) encontraram resultados semelhantes ao analisar sêmen de bovinos. Garner et al. (1995) avaliaram a eficiência da associação das sondas SYBR-14/PI no sêmen de coelhos, bois, carneiros, suínos e homens, demonstrando a eficiência na distinção entre células mortas e vivas. Assim como no presente estudo Garner et al. (1994)

relataram ainda a vantagem de visualização com pouca presença de artefatos de coloração.

Peterson et al. (2007) utilizaram uma combinação de sondas fluorescentes SYBR®14/IP para avaliar a integridade da membrana de espermatozoides caprinos e relataram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis. Porém, Coletto et al. (2002) utilizando a combinação de diacetato de carboxifluoresceína (DCF) com iodeto de propídio (PI) para avaliação da viabilidade espermática de caprinos demonstraram baixa correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermático ($r=0,1403$).

Ball e Vo (2001) encontraram correlação entre a quantidade de células vivas e mortas com a utilização da sonda PI em sêmen equino submetido a diluição em TALP com diferentes osmolaridade.

Garner et al. (1997) avaliando sondas fluorescentes como parâmetro de viabilidade espermática em sêmen bovino relatam que o SYBR-14/PI, assim como em nosso estudo, apresentou resultados correlacionados à motilidade. Alm et al. (2001), em ensaio fluorométrico automatizado, encontraram correlação positiva ($P=0,016$; $r=0,05$) entre viabilidade espermática detectada pelo PI e a fertilidade de touros.

A dimetilformamida (5%), metilformamida (5%) e o glicerol (3%) foram avaliados quanto a sua capacidade crioprotetora em sêmen suíno (BIANCHI et al. 2008), onde as amidas apresentaram maior quantidade de células com membrana celular íntegra coradas com CFDA/PI. Já em nosso estudo não houve diferença estatística entre os tratamentos quando comparados à integridade da membrana espermática.

Januskauskas et al. (2001), em estudo, afirmam possuir correlação negativa entre partidas ($r=-0,39$) e touros ($r=-0,57$) reativas ao PI. Entretanto, no mesmo estudo encontrou correlação positiva entre células íntegras negativas para H258, tendo em partida ($r=0,50$) e touros ($r=0,58$).

Portanto, a associação de sondas fluorescentes como ferramenta para determinar com maior acurácia a fertilidade de machos necessita de maiores esclarecimentos e protocolos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tendo em nosso experimento sido demonstrado a eficiência da utilização do SYBR-14/PI para diferenciação de células vivas e mortas. A sonda H33342 também apresentou

padrão de fluorescência compatível com os resultados encontrados para motilidade total e progressiva. Já a associação das sondas FITC-PNA + PI + RODAMINA 123 não é recomendada para determinação dos parâmetros de integridade do acrossoma, membrana plasmática e atividade mitocondrial em sêmen caprino desde que nas mesmas circunstâncias do nosso estudo.

Já a dimetilformamida associada ou não ao glicerol em meio diluente TRIS-Gema pode ser capaz de conservar e manter a viabilidade espermática do sêmen caprino, atuando como crioprotetor e mantendo a mesma qualidade das células espermáticas que o glicerol isoladamente.

7. CONCLUSÃO

A adição de dimetilformamida a 2%, apresentou melhores resultados quando comparado a associação ou não ao glicerol, no sêmen congelado-descongelado de caprinos.

A associação das sondas fluorescentes SYBR-14/PI pode ser empregada como avaliação da viabilidade dos espermatozoides caprino, sendo, uma técnica simples e de alta repetibilidade.

8. REFERÊNCIAS

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.

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, e function. **Arch Biochem Biophys**. v. 379, p. 173-82, 2000.

ACIPRESTE, A. C. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando associações de crioprotetores e dois protocolos de descongelamento**. Viçosa, Minas Gerais 2006, 59f. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2006.

AISEN, E. G. e VENTURINO, A. Coleta e avaliação de sêmen. In: AISEN, E. G. Reprodução Ovina e Caprina. São Paulo: MedVet, cap.5, p. 57-73, 2008.

ALM, K.; TAPONEN, J.; DAHLBOM, M.; TUUNAINEN, E.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. **Theriogenology**, v.56, p.677-664, 2001.

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J K. KEITH, SL; LANDIM-ALVARENGA FC; SQUIRES, LE. **Alternative cryoprotectors for freezing satallion spermatozoa** . 14th int cong. Animal Reproduction. v. 2, p. 157, 2005.

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

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: **Equine Reproduction** (A.O. McKinnon e J.L. Voss Eds.) Lea e Febiger. Philadelphia, London. p. 715-745, 1993.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUTT, I.; COURTENS, L.J. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction, Dordrecht**, v. 129, p. 535-543, 2005.

AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZIRRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C. A. A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 201-2014, 2009.

AMORIM, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen**. Viçosa-Minas Gerais, 2008, 174f. (Tese de Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, 2008.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Science Veterinariae**, v.31 (Suplemento), p.230-231, 2003.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120p. (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.

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.

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biology of Reproduction, Champaign**, v. 58, p. 686-699, 1998.

BIANCHI, I., CALDERAM, K., MASCHIO, E.F., MADEIRA, E.M., ULGUIM, R.R., CORCINI, C.D. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 632-638, 2008.

BETANCUR, G.R.; OQUENDO, J.G.; ARAQUE, N.V. Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. **Lasallista de investigación**, v. 8, p. 9-17, 2011.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. São Paulo, 2005, 186f (Tese de Doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo), 2005.

CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOTS, E., In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Criobiology**, v. 39, p. 185-191, 1999.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 49p. (Manual), 2008.

COLETO, ZF; GUERRA, MMP; BATISTA AM. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

CORTEEL, J.M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect. **Anim Biochem Biophys**, v. 14, p. 741-745, 1974.

CORTEEL, J.M. Production, storage and artificial insemination of goat semen. Management of reproduction in sheep and goats symposium, **Madison**, v. 24, n. 25, p. 188-274, 1977.

CORTELL, J. M. Colletion, processing and artificial insemination of goat semen. Nouzilly – Fance: INRA, p. 28, 1981.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with threalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.

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

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, Ed. 2, Cap. 2, p. 29-77, 1994.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C.. **Salomon's artificial insemination of sheep and goats, butter worths**, Wellington, New Zeland, 1987.

FAWCETT, D.W. The mammalian spermatozoon. **Dev Biol**. v. 44, p. 394-436, 1975.

FIGUEIREDO, J. R; RODRIGUES, A. P. R; AMORIM, C. A. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA**. In: GONSALVES, P. B. D. FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Varela, p. 227-260. 2002.

FUTINO, D.O. **Uso de glycerol, metil-formamida como crioprotetores de sêmen caprino**. Brasília-DF, 2008, 72f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Animais) Universidade de Brasília. 2008.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S. T.; ROTH, B. L.; HAUGLAND, R. P. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Journal of Andrology**, v. 15 (6), p. 620-629, 1994.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L.A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Biology of Reproduction**. v. 53, p. 276-284, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DE JARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; et al. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa e their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**. v. 58, p. 28-36, 1998.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Pirassununga, 2004. 94f. (Tese Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, e mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H., PARRISH, J.J. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull sperm into zona-free hamster eggs, **Biology of Reproduction**. v. 35, p. 413–424, 1986.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed., Barueri-SP: Manole, p. 530, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: _____. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 24, p. 513-535.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Archiv für experimentelle Veterinärmedizin**, v. 38, p. 105-114, 1984.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HANADA, A., NAGASE, H., Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**. v. 60, p. 247-252, 1980.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 123–139, 1997.

HINSCH, E.; HINSCH, K. D.; BOEHM, J. G.; SCHILL, W. B.; MUELLERSCHLOESSER, F. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. **Reproduction in Domestic Animals, Berlin**, v. 32, p. 143-149, 1997.

HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recents developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. **Reproduction in Domestic Animals**. 26(1), 1992.

HOPKINS, S. M.; EVANS, L. E. 1991 In: **McDonald, E. Endocrinologia Veterinária e Reprodução**. 4º ed. Interamericana. São Paulo.

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

HUNTER, R. H. F. 1982 **Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos animais domésticos**. Ed. Acribia. Zaragoza.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the "hamilton thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. **Theriogenology**. v. 55, p. 733-749, 2001.

IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. **Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation**. In: SILVER JUBILEE LAB. ANIM. HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY. 1961, Kyoto. *Proc. Kyoto*, p. 97-104, 1961.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v.55, p. 947-961, 2001.

JOHNSON, L.A., LARSSON, K. **Deep freezing of boar semen**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1985.

KASHIWAZAKI, N., OKUDA, Y., SEITA, Y., 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction. Development**, v. 52, p. 511-516, 2006.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104f, (Tese doutorado) - Colorado State University, 1998.

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

LOPES, K. R. F. **Uso da Dimetilformamida como crioprotetor alternativo para o sêmen canino**. Mossoró, Rio Grande do Norte, 2008. 76f. (Dissertação Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2008.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295-304, 2006.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, fertility, and development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MAXWELL, W.M.C; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology** 247(3 Pt 1) p.125- 142, 1984.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, New York, v. 57, n.1, p. 327-344, 2002.

MEMON, M.A.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 2, p. 473-475, 1985.

MOCÉ, E., PURDY, P. H., GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 236-247, 2010.

MOOK, J. L.; WILDEUS, S. Effect of egg yolk level, washing and extended pre-freeze equilibration on postthaw motility of buck semen. **Southern section American Society of Animal Science annual Meeting**. Dallas, TX. 2008.

MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241–249, 2005.

MOTA FILHO, A. C. **Efeito da Adição de Dimetilformamida ao Diluente ACP-106 C Sobre as Características do Sêmen Canino Congelado**. Fortaleza, 2009, 103f. (Dissertação de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2009.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. NewYork: Academic Press, p. 179-220, 1966.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, New York, v. 35, p. 109-124, 1991.

NOLAN, J.P.; GRAHAM, J.K.; HAMMERSTEDT, R.H. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. **Arch Biochem Biophys.**, v. 292, p. 311–322, 1992.

NUNES, J. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. 1982 33f. (Tese Doutorado), Université Pierre et Marie Curie. Paris. 1982.

OLIVEIRA, E.C.S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a congelação do sêmen canino**. Belo Horizonte. 2003 61f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

PAPA, R.T.C.; SANTOS, F.O.; MACEDO, L.P.; MELO C.M.; DELL'AQUA, Jr. J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen equino em meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 350-352, 2003.

PETERSON K, KAPPEN MAPM, URSEM PJF, NÖTHLING JO, COLENBRANDER B, GADELLA BM. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch Albucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007.

PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004.

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

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. Journal Biology Science**, v. 35, n. 3, p. 305-312, 1982.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318-319, 1957.

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

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; VIEIRA, M. J. A. F.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; SALGUEIRO, C. C.M.; NUNES, J. F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família characidae. **Ciência Animal**, v. 22(1), p. 255-268, 2012.

SANTOS, M. C. R.; **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozóides caprinos**. 2010. 54f. (Dissertação Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

SILVA, A. F. Uso da dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. Viçosa-MG, 2004, 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa - MG, 2004

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 8., 1989, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.171-177, 1989.

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMULLER, C. et al. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38(2), p. 141-146, 2003.

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

SNOECK, P. P. N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade**. 2003, 116f. Tese (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SUKARDI, S., CURRY, M.R., WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status e viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46(1 -2), p. 89-96, 1997.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-PlusR and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**., New York, v. 57, p. 1087-1094, 2002.

TROWBRIDGE, I.S. Isolation e chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. **Journal Biological Chemistry**, v. 249 (18), p. 6004-12, 1974.

TSELUTIN, K., SEIGNEURIN, F., BLESBOTOS, E. Comparison of crioprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**. v. 78, p. 586-590, 1999.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine sêmen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 871-891 1995.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes, In: MORRIS, G.J., CLARKE, A. (Eds.), **Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**, Academic Press, New York, p.189–218, 1981.

WEITZE, K. F.; PETZOLDT, R. Preservation of semen. **Reproduction Scice**, v. 28, p. 229-235, 1992.

ZAHN, F.B. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. 2002. 110p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu – SP, 2002.

ZIMMERMANN, M.; SANTOS T. E.; FIDELIS, A. A. G.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. 2007. Uso de dimetil-formamida e água de coco na congelação de sêmen canino. **Bioscience Journal**, v. 23, nº1, p. 96-100, 2007.

BITTENCOURT, R.F. Criopreservação do sêmen caprino: influência dos diluidores de congelação, tempos de equilíbrio e curvas de resfriamento. Salvador, Bahia, 2006. 88p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2006.

9. ANEXOS

ANEXO I

Arquivo analisado:

D:\wasley\Mot p e mot T.dbf

Variável analisada: MOT

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	5	606.123932	121.224786	1.104	0.3564
FASE	2	628538.950855	314269.475427	2863.135	0.0000
TRT*FASE	10	760.779915	76.077991	0.693	0.7316
erro	918	100763.461538	109.764119		
Total corrigido	935	730669.316239			
CV (%) =	13.81				
Média geral:	75.8376068	Número de observações:	936		

Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 3,388451086957 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 156
 Erro padrão: 0,838818305419025

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	74.384615	a1
T5	75.179487	a1
T6	76.102564	a1
T3	76.192308	a1
T4	76.455128	a1
T2	76.711538	a1

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 1,96967823618043 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 312
 Erro padrão: 0,593134111945201

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	39.195513	a1
RESFRIADO	93.618590	a2
FRESCO	94.698718	a2

 Análise do desdobramento de TRT dentro de cada nível de:

FASE

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	/1	5	1208.746795	241.749359	2.202	0.0519
TRT	/2	5	10.564103	2.112821	0.019	0.9998
TRT	/3	5	147.592949	29.518590	0.269	0.9301
Erro		918	100763.461538	109.764119		

Codificação usada para o desdobramento

cod. FASE

1 = DESCONGEL

2 = FRESCO

3 = RESFRIADO

Teste de Tukey para o
 desdobramento de TRT dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 5,86896944157151 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	35.461538	a1
T5	38.403846	a1 a2
T6	39.019231	a1 a2
T3	39.980769	a1 a2
T4	40.730769	a1 a2
T2	41.576923	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de TRT dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 5,86896944157151 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	94.346154	a1
T6	94.653846	a1
T2	94.653846	a1
T5	94.788462	a1
T3	94.826923	a1
T4	94.923077	a1

Teste de Tukey para o
desdobramento de TRT dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 5,86896944157151 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T5	92.346154	a1
T1	93.346154	a1
T4	93.711538	a1
T3	93.769231	a1
T2	93.903846	a1
T6	94.634615	a1

Análise do desdobramento de FASE dentro de cada nível de:

TRT

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASE	/1 2	118196.461538	59098.230769	538.411	0.0000
FASE	/2 2	96301.038462	48150.519231	438.673	0.0000
FASE	/3 2	102308.576923	51154.288462	466.038	0.0000
FASE	/4 2	99584.089744	49792.044872	453.628	0.0000
FASE	/5 2	105646.012821	52823.006410	481.241	0.0000
FASE	/6 2	107263.551282	53631.775641	488.609	0.0000
Erro	918	100763.461538	109.764119		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TRT

1 = T1

2 = T2

3 = T3

4 = T4

5 = T5

6 = T6

Teste de Tukey para o
desdobramento de FASE dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	35.461538	a1
RESFRIADO	93.346154	a2
FRESCO	94.346154	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	41.576923	a1
RESFRIADO	93.903846	a2
FRESCO	94.653846	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	39.980769	a1
RESFRIADO	93.769231	a2
FRESCO	94.826923	a2

Teste de Tukey para o

desdobramento de FASE dentro da codificação:

4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	40.730769	a1
RESFRIADO	93.711538	a2
FRESCO	94.923077	a2

Teste de Tukey para o

desdobramento de FASE dentro da codificação:

5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	38.403846	a1
RESFRIADO	92.346154	a2
FRESCO	94.788462	a2

Teste de Tukey para o

desdobramento de FASE dentro da codificação:

6

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,82470663610723 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,45287592330458

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	39.019231	a1
RESFRIADO	94.634615	a2
FRESCO	94.653846	a2

 Variável analisada: MOT_P

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	5	980.371795	196.074359	1.695	0.1330
FASE	2	785673.352564	392836.676282	3396.572	0.0000
TRT*FASE	10	930.967949	93.096795	0.805	0.6240
erro	918	106172.961538	115.656821		
Total corrigido	935	893757.653846			
CV (%) =	15.63				
Média geral:	68.8141026	Número de observações:	936		

 Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 3,47821679196527 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 156
 Erro padrão: 0,861039997462808

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	67.057692	a1
T5	67.762821	a1
T6	69.262821	a1
T4	69.448718	a1
T2	69.634615	a1
T3	69.717949	a1

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 2,02185828865065 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 312
 Erro padrão: 0,608847221078799

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	27.855769	a1
RESFRIADO	88.342949	a2
FRESCO	90.243590	a2

Análise do desdobramento de TRT dentro de cada nível de:

FASE

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	/1	5	1402.951923	280.590385	2.426	0.0337
TRT	/2	5	76.294872	15.258974	0.132	0.9850
TRT	/3	5	432.092949	86.418590	0.747	0.5880
Erro		918	106172.961538	115.656821		

Codificação usada para o desdobramento

cod. FASE

1 = DESCONGEL

2 = FRESCO

3 = RESFRIADO

Teste de Tukey para o

desdobramento de TRT dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 6,02444820342307 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	23.711538	a1
T6	27.211538	a1 a2
T5	27.461538	a1 a2
T3	29.211538	a1 a2
T4	29.576923	a1 a2
T2	29.961538	a2

Teste de Tukey para o

desdobramento de TRT dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 6,02444820342307 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	89.557692	a1
T5	89.807692	a1
T2	90.038462	a1
T4	90.346154	a1

T3 90.807692 a1
 T6 90.903846 a1

 Teste de Tukey para o
 desdobramento de TRT dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 6,02444820342307 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T5	86.019231 a1	
T1	87.903846 a1	
T4	88.423077 a1	
T2	88.903846 a1	
T3	89.134615 a1	
T6	89.673077 a1	

 Análise do desdobramento de FASE dentro de cada nível de:

TRT

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
FASE /1	2	146624.461538	73312.230769	633.877	0.0000
FASE /2	2	122801.807692	61400.903846	530.889	0.0000
FASE /3	2	128052.782051	64026.391026	553.589	0.0000
FASE /4	2	124097.435897	62048.717949	536.490	0.0000
FASE /5	2	127060.243590	63530.121795	549.299	0.0000
FASE /6	2	137967.589744	68983.794872	596.452	0.0000
Erro	918	106172.961538	115.656821		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TRT

1 = T1
 2 = T2
 3 = T3
 4 = T4
 5 = T5
 6 = T6

 Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

 Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	23.711538	a1
RESFRIADO	87.903846	a2
FRESCO	89.557692	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	29.961538	a1
RESFRIADO	88.903846	a2
FRESCO	90.038462	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	29.211538	a1
RESFRIADO	89.134615	a2
FRESCO	90.807692	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:

4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

 Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	29.576923	a1
RESFRIADO	88.423077	a2
FRESCO	90.346154	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:
 5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	27.461538	a1
RESFRIADO	86.019231	a2
FRESCO	89.807692	a2

Teste de Tukey para o
 desdobramento de FASE dentro da codificação:
 6

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV FASE

DMS: 4,95252113941092 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52
 Erro padrão: 1,49136502295456

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
DESCONGEL	27.211538	a1
RESFRIADO	89.673077	a2
FRESCO	90.903846	a2

ANEXO II

Arquivo analisado:

C:\Users\FERRARI\Desktop\wasley\sybr.dbf

Variável analisada: SPTZS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	5	5157.448718	1031.489744	1.799	0.1128
erro	306	175469.730769	573.430493		
Total corrigido	311	180627.179487			
CV (%) =	38.04				
Média geral:	62.9487179	Número de observações:	312		

Teste Tukey para a FV TRT

DMS: 13,4710681046028 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 52

Erro padrão: 3,32076941012026

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T3	57.596154	a1
T1	57.846154	a1
T5	63.807692	a1
T4	64.269231	a1
T2	65.115385	a1
T6	69.057692	a1

ANEXO III

Arquivo analisado:

C:\Users\FERRARI\Desktop\wasley\membrana.dbf

Variável analisada: SPTZSOpção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRT	5	23430.028846	4686.005769	1.172	0.3229
erro	306	1223680.942308	3998.957328		
Total corrigido	311	1247110.971154			
CV (%) =	44.61				
Média geral:	141.7596154	Número de observações:	312		

Teste Tukey para a FV TRT
-----DMS: 35,57419039352 NMS: 0,05
-----Média harmonica do número de repetições (r): 52
Erro padrão: 8,76943701355289

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	124.596154	a1
T6	140.961538	a1
T2	141.730769	a1
T3	143.403846	a1
T4	146.846154	a1
T5	153.019231	a1

ANEXO IV

Preparo dos diluentes

1. TRIS 2% de Glicerol (Diluyente TRIS)

TRIS 100 mL
Trizma 3,62 g
Frutose 0,5 g
Ácido cítrico 1,99 g
Penicilina G 0,006 g
Gema de ovo 2,5 %
Glicerol 2,0 %
pH (6,8-7,2)

1.2 Bull Media – TALP (Diluyente B-TALP)

Bull Talp Quantidade em 100 mL
Tyrodes
NaCl 0.569 g
KCl 0.023 g
KH₂PO₄ 0.004 g
NaHCO₃ 0.209 g
*CaCl₂.2H₂O 0.025 g
MgCl₂.6H₂O 0.008 g
Talp
Na Pyruvate 0.0022 g
Na Lactate 0.368 mL
Glucose 0.090 g
HEPES 0.238 g
BSA 0.300 g
Osmolaridade (300-310 mOsm) e pH (7.2-7.4)

*Adicionar por último