

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM
L-CARNITINA NA QUALIDADE DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES**

Pós-graduando: Marcelo Mandrá Lima
Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro de 2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM
L-CARNITINA NA QUALIDADE DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES**

**Pós-graduando: Marcelo Mandrá Lima
Orientador: Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal para a obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro de 2003

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO MANDRÁ LIMA - nascido em Brodowski – SP, em 18 de julho de 1967, R.G. 16.650.405 SSP/SP, filho de Enio Walter Lima e Maria Marly Mandrá Lima, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em julho de 1992. Após esta data ingressou na iniciativa privada onde atua na área de clínica e reprodução de eqüinos. Participa junta a várias instituições públicas e privadas de pesquisas na área de eqüinocultura. Possui estágios em várias instituições brasileiras e em algumas no exterior sempre atuando na área de eqüinos. Durante os primeiros anos de formado ministrou aulas nas áreas de química e biologia em escolas de 2º. grau. Ingressou no curso de pós-graduação na área de reprodução animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP Jaboticabal em março de 2001.

***“Nossas mentes possuem por natureza um
insaciável desejo de saber a verdade”***

Cícero

*A Deus e aos meus Santos protetores
por caminharem sempre ao meu lado*

Agradeço

*Aos meus pais, Enio e Marly, a minha esposa
Lurdinha, aos meus irmãos Márcio e Marciel,
minhas cunhadas Carla e Paulina e meus sobrinhos
Bia, Carol e Pedro Henrique*

Dedico

*Ao Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite pela
orientação, companherismo, dedicação e por estar
sempre com as portas abertas*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Haras Agromen, através de seu proprietário, Sr. José Ribeiro de Mendonça e de toda sua família, sem o qual não seria possível a realização deste experimento.

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa do Departamento de Reprodução e Radiologia Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu - SP, pela permissão e auxílio na realização das análises computadorizadas utilizadas neste experimento.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes Arruda do Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas e pelo material cedido.

Ao Prof. Dr. César Gonçalves de Lima do Departamento de Ciências Básicas da Universidade de São Paulo pela realização das análises estatísticas.

Ao Dr. Francisco Olbrich Júnior por ter conseguido junto ao fabricante a L-carntina utilizada durante o experimento.

Ao amigo médico veterinário Márcio Teoro do Carmo pela inestimável ajuda prestada durante toda a realização deste projeto.

Ao amigo médico veterinário Gerson S. Franceschini, por termos, juntos, realizados os processos que envolveram a realização deste trabalho.

A amiga médica veterinária Carla Braga pela elaboração dos gráficos utilizados nesta dissertação.

Ao amigo médico veterinário Cássio L. N. Trinque pela amizade e pelo companherismo nesses anos de trabalho que passamos juntos.

Aos amigos médicos veterinários Rafael de Pádua e Marcelo de Souza, colegas de trabalho, por sempre estarem a disposição quando precisei de suas colaborações.

A todos os funcionários do Haras Agromen, em especial Carlos (Lego), Luís, Clóvis e Arnaldo e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1- Criopreservação do Sêmen Equino	5
2.2- Análise Computadorizada dos Parâmetros Espermáticos	6
2.3- Integridade da Membrana Plasmática	8
2.4- Teste de Termo Resistência	10
2.5- L-carnitina e os Parâmetros Espermáticos	10
3. MATERIAL E MÉTODO	18
3.1- Local e Período do Experimento	19
3.2- Animais Utilizados	19
3.3- Grupos Constituídos	19
3.4- Colheita, Congelação e Descongelação do Sêmen	20
3.4.1- Colheita do Sêmen	20
3.4.2- Congelação do Sêmen	21
3.4.3- Descongelação do Sêmen	22
3.5- Análises Realizadas	22
3.5.1- Após a Colheita do Sêmen	22
3.5.2- Após a Descongelação do Sêmen	22
3.5.2.1- Análise Computadorizada	22
3.5.2.2- Teste de Termo Resistência	23
3.5.2.3- Avaliação da Integridade da Membrana Espermática	23
3.6- Análise Estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7. APÊNDICE	61

LISTA DE FIGURAS**Página**

- Figura 1A.** Definição gráfica das variáveis: velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL); velocidade espermática ao longo da trajetória média (VAP); velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem e término, respectivamente, no primeiro e último pontos analisados (VSL); linearidade (LIN); índice retilíneo (IR) e deslocamento lateral da cabeça (DLC) espermáticos.....7
- Figura 2A.** Fotomicrografia de células espermáticas após preparo para exame de fluorescência. Espermatozoides íntegros verdes em toda a sua extensão, lesados corados de vermelho, semilesado corados de verde e vermelho.....9
- Figura 1.** Representação gráfica da média \pm EPM das variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Linearidade comparados entre o grupo controle e tratado antes e após a realização do TTR.....29
- Figura 2.** Representação gráfica da média \pm EPM da variável Motilidade Total para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....30
- Figura 3.** Representação gráfica da média \pm EPM para a variável Motilidade Progressiva para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....31
- Figura 4.** Representação gráfica da média \pm EPM da variável Linearidade para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....32
- Figura 5.** Variação dos valores da variável Motilidade Total (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente a descongelação (MT pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência.....34
- Figura 6.** Variação dos valores da variável Motilidade Progressiva (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente a descongelação (MT pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência.....34

- Figura 7.** Variação dos valores da variável Linearidade (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação (Linearidade pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência (Linearidade pós-TTR).....35
- Figura 8.** Representação gráfica das médias \pm EPM das variáveis Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL) e Velocidade Curvilinear (VCL) comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1) antes e após a realização do TTR.....37
- Figura 9.** Representação gráfica da média \pm EPM da variável Velocidade de Trajeto (VAP) para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....38
- Figura 10.** Representação da média \pm EPM da variável Velocidade Progressiva para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....39
- Figura 11.** Representação gráfica da média \pm EPM da variável Velocidade Curvilinear para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....40
- Figura 12.** Variação dos valores da variável Velocidade de Trajeto para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelação (VAP pós-descongelação) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VAP pós-TTR).....42
- Figura 13.** Variação dos valores da variável Velocidade Progressiva para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelação (VSL pós-descongelação) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VSL pós-TTR).....42
- Figura 14.** Variação dos valores da variável Velocidade Curvilinear para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelação (VCL pós-descongelação) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VCL pós-TTR).....43

Figura 15. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Integridade da Membrana Espermática comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1).....	44
Figura 16. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Integridade da Membrana Espermática para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....	45
Figura 17. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Total de Espermatozoides no Ejaculado comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1).....	47
Figura 18. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Total de Espermatozoides no ejaculado para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias e erros padrão da média das variáveis Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%) e Linearidade (LIN-%) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0 _{tr}) e tratado (T1 _{tr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	29
Tabela 2. Médias e erros padrão da média da variável Motilidade Total (MT-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0 _{tr}) e tratado (T1 _{tr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	30
Tabela 3. Médias e erros padrão da média da variável Motilidade Progressiva (MP-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0 _{tr}) e	

tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	31
Tabela 4. Médias e erros padrão da variável Linearidade (LIN-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).	32
Tabela 5. Médias e erros padrão da média das variáveis Velocidade de Trajeto (VAP- $\mu\text{m}/\text{seg}$), Velocidade Progressiva (VSL-- $\mu\text{m}/\text{seg}$) e Velocidade Curvilínea (VCL-- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	37
Tabela 6. Médias e erros padrão da média da variável Velocidade de Trajeto (VAP- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	38
Tabela 7. Médias e erros padrão da média da variável Velocidade Progressiva (VSL - $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	39
Tabela 8. Médias e erros padrão da variável Velocidade Curvilínea (VCL- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).....	40
Tabela 9. Médias e erros padrão da média da variável Integridade da Membrana Espermática (IM-%) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação.....	44

- Tabela 10.** Médias e erros padrão da variável Integridade da Membrana Espermática (IME-% de íntegros) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelção.....45
- Tabela 11.** Médias e erros padrão da média da variável Total de Espermatozoides no Ejaculado (TSptz-x10⁹) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) após duas coletas semanais por um período de 04 semanas.....47
- Tabela 12.** Médias e erros padrão da variável Total de Espermatozoides no Ejaculado (TSptz-x10⁹) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1).....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μL :	Microlitro
- μm :	Micrômetro
- EPM:	Erro Padrão da Média
- g:	Gramas
- GA:	Garanhão A
- GB:	Garanhão B
- GC:	Garanhão C
- GD:	Garanhão D
- h:	Hora
- HTMA:	Hamilton Thorn Motility Analyser
- Lin:	Linearidade
- mL:	Mililitro
- mm:	Milímetro
- MP:	Motilidade Progressiva
- MT:	Motilidade Total
- N ₂ :	Nitrogênio
- nmol:	Nanomol
- °C:	Graus Celsius
- s:	Segundo
- sptz:	Espermatozóides
- T0:	Grupo Controle
- T0 _{tr} :	Grupo Controle Após TTR
- T1:	Grupo Tratado
- T1 _{tr} :	Grupo Tratado Após TTR
- TTR:	Teste de Termo Resistência
- VAP:	Velocidade de Trajeto
- VCL:	Velocidade Curvilinear
- VSL:	Velocidade Progressiva

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-CARNITINA NA QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES

RESUMO – a utilização da L-carnitina - ácido γ -trimetilamino- β -hidróxido butírico - visando melhorar os parâmetros espermáticos tem sido intensivamente utilizado em medicina humana e em menor escala em medicina veterinária com resultados satisfatórios. O objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação oral de L-carnitina em sêmen criopreservado de garanhões. Utilizou-se neste experimento quatro garanhões submetidos a duas colheitas de sêmen por semana por um período de quatro semanas durante o mês de agosto de 2001; amostras de sêmen desses animais, agora denominado T0, foram criopreservadas. Os mesmos quatro garanhões receberam uma suplementação oral de quinze gramas de L-carnitina uma vez ao dia nos meses de maio, junho, julho e agosto de 2002 e no mês de agosto de 2002 foram submetidos a duas colheitas de sêmen semanais, tendo suas amostras também criopreservadas, que passaram a ser denominado tratado (T1). Foram analisados e comparados entre si os seguintes parâmetros espermáticos:- total de espermatozoides no ejaculado e integridade da membrana espermática e através de análise computadorizada as variáveis motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) antes e após a realização de um teste de termo-resistência (TTR). Foi realizado um delineamento casualizado com oito repetições (dois tratamentos e quatro garanhões); empregou-se análise de variância – ANOVA – com posterior desdobramento para estudar o efeito dos tratamentos em cada um dos garanhões – Teste de Tukey – o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. As médias e erros padrão da média das variáveis motilidade total antes e após a realização do TTR, total de espermatozoides no ejaculado e integridade da membrana espermática foi significativamente superior para o grupo tratado (T1) quando comparado com o grupo controle (T0). As médias e erros padrão da média das variáveis motilidade progressiva, linearidade, velocidade de trajeto, velocidade progressiva e velocidade curvilínea foram significativamente superiores para o grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1) antes da realização do TTR. Após a realização do TTR as médias e erros padrão da média foram significativamente maiores para o grupo controle (T0) para as variáveis velocidade de trajeto e velocidade progressiva; não houve diferença significativa entre os grupos após a realização do TTR para as variáveis motilidade progressiva, linearidade e velocidade curvilínea. Após a realização do TTR, houve uma queda muito mais acentuada nos valores das variáveis motilidade progressiva, linearidade, velocidade de trajeto, velocidade progressiva e velocidade curvilínea para o grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1). Estes resultados nos permitem concluir que a L-carnitina pode, em algumas situações, ser uma importante ferramenta terapêutica para a melhoria das qualidades espermáticas de garanhões.

Palavras-Chave: L-carnitina, sêmen, garanhões, criopreservação.

THE INFLUENCE OF ORAL SUPPLEMENTATION WITH L- CARNITINE AND ITS INFLUENCE ON CRYOPRESERVED STALLION SEMEN

ABSTRACT- owing its positive effect on the improvement of spermatic parameters, L-carnitine - γ -trimethylamino- β -hidroxid butiric acid - has been intensively utilized in human medicine and in a lower scale in veterinary medicine with satisfactory results. The objective of this study was to verify the influence of oral supplementation with L-carnitine on cryopreserved stallion semen. Four stallions were submitted to semen collection twice a week during a four week period in August of 2001. The collected samples from those horses were then cryopreserved and they were assigned as a control group (T0). The same horses received fifteen grams of L-carnitine by oral supplementation, once a day, during May, June, July and August of 2002, and then they were submitted to semen collection twice a week in August of 2002. Those collected samples were also equally cryopreserved, and assigned as treatment group (T1). The following spermatic parameters were analyzed and submitted to a pair wise comparison: total sperm number in the ejaculate and sperm membrane integrity and by computer analyze, variables as: total motility (TM), progressive motility (PM), linearity (LIN), path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), and track speed (VCL). Those variables were then determined before and after a term resistance test (TRT). A casual design was established using eight repetitions (two treatments and four stallions). To investigate the treatment effect, analysis of variance (ANOVA) was performed and to investigate de effect within stallion, the Tukey's test - significance level was established as $p \leq 0.05$. The means and standard errors of means for the variable total motility, determined before and after the term resistance test, total sperm number in the ejaculate and sperm membrane integrity was significantly higher in the treatment group (T1) when compared to the control group (T0). The means and standard errors of means for the variables progressive motility, linearity, path velocity, progressive velocity and track speed were significantly higher for the control group (T0) when compared to the treatment group (T1) before the term resistance test. After the term resistance test, the means and standard errors of means were significantly higher in the control group (T0) for path velocity and progressive velocity variables, with no significant difference between the groups (control and treatment) for the following variables: progressive motility, linearity and track speed. After the term resistance test being performed, there was a higher decrease in the control group (T0) when compared to the treatment group (T1) for the following variables: progressive motility, linearity, path velocity, progressive velocity and track speed. In conclusion, the results of this study allow us to affirm that in determined circumstances the L-carnitine can be an important therapeutic toll for the stallion sperm quality improvement.

Keywords: L-carnitine, sperm, stallion, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Uma das maneiras mais rápidas para o desenvolvimento de plantéis com finalidade comercial é o uso de inseminação artificial, disponibilizando-se desta maneira de animais de alto valor zootécnico para um número maior de consumidores finais e a um preço mais acessível.

Esta técnica, já bastante difundida em várias espécies, enfrenta certa dificuldade no meio eqüino devido a vários fatores, principalmente aos discriminados abaixo:-

- Resistência por parte das Associações de Criadores em liberar o uso de Inseminação Artificial.
- Baixa resistência do sêmen eqüino à congelação e, como conseqüência, baixos índices de fertilidade.

Tendo em vista que o primeiro fator já está sendo superado, pois algumas Associações de Criadores já permitem o uso da Inseminação Artificial em seus plantéis, o segundo fator torna-se o principal entrave para uma ampla difusão no uso da mesma como meio de melhoramento genético.

Um enorme progresso tem sido observado quanto à técnica de inseminação bem como quanto à qualidade dos meios utilizados na congelação de sêmen eqüino, mas estes ainda estão abaixo do desejado. A qualidade espermática é altamente relevante nos parâmetros de fertilidade. O efeito da L-carnitina – substância envolvida no metabolismo de ácidos graxos e na proteção e modulação de membranas – na fertilidade do macho tem sido repetidamente estudado na medicina humana. O resultado positivo possibilitou investigações similares em medicina veterinária (HERFEN *et al.*, 1997).

Os espermatozóides são produzidos nos testículos e após modificações pós-gonadais sofridas no epidídimo adquirem capacidade de fertilização. No plasma epididimal, proteínas de alto peso molecular e algumas pequenas moléculas, como a L-carnitina livre, convertem os gametas em células “competentes” e funcionais (JEULIN & LEWIN, 1996).

KOHENGKUL (1977) relatou que a concentração de L-carnitina no plasma seminal é 10 (dez) vezes maior que no plasma sanguíneo e que aproximadamente 50% da carnitina encontrada no plasma seminal se apresenta sob a forma de Acetyl-L-Carnitina e que esta forma apresenta um importante papel na motilidade espermática.

A existência de um estreito relacionamento entre o nível de Acetyl-L-Carnitina, a ativação da motilidade espermática e o metabolismo do espermatozóide foi observado por JOHANSEN & BOHMER (1979). Segundo estes pesquisadores foi verificada uma alta concentração de L-carnitina no espermatozóide quando comparado com os níveis no plasma seminal.

A ação da L-carnitina disponibilizando ácidos graxos de cadeia longa como fonte energética em quase todos os tipos celulares, permitiu estudos que indicaram uma maior viabilidade espermática bem como uma maior produção no número de espermatozóides pela sua ação, também disponibilizando maior fonte energética no processo de divisão celular por que passam as espermátides durante a espermatogênese (BAUMGARTNER & BLUM, 1997).

Ainda segundo BAUMGARTNER & BLUM (1997), outro importante papel desempenhado pela L-carnitina, seria sua capacidade de proteção e modulação da membrana espermática através da provisão de ácidos graxos para sua síntese, proteção da membrana lipídica contra a peroxidação, modulação das propriedades da membrana (ex.: elasticidade) entre outros.

Observando-se os resultados obtidos, principalmente em medicina humana, e que estes resultados poderiam auxiliar de maneira positiva na melhoria da qualidade espermática de sêmen criopreservado de garanhões, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da ingestão oral de L-carnitina e sua possível ação sobre o número total de espermatozóides por ejaculado, motilidade total e progressiva, velocidade espermática, integridade de membrana e Teste de Termo Resistência, parâmetros estes aceitos como bons indicadores a respeito da viabilidade espermática.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA:-

2.1- Criopreservação do Sêmen Equino:-

O aprimoramento das técnicas de criopreservação do sêmen equino tem apresentado grande evolução nos últimos anos com grande interesse por esta biotecnologia (BALL, 1998). Segundo ARRUDA *et al.* (1989a) e TRIMECHE *et al.* (1999) somente um terço dos ganhões apresentam sêmen satisfatório para a congelação. Já PAPA (1987) revela que são muitas as variáveis no processo de congelação que podem influenciar na qualidade espermática.

A grande maioria dos estudos de criopreservação equina tem utilizado como diluidor um meio a base de EDTA-LACTOSE-GEMA desenvolvido por MARTIN *et al.* (1979) com resultados de fertilidade bastante variáveis entre os estudos realizados. Outros diluidores como o proposto por PALMER (1984) têm sido utilizados em menor escala.

ARRUDA (2000) sugere que a sobrevivência dos espermatozoides após o processo de criopreservação depende da utilização de um meio que possua adequadas propriedades físico-químicas e de uma curva de congelação que permita a suspensão do metabolismo espermático. Segundo HOLT (2000), alguns grupos de pesquisa direcionaram seus trabalhos na caracterização dos fluxos hidráulicos a que os espermatozoides são submetidos durante o processo de congelação e descongelação e na permeabilidade da membrana espermática, sendo que em alguns desses trabalhos, especialmente naqueles direcionados a remoção e adição de crioprotetores, foi obtida uma ótima recuperação de espermatozoides.

CROCKETT *et al.* (2001) recomendam que o sêmen deva ser centrifugado a 25°C para a remoção do plasma seminal, ressuspendido a uma concentração de 250×10^6 espermatozoides/mL, resfriados a uma temperatura de 5°C por 12 h e então serem submetidos ao processo de congelação. Entretanto HEITLAND *et al.* (1996) sugerem centrifugação a uma temperatura de 23°C para remoção do plasma seminal, concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL, resfriados a uma temperatura de 5°C por 2,5 h e então submete-los ao processo de congelação.

2.2- Análise Computadorizada dos Parâmetros Espermáticos:-

A análise computadorizada do sêmen vem sendo empregada em diversas espécies de mamíferos, dentre elas no homem (MARCK *et al.*, 1988), bovinos, eqüinos (AMANN, 1987; JASKO *et al.*, 1988; VARNER *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1997), e ovinos (SOUZA *et al.*, 1999). A análise computadorizada permite avaliar variáveis detalhadamente, o que não ocorre na análise convencional subjetiva (MOSES *et al.*, 1995).

KOLIBIANAKIS *et al.* (1992) concluem que há uma alta correlação ($r=0,89$; $p<0,001$) entre a motilidade espermática analisada pelo método computadorizado e o convencional.

Em ARRUDA (2000), podemos encontrar as seguintes definições para algumas das variáveis fornecidas durante a análise computadorizada:-

- **Velocidade Progressiva (VSL):-** é a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso, definida em $\mu\text{m/s}$.
- **Velocidade Curvilinear (VCL):-** é a velocidade média, em $\mu\text{m/s}$, de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula. É definida pela distância total entre cada posição do CB (centro de brilho) para uma dada célula durante a aquisição da imagem, dividida pelo tempo gasto. $VCL > VSL$.
- **Velocidade de Trajeto (VAP):-** é a velocidade média ininterrupta do caminho da célula, em $\mu\text{m/s}$. É definida como a posição média aproximada do CB e fornece uma velocidade média do trajeto da célula. Representa a distância total ao longo do trajeto médio para cada célula dividido pelo tempo gasto. $VSL < VAP < VCL$.
- **Linearidade (LIN):-** é o valor médio da proporção entre VSL/VCL . Determina a partida do percurso da célula em linha reta.

Em FERREIRA (1999), podemos encontrar a seguinte representação esquemática para as variáveis acima relacionadas:-

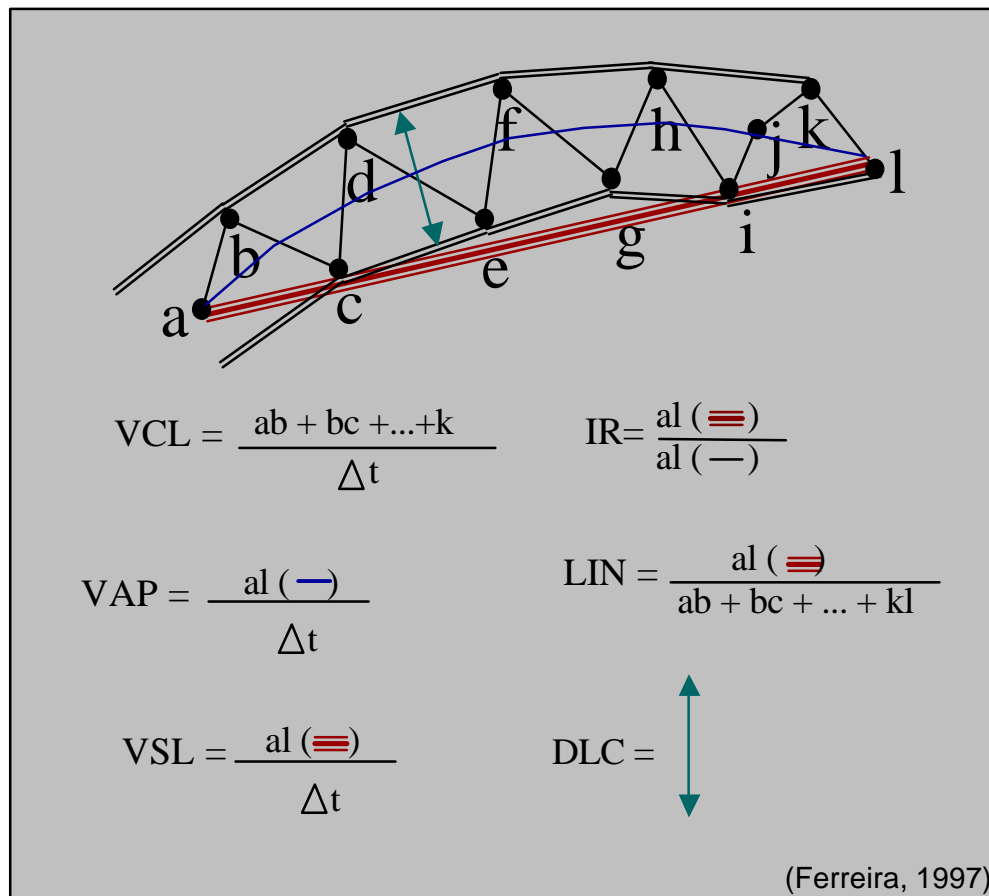


Figura 1A - Definição gráfica das variáveis: velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL); velocidade espermática ao longo da trajetória média (VAP); velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem e término, respectivamente, no primeiro e último pontos analisados (VSL); linearidade (LIN); índice retilíneo (IR) e deslocamento lateral da cabeça (DLC) espermáticos.

ARRUDA (2000) sugere os seguintes padrões para os parâmetros de motilidade do sêmen equino criopreservado e avaliado por um sistema computadorizado:- motilidade progressiva = 30%; VAP = 65 $\mu\text{m/s}$; VSL = 57 $\mu\text{m/s}$; VCL = 110 $\mu\text{m/s}$; LIN = 47%.

O aumento da utilização de equipamentos computadorizados em laboratórios permitirá no futuro maior interação entre os pesquisadores já que com a *internet* a facilidade de difusão de dados se torna um procedimento rápido e eficiente (MAHONY *et al.*, 1998).

2.3- Integridade da Membrana Plasmática:-

Para que possamos nos certificar da validade do processo de criopreservação, o espermatozóide deve estar com sua função e morfologia intactos de forma que possa ser considerado viável ao processo de fertilização (DELL'ACQUA JÚNIOR, 2000). A integridade da membrana plasmática é importante para o metabolismo espermático, como também alterações na membrana são importantes para processos como capacitação espermática, reação acrossomal e a ligação do espermatozóide a superfície do óvulo (HARRISON & VICKERS, 1990).

Atualmente, o teste com sondas fluorescentes tem demonstrado resultados satisfatórios seguindo a técnica descrita por HARRISON e VICKERS (1990) e modificada por ZÚCCARI (1998) por ser de fácil preparo e interpretação. Segundo ZÚCCARI (1998), a utilização de fluorocromos está se tornando cada vez mais rotineira, por serem corantes capazes de se difundir em células integras ou lesadas, mesma na presença de um crioprotetor.

Os corantes fluorescentes dividem-se em dois grupos, os que não são capazes de penetrar através da membrana íntegra (brometo de etídeo, iodeto de propídio, etc), portanto só ingressando e corando células com a membrana lesada, ligando-se ao DNA celular e produzindo uma coloração vermelha. O segundo grupo, onde se encontra os compostos não polares, entre eles os ésteres de fluoresceína, que

possuem a característica de se difundirem através de uma membrana intacta e ao ingressar na célula espermática sofrem hidrólise por esterases, resultando na formação de carboxifluoresceína livre, permanecendo nas células intactas, produzindo ao longo destas uma fluorescência verde (HARRISON & VICKERS, 1990; ROTMAN & PAPERMASTER, 1966).

2.4- Teste de Termo Resistência:-

DIMITROPOULUS (1967) propôs uma prova para a avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen congelado de bovinos, denominando-a Teste de Termo Resistência (TTR). O teste consiste em submeter o sêmen descongelado a condições semelhantes aquelas do trato genital feminino com o objetivo de avaliar sua longevidade.

De acordo com os padrões para julgamento de sêmen congelado para eqüídeos, definidos pela Comissão de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), o TTR pode ser realizado de duas maneiras:- TTR rápido sendo o sêmen incubado a 37°C por 30 minutos e TTR lento sendo o sêmen incubado a 37°C por 240 minutos (FONSECA *et al.*, 1992).

PAPA (1989) avaliando avanços tecnológicos com relação ao sêmen eqüino, cita o TTR a 38°C/240 minutos com avaliação a cada 60 minutos. MATTOS *et al.* (1993) ao estudarem o efeito de diferentes diluentes na sobrevivência do espermatozóide eqüino empregaram para o TTR a 37°C avaliações aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. PAPA *et al.* (1993) ao avaliarem a eficiência do meio diluidor glicina-gema para a congelação de sêmen eqüino, adotaram o TTR a 38°C/120 minutos, o mesmo sendo usado por ZÚCCARI & PAPA (1995) quando da avaliação do número de espermatozóides com membrana plasmática íntegra no decorrer do TTR.

2.5- L-CARNITINA E OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS:-

A carnitina – ácido γ -trimetilamino- β -hidróxido butírico –, descoberta por Krimberg em 1905 e tendo suas funções biológicas reconhecidas por Fraenkel somente em 1952, possui como uma de suas principais funções o transporte, através da ação da co-enzima carnitina-acyl-translocase e carnitina-palmitoil-transferase (CPTI e CPTII), de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da célula e da matriz mitocondrial, onde então sofrem β -oxidação. A expressão da carnitina-acyl-translocase ocorre muito mais cedo que outras enzimas que atuam na metabolização dos ácidos graxos na mitocôndria (VAAGENES *et al.*, 1998).

Disponível na natureza principalmente através de proteínas de origem animal e de lácteos ou produzida pelos hepatócitos (a biosíntese da carnitina requer dois aminoácidos essenciais – lisina e metionina) é então secretada no sangue (BIEBER, 1988).

Entre os parâmetros que podem afetar a qualidade espermática, os constituintes do plasma seminal devem ser considerados por refletirem mudanças nas secreções do epidídimo e das glândulas acessórias (SETCHELL *et al.*, 1994). No epidídimo, a carnitina é parcialmente esterificada como acetylcarnitina e o restante absorvido pelos espermatozóide e então esterificada no interior dos mesmos. A acetylcarnitina extracelular e intracelular possui um importante papel no metabolismo energético do espermatozóide, disponibilizando energia para sua motilidade (COSTA *et al.*, 1994). Nas deficiências de L-carnitina, a produção de energia a partir da oxidação de ácidos graxos parece ser seriamente comprometida (ZEYNER & HARMEYER, 1999).

L-carnitina é um componente essencial na β -oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e possui um papel essencial na maturação do espermatozóide dentro do trato reprodutivo masculino. O plasma epididimal contém os mais altos níveis de L-carnitina encontrado no corpo humano e o início da motilidade espermática ocorre em paralelo ao aumento da L-carnitina no lúmen epididimal, sendo a secreção aí realizada

por um mecanismo de transporte ativo e o aumento no interior do espermatozóide por um transporte passivo (ATSUSHI *et al.*, 2002). A L-carnitina representa um co-fator no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para o interior das mitocôndrias e sua subsequente oxidação, sendo que seu transporte para o interior do epidídimo é, em parte, andrógeno-dependente (LENZI *et al.*, 1992). DI LISA *et al.* (1995) observaram a ação da L-carnitina na síntese e no transporte de ATP para fora da mitocôndria, ajudando no suprimento energético em processos de grande consumo de energia como a divisão celular, em especial a espermatogênese.

Segundo NEUMAN *et al.* (2002), a carnitina possui propriedades antioxidantes que protegem as membranas espermáticas contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Em condições normais há um equilíbrio entre antioxidantes (vitaminas E, C, carotenóides e enzimas) e pró-oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio, superóxido, peróxido e hidroxil, sendo que em algumas situações há um desequilíbrio entre estes elementos; dentre estas situações podemos destacar o processo de criopreservação, os quais provocam aumento na produção de pró-oxidantes. Este desequilíbrio desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões na membrana plasmática e por consequência perda da função espermática (MARQUES, 2002). Por outro lado, a carnitina atua de forma a estabilizar as membranas plasmáticas de células submetidas a condições físicas adversas (SNYDER *et al.*, 1990), particularmente, a acetyl-carnitina interage entre a espectrina e actina, as mais importantes proteínas do citoesqueleto (BUTTERFIELD *et al.*, 1992). A carnitina também reduz a disponibilidade de lipídios para a peroxidação pelo transporte de ácidos graxos para o interior das mitocôndrias, disponibilizando-os para a β -oxidação e gerando energia na forma de adenosina-trifosfato (ATP) (NEUMAN *et al.*, 2002). ARDUINI *et al.* (1997), demonstraram que há um efeito benéfico com a adição de L-carnitina em amostras de sangue armazenadas a 4°C, reduzindo “*in vitro*” a hemólise e melhorando a viabilidade destas amostras “*in vivo*” e que este efeito deve estar relacionado com a ação da L-carnitina nos processos biofísicos e metabólicos da membrana celular.

GOLAN *et al.*, (1982), mensuraram a quantidade de L-carnitina e seu derivado de cadeia curta acetylcarnitina no suíno, homem, touro, carneiro, galo e

esquilo, sugerindo que a origem da mesma encontra-se no epidídimo e quanto maior a sua concentração maior o número de espermatozóides por ejaculado. JOUANNET *et al.* (1981), examinando as características seminais de 215 homens férteis e de 409 inférteis, observaram uma alta correlação entre concentração espermática e níveis de L-carnitina. ZÖPFGEN *et al.* (2000) encontraram níveis significativamente menores de L-carnitina no plasma seminal de homens inférteis quando comparado com homens de fertilidade comprovada. MICIC *et al.* (1994) encontraram teores seminais de carnitina na ordem de 199,3, 243 e 495,5 nmol/mL, respectivamente, para homens azoospermicos, oligospermicos e normospermicos. Ao comparar a motilidade desses três grupos encontraram maior motilidade para os normospermicos e quando subdividiu-se este grupo em alta e baixa concentração de carnitina seminal, encontrou-se motilidade maior no que possuía maior concentração de L-carnitina.

Espermatozóides foram coletados da cabeça do epidídimo de rato por micropunção e sua motilidade foi então avaliada após diluição em solução salina fisiológica contendo L-carnitina. Após 02 (dois) minutos observou-se uma estimulação da motilidade em espermatozóides com baixa motilidade inicial; não se observou alteração em espermatozóides com alta motilidade inicial (HINTON *et al.*, 1981).

GRIZARD *et al.*, (1992), determinaram a concentração de L-carnitina e acetylcarnitina no espermatozóide e no plasma seminal de 15 (quinze) homens, tanto no sêmen a fresco quanto em amostras submetidas a congelação com meio crioprotetor. A motilidade espermática também foi avaliada. Nas amostras a fresco, os níveis de L-carnitina e acetylcarnitina no plasma seminal eram similares enquanto no espermatozóide, acetylcarnitina predominava. A criopreservação não alterou os níveis de carnitina e acetylcarnitina no plasma seminal, em contraste, os níveis de acetylcarnitina no espermatozóide decresceu. A motilidade espermática decresceu em todos os casos após a congelação.

Experimento realizado por RUIZ-PESINI *et al.*, (2001) determinaram os parâmetros celulares de amostras de sêmen para correlacioná-los com a concentração de L-carnitina no plasma seminal. Carnitina é envolvida em vários processos metabólicos tendo um importante papel na manutenção em atividade da fosforilação

oxidativa (OXPHOS) e sua presença no epidídimo, e não nas secreções prostáticas, relaciona-se positivo e significativamente com as atividades respiratórias da mitocôndria. Como a carnitina no plasma seminal é secretada no epidídimo, os autores sugerem fortemente que a relação entre secreção de carnitina, qualidade seminal e atividades OXPHOS relacionam-se entre si e ocorrem de forma paralela. A ação da L-carnitina na motilidade espermática de aves foi investigada por ASHIZAWA *et al.* (1994) e estes autores sugeriram que concentrações elevadas de L-carnitina podem reduzir a movimentação espermática, mas assim que esta concentração é reduzida a motilidade é restaurada. MANGANO *et al.* (2000) concluíram que a ação inibitória na motilidade espermática produzida por Anti-inflamatórios Não Esteróides (Cinnoxican, Ácido Acetil Salicílico) pode ser, “*in vitro*”, bloqueada pela ação da L-carnitina.

Estudando os efeitos antioxidantes da carnitina oral nas características seminais, histologia testicular e peroxidação lipídica do espermatozóide de aves Leghorn, NEUMAN *et al.* (2002), concluíram que houveram melhorias quanto a concentração espermática e redução da peroxidação lipídica. Estes resultados sugerem que a administração oral de carnitina possui propriedades antioxidantes que podem preservar a membrana espermática e, por conseqüência, aumentar a expectativa de vida do espermatozóide. Em experimento realizado por BACH *et al.* (1983) administrouse 2 g de L-carnitina oral em cem (100) estudantes e observou-se que a concentração sorológica da mesma aumentou significativamente até um máximo após 3,5 h de sua ingestão, começando então a declinar e após 24 h retornava a seus níveis séricos normais e que sua principal via de excreção era a urinária. Neste mesmo experimento constatou a importância da L-carnitina na regulação da oxidação de ácidos graxos, sugerindo que sua suplementação de forma contínua por várias semanas influencia nos níveis de lipídios circulante, causando um decréscimo nos níveis de triglicérides, colesterol e um aumento no nível de colesterol HDL.

COSTA *et al.* (1994) estudaram o possível efeito da administração oral de L-carnitina na motilidade espermática em pacientes humanos com asthenozoospermia idiopática. Cem (100) pacientes receberam 3 g por dia de L-carnitina oral por quatro (04) meses e seus parâmetros espermáticos estudados antes, durante e depois do

tratamento. Estes parâmetros foram analisados de forma computadorizada. Os resultados demonstraram que a L-carnitina é capaz de aumentar a motilidade espermática de maneira quantitativa e qualitativa. Um aumento na quantidade de espermatozóides produzida também foi observado (de $142,4 \pm 10,3 \times 10^6$ para $163,3 \pm 11,0 \times 10^6$ [$p < 0,001$]). Os autores concluem que a administração oral de L-carnitina podem melhorar a qualidade espermática pelo menos em pacientes com asthenozoospermia idiopática.

Experimento realizado por GANDINI *et al.* (2002) com 100 pacientes em que foram distribuídos ao acaso dois grupos de 50 indivíduos. O primeiro grupo recebeu 2 g de L-carnitina oral por 04 meses e o segundo grupo um placebo. As análises espermáticas foram realizadas nos dois últimos meses deste período. Após isso, os dois grupos passaram por dois meses sem receber qualquer tratamento e então inverteu-se o protocolo de uso da droga, sendo que o grupo que recebeu carnitina passou a receber placebo e o grupo que recebeu placebo passou a receber carnitina. Houve uma melhoria significativa na concentração espermática ($P=0,01$), motilidade total ($P=0,04$) e motilidade progressiva ($P=0,05$). O aumento na porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva foi mais significativo em pacientes com baixo número de espermatozóides por ejaculado ($< 5 \times 10^6$ spz/ejaculado, $P=0,03$ e $< 2 \times 10^6$ spz/ejaculado, $P=0,02$).

MAZZILLI *et al.* (1999) estudaram a influência da L-carnitina do interior do espermatozóide na motilidade espermática no muco cervical de bovino e encontrou uma estreita correlação entre a L-carnitina intra-espermática e a sobrevivência do espermatozóide. Segundo os autores, isto ocorre provavelmente devido ao fato de que no muco cervical os lipídios são uma importante fonte de energia para o espermatozóide e para metabolizar estes lipídios a L-carnitina intra-espermática é essencial. O déficit de L-carnitina intra-espermática pode ser devido a alterações no mecanismo de liberação da mesma no epidídimo em função de algum processo inflamatório ou a baixos níveis de testosterona (o mecanismo de transporte da L-carnitina para o interior do epidídimo parece ser andrógeno-dependente). Ainda segundo MAZZILLI *et al.* (1999), a implicação terapêutica destes resultados é que

quando a hipomotilidade é devido a baixos níveis de L-carnitina, a administração exógena desta substância ou de testosterona pode promover a normalização da motilidade espermática.

SOUFIR *et al.* (1981), sugeriram que a determinação de L-carnitina no plasma seminal pode indicar se há normalidade quanto a função epididimal. Já MENCHINI-FABRIS *et al.* (1984) mensuraram a quantidade de L-carnitina no sêmen de pacientes com várias patologias andrológicas e encontrou concentrações extremamente baixas em indivíduos com agenesia do “*vasus deferentis*” e azoospermia causada por falência testicular. Este estudo encontrou uma correlação positiva entre a L-carnitina livre no plasma seminal e a contagem espermática, motilidade espermática e o número de espermatozóides móveis por mililitro de sêmen. Yi *et al.* (1995), demonstrou que em casos de obstrução cirúrgica reversível do “*vasus deferentis*”, os níveis de carnitina no plasma seminal decrescem significativamente. A aplasia do “*vasus deferentis*” é regularmente acompanhada de aplasia epididimal e várias outras anormalidades anatômicas e funcionais das vesículas seminais (MESCHEDE *et al.*, 1998).

MATALLIOTAKIS *et al.* (2000) demonstraram que a concentração de L-carnitina difere significativamente entre pacientes com espermograma normal (478,4 nm/ml) para aqueles com espermograma anormal (100,58 nm/ml) e que também é estatisticamente significativa a melhoria na contagem espermática, porcentagem de espermatozóides móveis e porcentagem de formas normais dos espermatozóides em pacientes com concentração normal de L-carnitina.

Segundo JEULIN & LEWIN (1996), após a produção nos testículos, os espermatozóides passam por modificações no epidídimo adquirindo a capacidade de fertilização, sendo que moléculas de alto peso molecular e algumas pequenas moléculas como a L-carnitina convertem os gametas em “competentes” e funcionais. A L-carnitina livre é acetilada somente em espermatozóides maduros e os excessos de acetil-CoA da mitocôndria são provavelmente armazenadas como acetil-L-carnitina e modula as reservas de CoA livre, essencial para o ciclo do ácido tricarboxílico. A relação entre a L-carnitina livre e acetilada e a porcentagem de motilidade espermática progressiva indica uma importante função metabólica ligada ao movimento flagelar do

espermatozóide. JEULIN *et al.* (1994), sugerem que o metabolismo oxidativo (produzindo acetyl-CoA) deve ser mais ativo em espermatozoides maduros.

ROSAS FILHO *et al.* (2001), estudando os efeitos da suplementação oral de L-carnitina nos parâmetros reprodutivos de 12 garanhões Puro Sangue Árabe não observaram diferença estatisticamente significativa no volume livre de gel, motilidade progressiva, concentração espermática, concentração do ejaculado, morfologia espermática (defeitos maiores e menores) e biometria testicular, excetuando-se os defeitos menores. Baseando-se nesses resultados, os autores concluíram que a suplementação oral de L-carnitina não apresentou efeitos sobre as características reprodutivas de garanhões. DURU *et al.* (2000) estudaram os efeitos da adição de progesterona e acetyl-L-carnitina antes da congelação do sêmen e não observou diferenças significativas nas taxas de sobrevivência a criopreservação, parâmetros de motilidade ou integridade de membrana.

STRADAIOLI *et al.* (2000) estudando características seminais de garanhões da raça Maremmano, observaram uma correlação positiva entre os níveis de L-carnitina, acetyl-L-carnitina e concentração espermática e também uma correlação positiva entre os níveis de acetyl-L-carnitina e o total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais. Ademais, uma correlação positiva entre acetyl-L-carnitina, L-carnitina e motilidade progressiva após refrigeração das amostras, sugere que a carnitina pode contribuir para a manutenção espermática durante os processo de armazenagem "*in vitro*". HERFEN *et al.* (1997), suplementaram via oral com L-carnitina (15 g/dia) garanhões em atividade sexual por um período de seis meses e observaram um aumento significativo tanto na concentração espermática quanto no volume do plasma seminal. BROOKS (1979) afirma que o nível total de L-carnitina no plasma seminal é altamente correlacionado com a concentração espermática.

3. MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO:-

3.1- LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO:-

O presente experimento foi realizado no Centro Hípico Agromen na cidade de Orlandia, Estado de São Paulo, de julho a agosto de 2.000 e de maio a agosto de 2.001. O referido município apresenta os seguintes dados geográficos:-

- Latitude:- 20° 44' 50" S
- Longitude:- 47° 53' 23" W
- Altitude:- 660 metros.
- Temperatura Média Anual:- Média Máxima 27°C
Média Mínima 16°C
- Pluviometria:- 1.500 mm/ano

3.2- ANIMAIS UTILIZADOS:-

Foram utilizados 04 garanhões, sendo 03 (três) deles da raça Westfalen e 01 (um) da raça Holsteiner com idades variando de 06 a 10 anos.

Os animais utilizados neste experimento foram submetidos a manejo conveniente e idêntico, constituído de exercícios diários, alojados em baias individuais, alimentação equilibrada e com os aspectos clínico-sanitários devidamente cuidados.

3.3- GRUPOS CONSTITUÍDOS:-

Grupo A – formado pelos quatro garanhões citados anteriormente, denominados agora “grupo controle” (T0). Foram realizadas duas colheitas de sêmen semanais no mês de agosto de 2.000. As amostras colhidas destes garanhões foram processadas seguindo o protocolo estabelecido no sub-título “Colheita, Congelação e Descongelção do Sêmen”.

Grupo B – denominado “grupo tratamento” (T1). Refere-se aos mesmos 04 garanhões do **grupo A**. Estes animais receberam durante os meses de maio, junho, julho e agosto de 2.001, por via oral, 15 gramas de L-carnitina ¹ por dia, dose adotada em função de experimentos com resultados positivos citados em literatura. No mês de agosto de 2.001 o sêmen destes reprodutores foram submetidos a duas colheitas semanais e processados seguindo-se o mesmo protocolo estabelecido no grupo controle.

Os animais do grupo A e do grupo B passaram por um processo de nivelamento biológico que consistiu em duas colheitas semanais de sêmen no mês anterior ao do processo de congelação do sêmen.

3.4- COLHEITA, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN:-

3.4.1- COLHEITA DO SÊMEN:-

Foram realizadas duas colheitas semanais de cada garanhão, utilizando-se vagina artificial modelo Hannover. O sêmen foi filtrado para a remoção da fração gel e imediatamente submetido, em microscópio óptico comum (Carl Zeiss®, Germany) no aumento de 100 vezes, as seguintes análises:-

- **Motilidade espermática total:-** para isso, utilizou-se de um volume de 08 µl do ejaculado depositado entre lâmina e lamínula verificando-se o número de espermatozóides móveis em relação ao total do campo observado.
- **Vigor espermático:-** avaliação realizada de forma subjetiva que visou quantificar em uma tabela de 1 a 5 a velocidade com que os espermatozóides se locomoviam.

¹ Carniking® - LONZA Inc., Fair Lawn, N.J., U.S.A.

- **Total de espermatozóides no ejaculado:-** este valor foi obtido, através do uso de uma câmera de Neubauer, multiplicando-se a concentração de espermatozóides por mililitro pelo volume total do ejaculado.

Estas avaliações determinavam a habilidade da amostra em continuar ou não nas demais etapas do processo de congelação.

3.4.2- CONGELAÇÃO DO SÊMEN:-

Após a avaliação imediata das características de motilidade, vigor e total de espermatozóides do ejaculado, o mesmo foi diluído na proporção 1:1 em diluidor a base de leite desnatado (KENNEY *et al.*, 1975) (Apêndice) – e centrifugado a 600g (centrífuga Fanem®, Modelo Baby, Brasil) por 10 (dez) minutos. Após o término do tempo estabelecido, separou-se o sobrenadante do precipitado (pelete) e este sobrenadante foi submetido a nova centrifugação com força de rotação de 800g por 5 (cinco) minutos.

Os peletes resultantes das duas etapas de centrifugação foram dissolvidos em meio de congelação – EDTA, gema de ovo, lactose e 5% de glicerol (MARTIN *et al.*, 1979) (Apêndice) – sendo que o volume a ser utilizado deste meio foi em quantidade a permitir uma concentração de 100 milhões de espermatozóides por palhetas de 0,52ml. Após envasado, a amostra foi levada, sobre uma grade de inox, a uma geladeira com temperatura de 5°C por um período de 60 minutos, sendo então submetido a uma primeira curva de resfriamento.

Terminada esta primeira etapa, a amostra foi então levada a uma caixa de isopor e permaneceu por um período de 20 minutos em suporte que a mantinha 06 (seis) centímetros acima do nível de nitrogênio (N₂) líquido. Ao fim deste tempo, era então mergulhadas em N₂ a uma temperatura de – 196°C.

3.4.3- DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN:-

O processo de descongelação do sêmen foi realizado submergindo-se as palhetas em água a 46°C por 20 segundos e, em seguida, transferidas para água a uma temperatura de 37°C por 30 segundos.

3.5- ANÁLISES REALIZADAS:-

3.5.1- APÓS A COLHEITA DO SÊMEN:-

Foram comparadas as médias obtidas do total de espermatozóides no ejaculado no grupo controle (T0) e tratado (T1).

3.5.2- APÓS A DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN:-

3.5.2.1- ANÁLISE COMPUTADORIZADA:-

Imediatamente após a etapa de descongelação, foram analisados e comparados entre si, as médias obtidas das amostras de um mesmo ganhão, também com e sem o tratamento, através de uma avaliação computadorizada realizada com o auxílio do equipamento *Hamilton Thorne Motility Analyzer* (HTMA)², pertencente ao Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Universidade “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP em Botucatu S.P. (Brasil), para as seguintes variáveis:-

² Hamilton Thorne Research, Danvers, MA, USA

- **Motilidade Total:-** total de espermatozóides móveis.
- **Motilidade Progressiva:-** total de espermatozóides com movimento progressivo.
- **VAP:-** velocidade espermática ao longo da trajetória média.
- **VSL:-** velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem e término, respectivamente, no primeiro e último ponto analisado.
- **VCL:-** velocidade espermática ao longo da trajetória real.
- **LIN:-** linearidade.

3.5.2.2- TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA:-

Após esta primeira avaliação computadorizada, todas as amostras passaram por um Teste de Termo Resistência (TTR) que consistiu na incubação de uma amostra de sêmen em temperatura de 37°C por 60 minutos com seu conteúdo passando pela mesma análise do HTMA, sendo as variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva, VAP, VSL, VCL e LIN comparadas com os resultados anteriores ao TTR.

3.5.2.3- AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA ESPERMÁTICA:-

Para a realização da avaliação da integridade da membrana espermática, adotou-se o protocolo descrito por HARRISON & VICKERS (1990) e modificado por ZÚCCARI (1998), utilizando a seguinte solução:-

Material e Método

- 01 mL de citrato de sódio.
- 10 µL de solução formol-salina.
- 20 µL de carboxifluoresceína (C.F.)
- 10 µL de iodeto de propídio (I.D.)

Adicionou-se 10 µL de sêmen a 40 µL da solução acima e então examinou-se em microscopia de epifluorescência. A interpretação da leitura obedeceu o seguinte critério:-

- Íntegros:- espermatozóide com a membrana plasmática íntegra, células coradas pela carboxifluoresceína (CF), apresentando-se verde em toda a sua extensão.
- Lesado:- espermatozóide com membrana plasmática e acrossomal lesada, células coradas pelo iodeto de propídio (ID), apresentando-se vermelha.
- Semi-lesado:- espermatozóide com membrana acrossomal lesada e plasmática íntegra apresentando alternância entre as cores verde e vermelha.



Figura 2A – Fotomicrografia de células espermáticas após preparo para exame de fluorescência. Espermatozóides íntegros verdes em toda a sua extensão, lesados corados de vermelho, semilesados corados de verde e vermelho.

3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA:-

Delineamento inteiramente casualizado com 08 (oito) repetições. Esquema fatorial 2 x 4 (dois tratamentos e quatro ganhões). Análise de variância usando o PROC GLM do SAS³, com posterior desdobramento da interação para estudar o efeito dos tratamentos em cada um dos ganhões. Utilizou-se o Teste de Tukey ($\alpha = 5\%$) para comparar as médias dos ganhões.

Antes de usar a ANOVA, utilizou-se o SAS/LAB para verificar as pressuposições do modelo. As sugestões de transformação de variáveis e eliminação de observações influentes foram sempre acatadas.

As variáveis estudadas foram:- Motilidade Total, Motilidade Total TTR, Motilidade Progressiva, Motilidade Progressiva TTR, Linearidade, Linearidade TTR, Velocidade Progressiva (VSL), Velocidade Progressiva TTR (VSL TTR), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Curvilínea TTR (VCL TTR), Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade de Trajeto TTR (VAP TTR), Total de Espermatozoides no Ejaculado e Integridade da Membrana Plasmática.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ (STEEL e TORRIE, 1980; SAS/STAT User's Guide, 1990).

³ SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1990.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:-

A média e erro padrão da média (EPM) para a variável Motilidade Total foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado (T1) quando comparado com o grupo controle (T0) e esta diferença significativa se manteve quando os dois grupos foram submetidos ao Teste de Termo Resistência (TTR) ($T1_{\text{ttr}} > T0_{\text{ttr}}$) – Tabela 1 e Figura 1. Quando comparamos os resultados da média e EPM da variável Motilidade Total entre os ganhões, podemos observar que para o ganhão A (GA) e para o ganhão B (GB) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o grupo controle (T0) e tratado (T1), porém quando submetemos as amostras ao TTR, podemos observar que no grupo tratado ($T1_{\text{ttr}}$) houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na média e EPM em relação ao grupo controle ($T0_{\text{ttr}}$) – Tabela 2 e Figura 2. Para o ganhão C (GC) e para o ganhão D (GD) a média e erro padrão da média da variável Motilidade Total foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado (T1) que no grupo controle (T0) e que este aumento continuou a ser significativamente maior ($p < 0,05$) após a realização do TTR para o grupo tratado ($T1_{\text{ttr}}$) quando comparado com o grupo controle ($T0_{\text{ttr}}$) – Tabela 2 e Figura 2.

Para a variável Motilidade Progressiva, a média e erro padrão da média (EPM) foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1) porém não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os grupos após o TTR, embora tenha sido maior no grupo tratado ($T1_{\text{ttr}}$) que controle ($T0_{\text{ttr}}$) – Tabela 1 e Figura 1. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para a média e erros padrão da média para a variável Motilidade Progressiva entre os ganhões A (GA), B (GB) e D (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1), porém a média e o erro padrão da média do ganhão C (GC) foi significativamente menor para a variável Motilidade Progressiva ($p < 0,05$) para o grupo tratado (T1) quando comparado com o grupo controle (T0) – Tabela 3 e Figura 3. Após a realização do TTR, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a média e erros padrão da média da variável Motilidade Progressiva entre os ganhões “A”, “B”, “C” e “D” no grupo controle ($T0_{\text{ttr}}$) e no grupo tratado ($T1_{\text{ttr}}$) – Tabela 3 e Figura 3.

Quando comparada à média e EPM da variável Linearidade, observou-se que a mesma foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1), porém a média e EPM do grupo controle (T0_{tr}) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do tratado (T1_{tr}) após o TTR – Tabela 1 e Figura 1. A média e erros padrão da média da variável Linearidade foi significativamente menor ($p < 0,05$) para os ganhões A (GA), B (GB), C (GC) e D (GD) no grupo tratado (T1) quando comparados com o grupo controle (T0). Após a realização do TTR, os ganhões A, B e D não diferiram significativamente ($p > 0,05$) quanto as suas médias e erros padrão da média entre o grupo tratado (T1_{tr}) e o grupo controle (T0_{tr}). Porém houve uma diferença significativamente maior ($p < 0,05$) para o ganhão C (GC) no grupo tratado (T1_{tr}) quando comparado com o grupo controle (T0_{tr}) – Tabela 4 e Figura 4.

Os resultados acima descritos corroboram, em parte, com os observados por COSTA *et al.* (1994) em que se demonstrou que a administração oral de L-carnitina foi capaz de aumentar a motilidade espermática de maneira qualitativa e quantitativa. GANDINI *et al.* (2002) também observaram melhoria significativa na motilidade total e na motilidade progressiva, sendo que nesta última variável o grau de significância não foi muito elevado ($p = 0,05$), sendo mais significativo em pacientes com baixo número de espermatozoides por ejaculado. Segundo MAZZILI *et al.* (1999) a administração oral de L-carnitina pode, em casos de hipomotilidade espermática por deficiência da mesma, promover a normalização da motilidade desde que os níveis de testosterona estejam dentro dos parâmetros considerados normais.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Médias e erros padrão da média das variáveis Motilidade Total (MT-%), Motilidade Progressiva (MP-%) e Linearidade (LIN-%) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	MT	MP	LIN
T0	52,38±2,28 ^a	29,22±1,49 ^a	54,28±0,58 ^a
T1	63,25±1,86 ^b	25,09±1,52 ^b	49,13±0,61 ^b
T0 _{ttr}	23,02±0,70 ^c	10,34±1,67 ^c	54,22±1,03 ^a
T1 _{ttr}	32,58±0,48 ^d	13,34±2,19 ^c	54,71±0,85 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

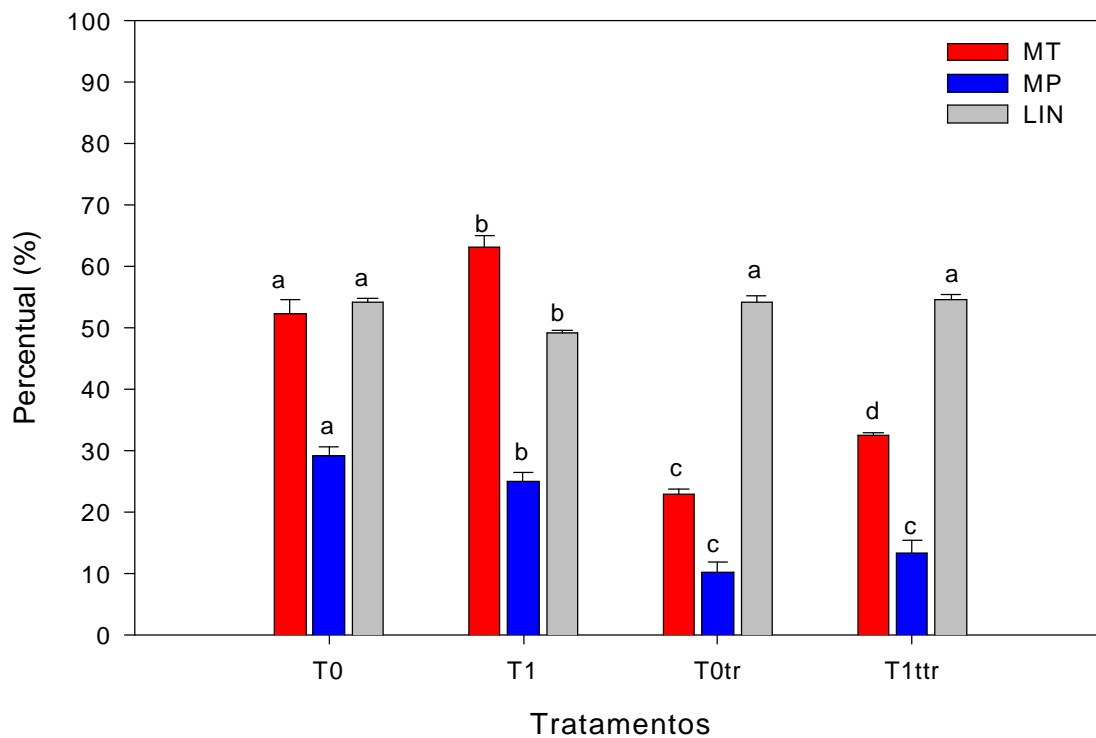


Figura 1. Representação gráfica da média ± EPM das variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Linearidade comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1) antes e após a realização do TTR.

Resultados e Discussão

Tabela 2. Médias e erros padrão da média da variável Motilidade Total (MT-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	44,75±4,73 ^a	59,71±4,05 ^a	45,75±2,96 ^a	60,25±3,53 ^a
T1	51,12±0,99 ^a	64,50±3,14 ^a	61,50±1,64 ^b	75,87±1,76 ^b
T0 _{ttr}	11,48±0,62 ^b	39,39±1,10 ^b	10,32±0,63 ^c	39,88±0,20 ^c
T1 _{ttr}	24,92±0,28 ^c	46,16±0,14 ^c	15,55±0,94 ^d	50,45±0,17 ^d

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

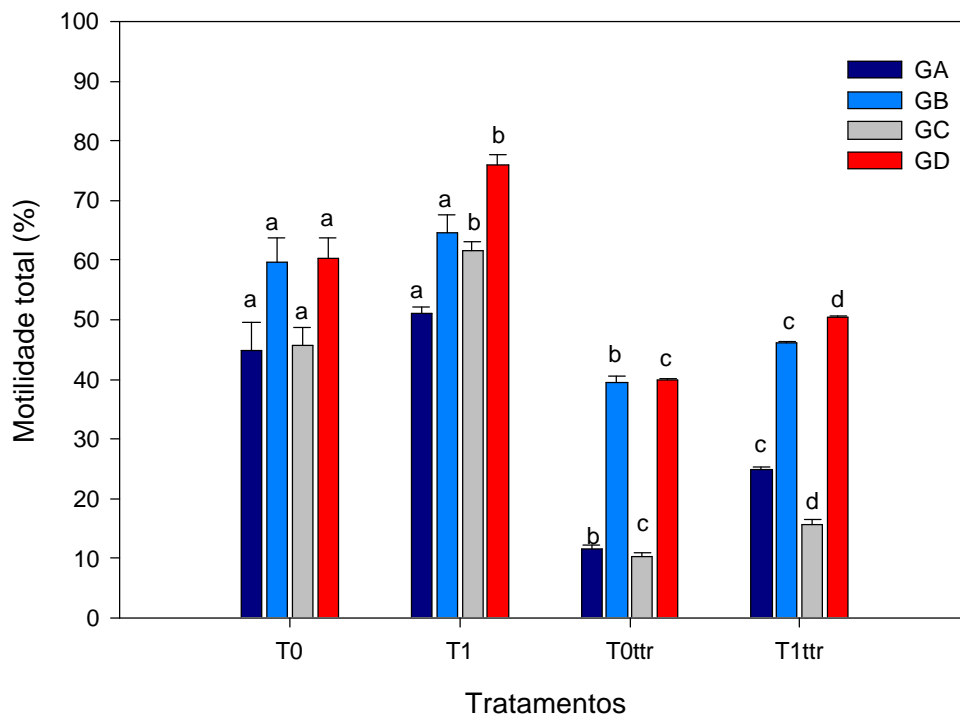


Figura 2. Representação gráfica da média ± EPM da variável Motilidade Total para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Resultados e Discussão

Tabela 3. Médias e erros padrão da média da variável Motilidade Progressiva (MP-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	22,37±3,17 ^a	33,87±3,11 ^a	29,12±1,78 ^a	31,50±2,41 ^a
T1	17,00±0,75 ^a	28,75±1,06 ^a	19,12±2,34 ^b	35,50±1,47 ^a
T0 _{ttr}	3,00±0,96 ^b	19,25±3,40 ^b	2,12±1,01 ^c	17,00±0,87 ^b
T1 _{ttr}	3,63±0,98 ^b	24,12±4,52 ^b	3,37±1,18 ^c	22,25±2,51 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

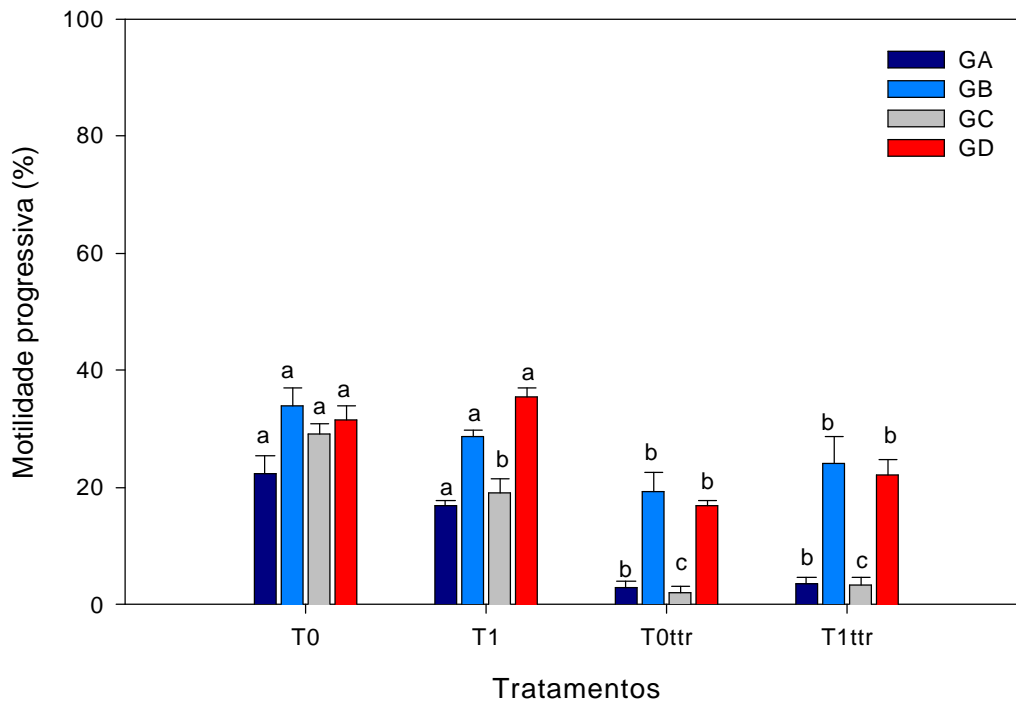


Figura 3. Representação gráfica da média ± EPM para a variável Motilidade Progressiva para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Resultados e Discussão

Tabela 4. Médias e erros padrão da variável Linearidade (LIN-%) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	51,50±0,63 ^a	55,00±1,02 ^a	57,62±0,86 ^a	53,00±0,91 ^a
T1	44,87±0,58 ^b	52,00±1,05 ^b	50,86±0,70 ^b	49,00±0,53 ^b
T0 _{ttr}	48,62±1,28 ^c	56,50±0,87 ^c	55,43±2,86 ^c	56,50±1,68 ^c
T1 _{ttr}	50,50±1,12 ^c	54,50±1,02 ^c	59,87±1,61 ^d	53,86±0,96 ^c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

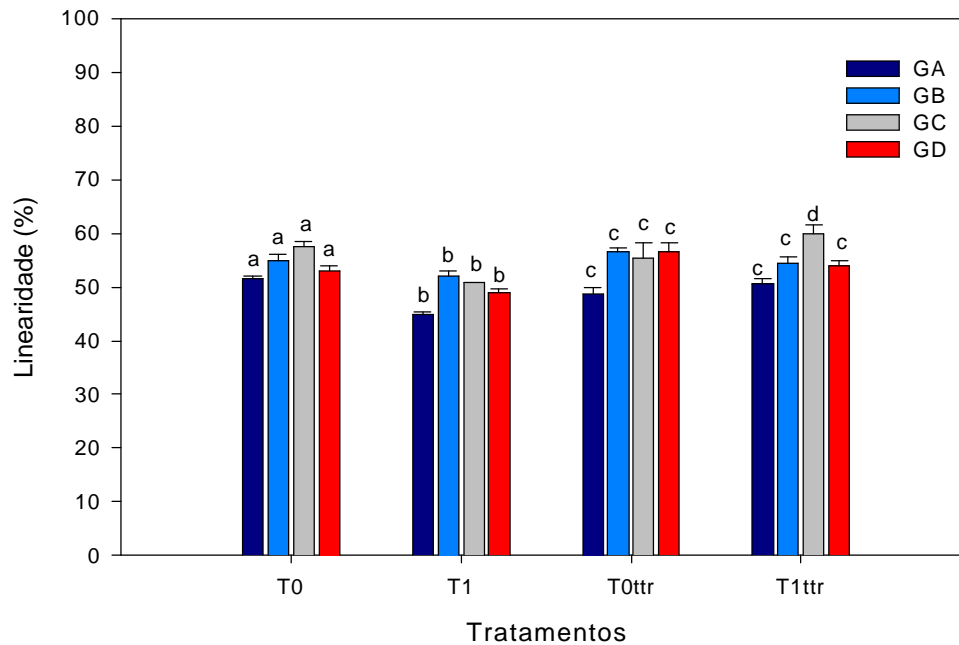


Figura 4. Representação gráfica da média ± EPM da variável Linearidade para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Segundo VAAGENES *et al.* (1998), BIEBER (1988) e COSTA *et al.* (1994) a L-carnitina parece possuir um importante papel no metabolismo de ácidos graxos na célula espermática, disponibilizando-os para o processo de β -oxidação e conseqüente produção de energia. Na figura 5 podemos observar um paralelismo na variação do percentual de espermatozóides com Motilidade Total entre o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após o processo de descongelamento e a realização do teste de termo-resistência (TTR), sendo este percentual sempre superior no grupo tratado.

A queda no percentual de espermatozóides com Motilidade Progressiva foi muito mais acentuada no grupo controle (T0) quando comparada com o grupo tratado (T1) – Figura 6 – passando a ser superior no grupo tratado (T1) após a realização do TTR. Embora tenha havido valores muito semelhante após a realização do TTR para a variável Linearidade entre o grupo tratado (T1) e controle (T0) – figura 7, houve uma melhoria na qualidade do movimento espermático para o grupo tratado após o TTR em comparação àqueles obtidos imediatamente após a descongelação, confirmado a observação de COSTA *et al.* (1994).

Uma maior disponibilidade energética, bem como uma maior estabilização da membrana espermática (SNYDER *et al.*, 1990) e propriedades anti-oxidantes pela ação da L-carnitina (NEUMAN *et al.*, 2002) poderiam levar a um processo de seleção espermática que proporcionou às variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Linearidade resultados superiores para o grupo tratado (T1_{ttr}) quando comparado ao grupo controle (T0_{ttr}) após a realização do TTR, teste este considerado importante para avaliar a longevidade do espermatozóide, submetendo-o a condições semelhantes ao trato genital feminino (DIMITROPOULUS, 1967). Destaque importante deve ser dado à variável Motilidade Progressiva, embora a diferença entre o grupo tratado (T1_{ttr}) e controle (T0_{ttr}) não tenha sido significativa após o TTR, houve uma inversão dos valores entre o grupo controle (10,34 \pm 1,67 %) e tratado (13,34 \pm 2,19 %), passando este último a ser superior.

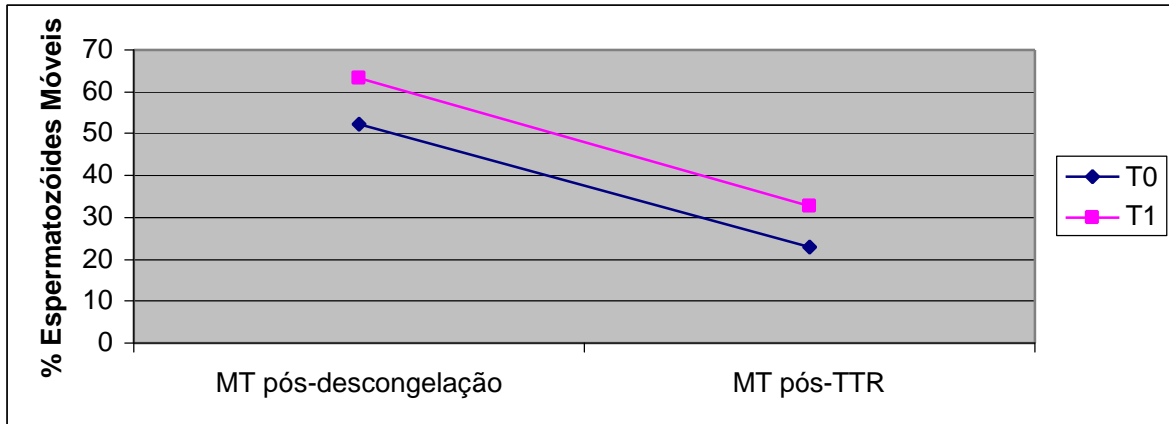


Figura 5. Variação dos valores da variável Motilidade Total (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente a descongelação (MT pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência (MT pós-TTR).

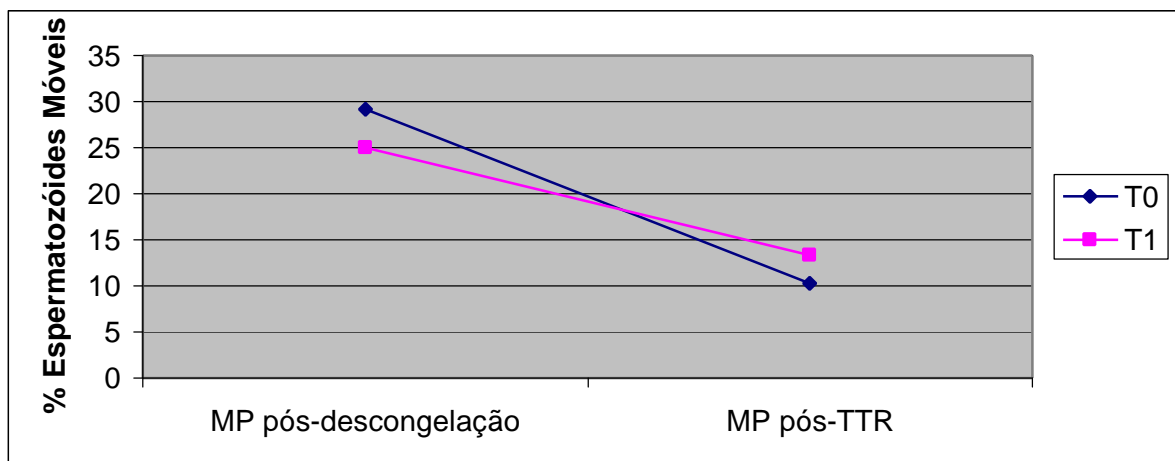


Figura 6. Variação dos valores da variável Motilidade Progressiva (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente a descongelação (MP pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência (MP pós-TTR).

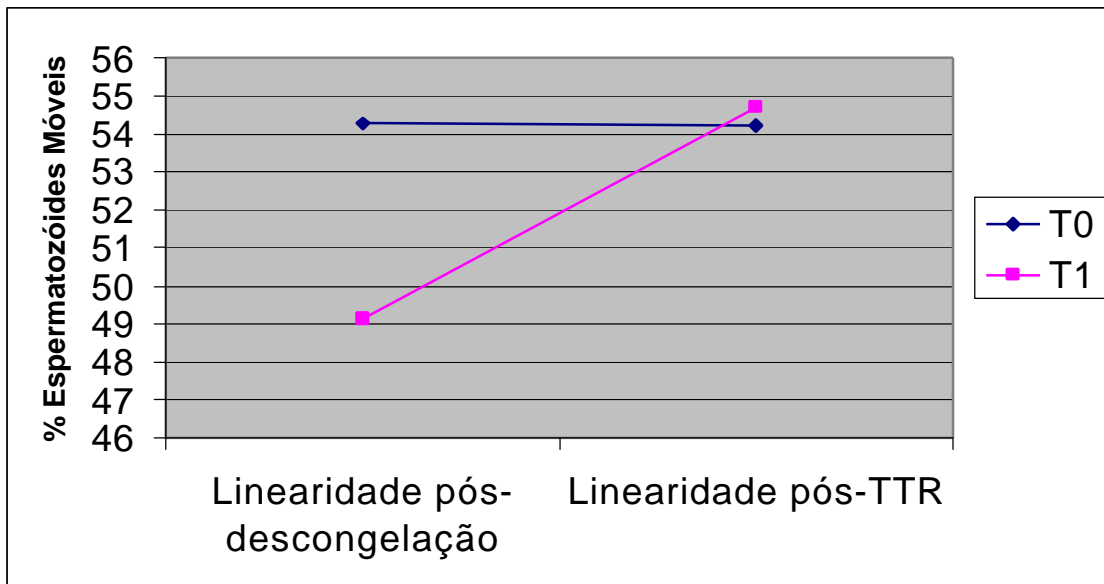


Figura 7. Variação dos valores da variável Linearidade (%) para o grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação (Linearidade pós-descongelação) e após o Teste de Termo-Resistência (Linearidade pós-TTR).

A Velocidade de Trajeto (VAP) obteve uma média e EPM significativamente maior ($p < 0,05$) para o grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1) e esta diferença significativa se manteve após a realização do TTR ($T0_{tr} > T1_{tr}$) – Tabela 5 e Figura 8. Para esta mesma variável, as médias e EPM foram significativamente maiores ($p < 0,05$) para os ganhões A, B e C no grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1), porém não diferiu significativamente para o ganhão D no grupo controle (T0) e tratado (T1) – Tabela 6 e Figura 9. Após a realização do TTR, as médias e EPM desta variável não diferiram significativamente ($p > 0,05$) para os ganhões A e D entre o grupo controle ($T0_{tr}$) e tratado ($T1_{tr}$), porém foram significativamente maiores ($p < 0,05$) para os ganhões B e C do grupo controle ($T0_{tr}$) em relação grupo tratado ($T1_{tr}$) – Tabela 6 e Figura 9.

Quando comparada a média e EPM da variável Velocidade Progressiva (VSL) verificou-se que esta foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o grupo controle (T0) em relação ao grupo tratado (T1) e que esta diferença se manteve após a realização do

TTR ($T0_{\text{tr}} > T1_{\text{tr}}$) – Tabela 5 e Figura 8. As médias e EPM para a variável Velocidade Progressiva (VSL) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) para os ganhões A, B, C e D no grupo controle (T0) quando comparados com os ganhões A, B, C e D no grupo tratado (T1). Após a realização do TTR, a média e EPM da variável VSL foi significativamente superior ($p < 0,05$) para o ganhão A no grupo controle ($T0_{\text{tr}}$) em relação ao grupo tratado ($T1_{\text{tr}}$), porém não diferiram significativamente para os ganhões B, C e D no grupo controle ($T0_{\text{tr}}$) e tratado ($T1_{\text{tr}}$) – Tabela 7 e Figura 10.

As média e EPM da variável Velocidade Curvilínea (VCL) foi significativamente superior ($p < 0,05$) para o grupo controle (T0) quando comparadas com o grupo tratado (T1), porém não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre o grupo controle ($T0_{\text{tr}}$) e tratado ($T1_{\text{tr}}$) após o TTR – Tabela 5 e Figura 8. As médias e EPM para a variável Velocidade Curvilínea não diferiram significativamente ($p > 0,05$) para os ganhões A e D no grupo controle (T0) e tratado (T1), porém foram significativamente superiores ($p < 0,05$) para os ganhões B e C no grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1). Após a realização do TTR, as médias e EPM não diferiram significativamente ($p > 0,05$) para os ganhões no grupo controle ($T0_{\text{tr}}$) e tratado ($T1_{\text{tr}}$) – Tabela 8 e Figura 11.

Resultados e Discussão

Tabela 5. Médias e erros padrão da média das variáveis Velocidade de Trajeto (VAP- $\mu\text{m}/\text{seg}$), Velocidade Progressiva (VSL-- $\mu\text{m}/\text{seg}$) e Velocidade Curvilinear (VCL-- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	VAP	VSL	VCL
T0	88,78 \pm 1,97 ^a	75,93 \pm 1,67 ^a	148,01 \pm 3,14 ^a
T1	76,03 \pm 1,16 ^b	62,17 \pm 0,88 ^b	131,88 \pm 2,26 ^b
T0 _{ttr}	70,76 \pm 2,18 ^c	59,83 \pm 1,57 ^c	111,96 \pm 3,29 ^c
T1 _{ttr}	64,74 \pm 2,00 ^d	56,17 \pm 1,68 ^d	108,88 \pm 3,47 ^c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

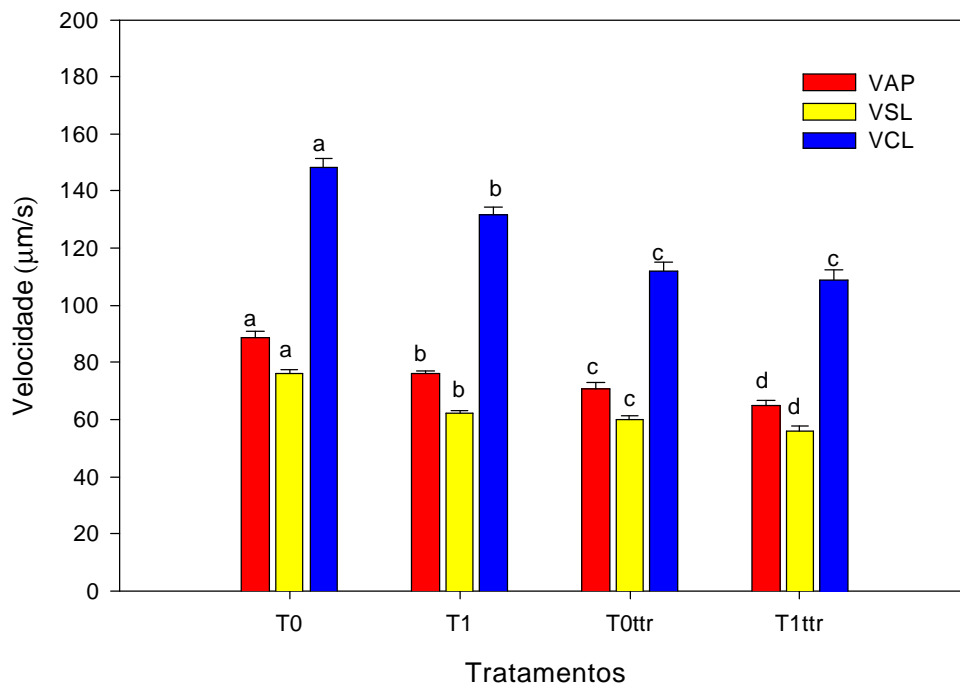


Figura 8. Representação gráfica das médias \pm EPM das variáveis Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL) e Velocidade Curvilinear (VCL) comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1) antes e após a realização do TTR.

Tabela 6. Médias e erros padrão da média da variável Velocidade de Trajeto (VAP- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões "A" (GA), "B" (GB), "C" (GC) e "D" (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	82,01 \pm 4,82 ^a	95,80 \pm 1,80 ^a	92,76 \pm 2,37 ^a	85,44 \pm 4,06 ^a
T1	72,80 \pm 0,44 ^b	79,14 \pm 2,01 ^b	72,54 \pm 3,52 ^b	79,64 \pm 0,80 ^{a,b}
T0 _{ttr}	62,25 \pm 2,92 ^c	83,29 \pm 3,57 ^c	65,82 \pm 4,96 ^c	71,62 \pm 1,53 ^b
T1 _{ttr}	54,66 \pm 1,63 ^c	74,83 \pm 3,04 ^{b,d}	57,64 \pm 3,60 ^d	71,81 \pm 1,58 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

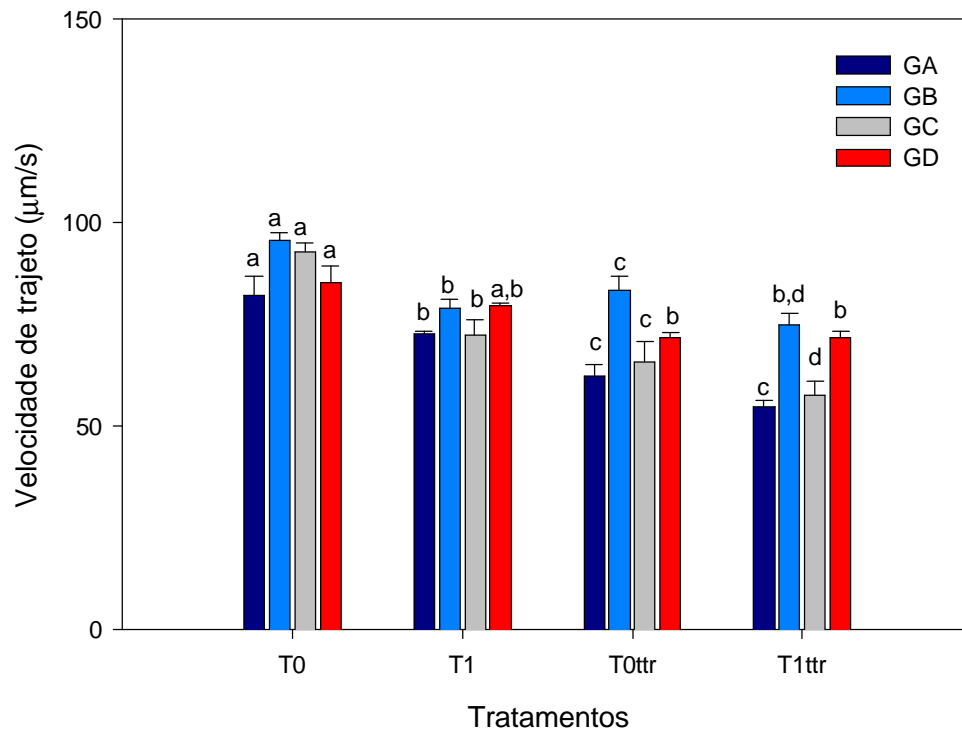


Figura 9. Representação da média \pm EPM da variável Velocidade de Trajeto para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Resultados e Discussão

Tabela 7. Médias e erros padrão da variável Velocidade Progressiva (VSL- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões "A" (GA), "B" (GB), "C" (GC) e "D" (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	66,02±1,78 ^a	82,61±1,58 ^a	82,50±1,61 ^a	70,26±2,63 ^a
T1	58,69±0,41 ^b	65,37±1,50 ^{b,c}	59,50±2,29 ^b	65,14±0,69 ^{b,c}
T0 _{ttr}	52,79±2,63 ^c	67,37±2,30 ^c	56,24±3,38 ^c	62,91±1,31 ^c
T1 _{ttr}	46,40±0,87 ^d	65,12±2,61 ^c	51,17±2,80 ^c	62,00±1,09 ^c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

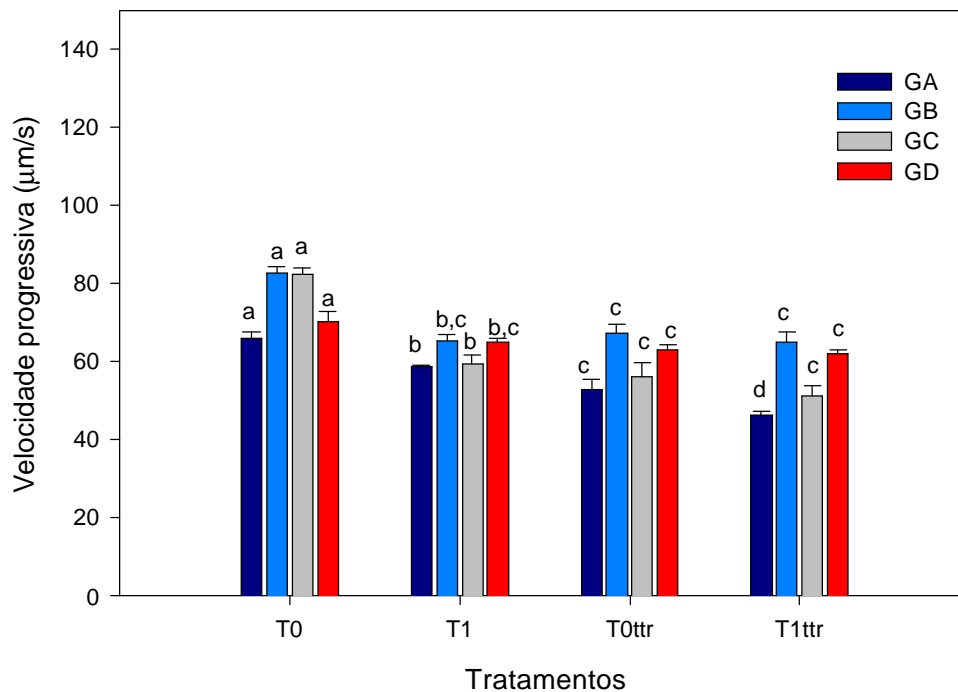


Figura 10. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Velocidade Progressiva para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Resultados e Discussão

Tabela 8. Médias e erros padrão da variável Velocidade Curvilinear (VCL- $\mu\text{m}/\text{seg}$) para os ganhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação e controle (T0_{ttr}) e tratado (T1_{ttr}) após a realização do Teste de Termo Resistência (TTR).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	139,65 \pm 5,94 ^a	166,11 \pm 4,64 ^a	144,07 \pm 3,60 ^a	142,20 \pm 6,36 ^a
T1	135,40 \pm 0,94 ^a	132,47 \pm 5,27 ^b	123,07 \pm 6,54 ^b	136,59 \pm 1,70 ^a
T0 _{ttr}	112,05 \pm 5,14 ^c	118,86 \pm 5,12 ^c	104,86 \pm 10,74 ^c	112,06 \pm 3,53 ^b
T1 _{ttr}	101,67 \pm 4,19 ^c	125,06 \pm 5,73 ^c	90,39 \pm 6,84 ^c	118,41 \pm 3,09 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

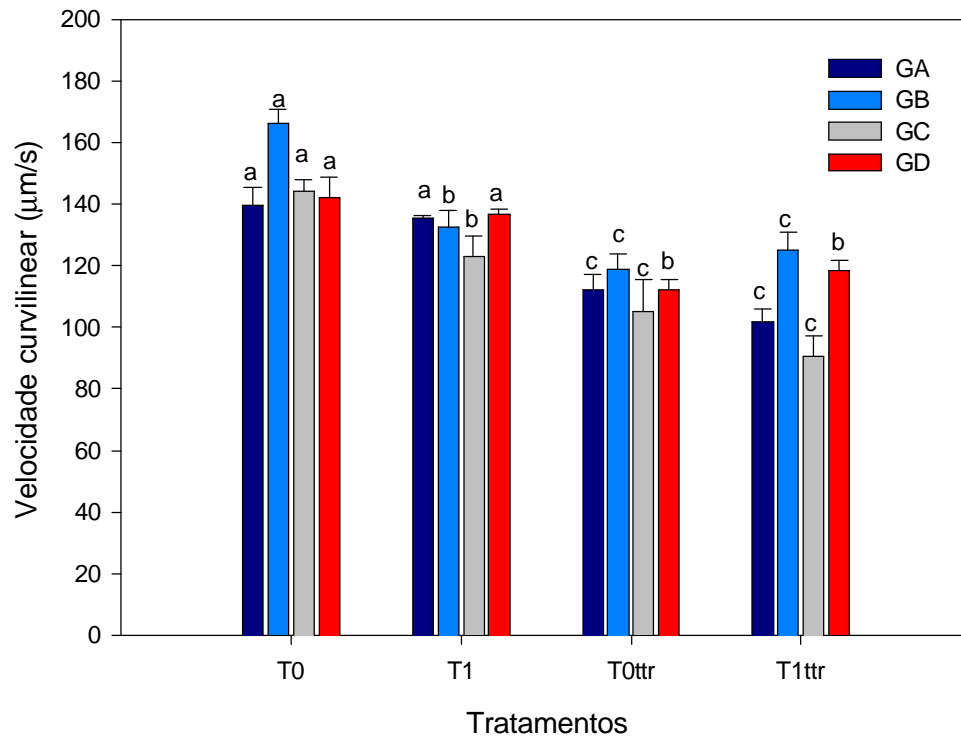


Figura 11. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Velocidade Curvilinear para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

Os valores menores de velocidades espermática encontrados no grupo tratado (T1) quando comparados ao grupo controle (T0) podem, em parte, ser justificado pelo uso de diluidores que utilizam em sua composição gema de ovo, como o proposto por MARTIN *et al.* (1979), uma vez que alguma deficiência no processo de homogeneização do mesmo poderia não ser capaz de romper os glóbulos de gorduras presentes na gema de ovo. A presença destes glóbulos dificulta a locomoção dos espermatozóides no meio, fato este bastante evidenciado durante a análise das amostras.

Uma vez que a L-carnitina disponibiliza para a célula espermática uma maior reserva energética (VAAGENES *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1994; ZEYNER & HARMEYER, 1999; LENZI *et al.*, 1992) esta poderia ser de extrema importância para a longevidade do espermatozóide. Em situações onde a ovulação ocorre em um tempo muito distante do processo de inseminação ou cobertura, as células com maiores reservas de ácidos graxos passariam a utilizar a β -oxidação dos mesmos como fonte energética, uma vez que a glicólise (primeira fonte energética a ser utilizada) cessa rapidamente. Sob estas circunstâncias, estes espermatozóides estariam aptos ao processo de fertilização por um maior período de tempo.

Analisando os resultados obtidos para as variáveis Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL) e Velocidade Curvilinear (VCL) podemos observar que houve uma queda muito mais acentuada na velocidade espermática do grupo controle (T0) quando comparado com o grupo tratado (T1) nas análises realizadas imediatamente após a descongelação e após a realização do teste de termo-resistência (Figuras 12, 13 e 14), análises estas realizadas sessenta (60) minutos após o processo de descongelação. Observando as figuras acima citadas, podemos supor que caso estas análises tivessem sido realizadas após um período de tempo maior, provavelmente as velocidades do grupo tratado (T1) passariam a ser superiores ao grupo controle (T0).

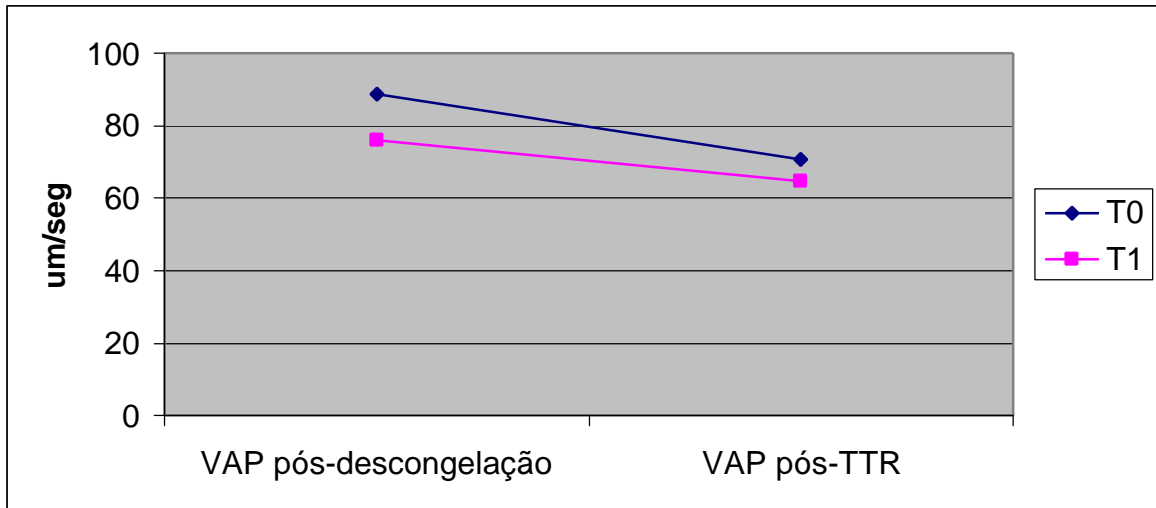


Figura 12. Variação dos valores da variável Velocidade de Trajeto (VAP - $\mu\text{m}/\text{seg}$) para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelamento (VAP pós-descongelamento) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VAP pós-TTR).

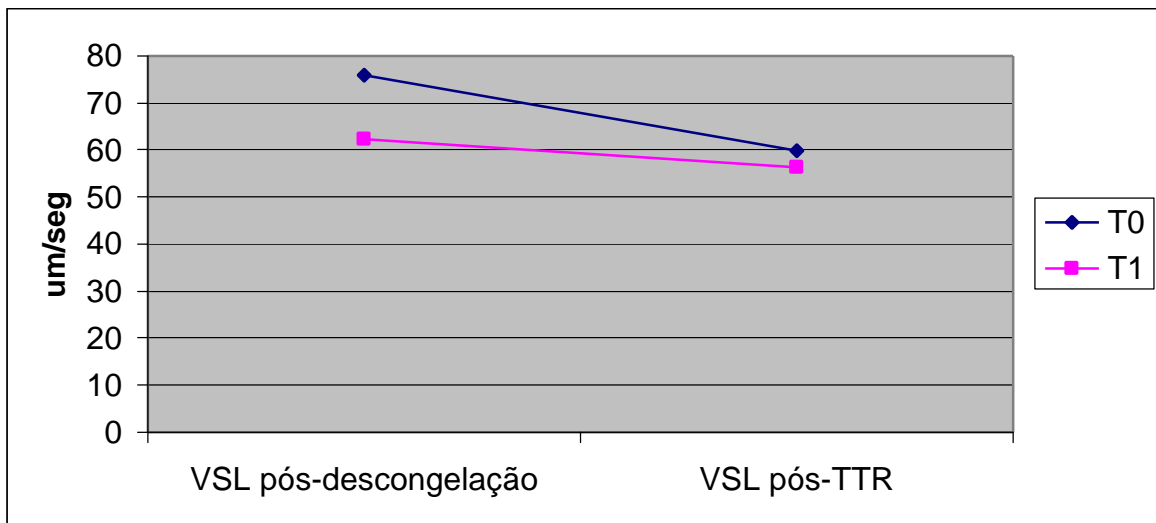


Figura 13. Variação dos valores da variável Velocidade Progressiva (VSL - $\mu\text{m}/\text{seg}$) para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelamento (VSL pós-descongelamento) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VSL pós-TTR).

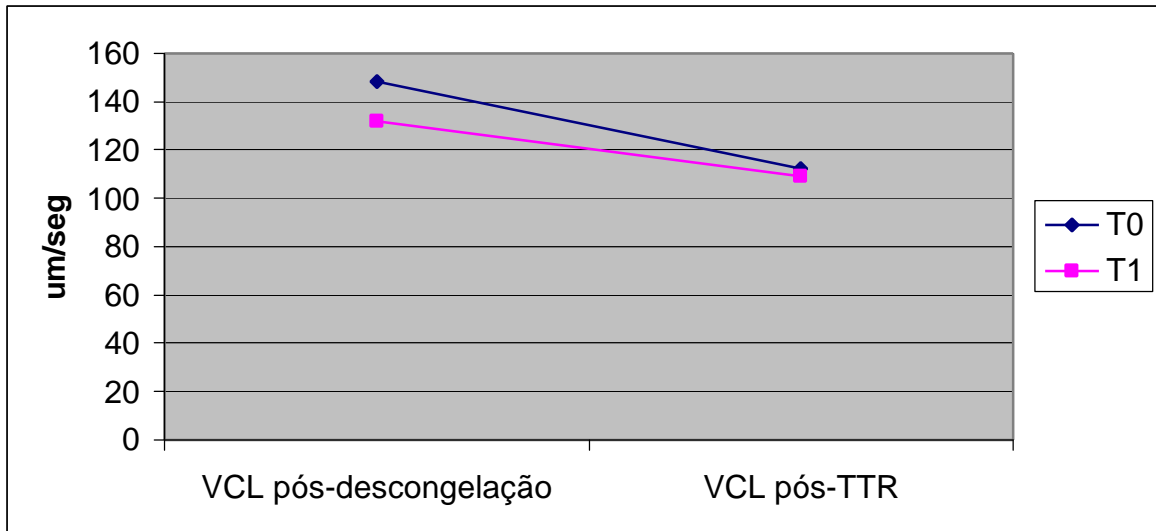


Figura 14. Variação dos valores da variável Velocidade Curvilinear (VCL - µm/seg) para o grupo tratado (T1) e controle (T0) imediatamente após a descongelamento (VCL pós-descongelamento) comparado com os valores após a realização do Teste de Termo-Resistência (VCL pós-TTR)

A média e EPM da variável Integridade da Membrana Espermática foram significativamente superiores ($p < 0,001$) para o grupo tratado (T1) quando comparada com o grupo controle (T0) – Tabela 9 e Figura 15. As médias e EPM desta variável para os garanhões A (GA), B (GB), C (GC) e D (GD) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) para o grupo tratado (T1) quando comparado com o grupo controle (T0) – Tabela 10 e Figura 16.

Tabela 9. Médias e erros padrão da média da variável Integridade da Membrana Espermática (IM-%) para os grupos controle (T0) e tratado (T1), imediatamente após a descongelação.

Tratamento	Porcentagem de Íntegros
T0	38,19±1,36 ^a
T1	51,97±6,84 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,001$)

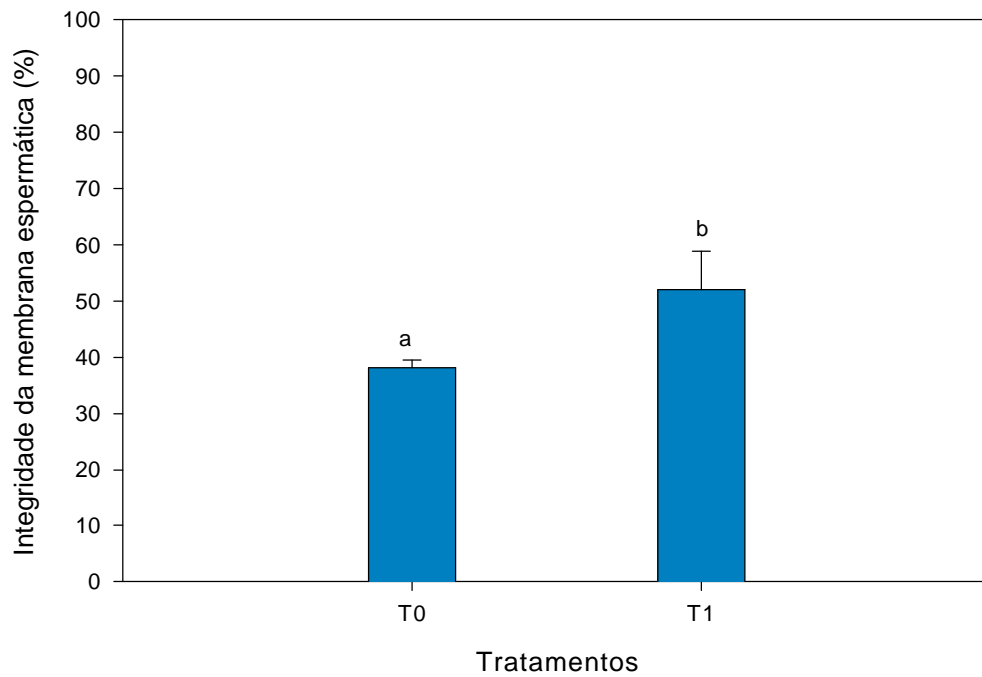


Figura 15. Representação gráfica da média ± EPM da variável Integridade da Membrana Espermática comparados entre o grupo controle (T0) e tratado (T1).

Resultados e Discussão

Tabela 10. Médias e erros padrão da variável Integridade da Membrana Espermática (IME-% de íntegros) para os garanhões “A” (GA), “B” (GB), “C” (GC) e “D” (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1) imediatamente após a descongelação.

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	38,37±0,68 ^a	36,62±1,33 ^a	44,50±3,04 ^a	33,25±3,46 ^a
T1	48,12±1,82 ^b	56,50±1,82 ^b	51,62±2,93 ^b	51,62±2,37 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

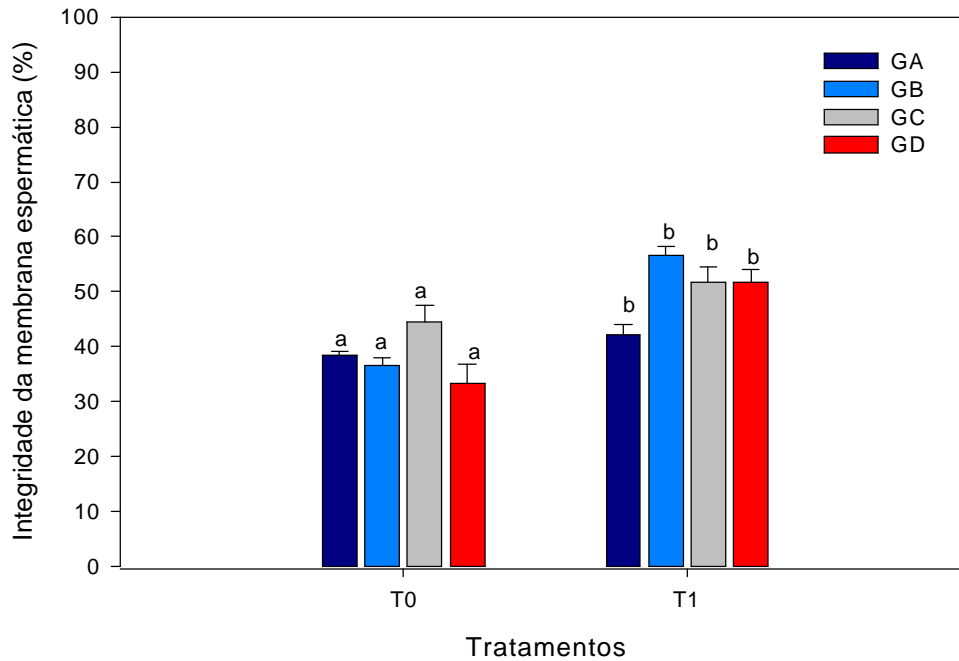


Figura 16. Representação gráfica das médias ± EPM da variável Integridade da Membrana Espermática para os diferentes garanhões nas diferentes etapas do tratamento.

Vários são os processos físico-químicos que podem afetar a qualidade estrutural da membrana espermática, dentre os quais podemos destacar a recristalização da água no momento da descongelação e os processos oxidativos que sofrem as células durante a criopreservação. Após a administração oral de L-carnitina em pacientes humanos por BACH *et al.* (1983), observou-se um aumento na concentração sorológica da mesma. Aumento semelhante pode ter ocorrido após a administração oral de L-carnitina para os ganhões utilizados neste experimento e, através de um de transporte ativo andrógeno-dependente, elevado sua concentração no plasma seminal. Os resultados obtidos neste experimento dão suporte a esta suposição.

A melhoria observada na integridade da membrana espermática do grupo tratado em relação ao grupo controle corrobora as observações feitas por NEUMAN *et al.* (2002) e SNYDER *et al.* (1990) que destacam as propriedades antioxidantes da L-carnitina, caracterizando proteção às membranas espermáticas contra espécies reativas ao oxigênio (ROS) bem como sua capacidade de estabilizar as membranas espermáticas submetidas a condições físicas adversas (criopreservação). RUIZ-PESINI *et al.* (2001) observaram correlação significativa entre a secreção de L-carnitina no plasma seminal e a qualidade espermática.

A L-carnitina atua disponibilizando ácidos graxos (lipídios) para a matriz mitocondrial e desta maneira reduz a disponibilidade destes lipídios para os processos de peroxidação (NEUMAN *et al.*, 2002). A conjunção destas duas propriedades estaria, desta maneira, aumentando a disponibilidade energética para a célula espermática e diminuindo a quantidade de substâncias pró-oxidantes, substâncias estas que aumentam de maneira significativa em processos como o de criopreservação.

Provavelmente os espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomal lesada ou semilesada não apresentam capacidade de fertilização.

Houve também um aumento significativo ($p < 0,001$) na média e EPM da variável Total de Espermatozoides no Ejaculado para o grupo tratado (T1) em relação ao grupo controle (T0) – Tabela 11 e Figura 17. A variável Total de Espermatozoides por Ejaculado obteve médias e EPM significativamente superiores ($p < 0,001$) para os

Resultados e Discussão

garanhões A (GA), B (GB), C (GC) e D (GD) no grupo tratado (T1) quando comparados com os garanhões A, B, C e D no grupo controle (T0) – Tabela 12 e Figura 18.

Tabela 11. Médias e erros padrão da média da variável Total de Espermatozóides no Ejaculado (TSptz- $\times 10^9$) para os grupos controle (T0) e tratado (T1) após duas coletas semanais por um período de 04 semanas.

Treatmento	Total de Espermatozóides no Ejaculado
T0	6,84 \pm 0,39 ^a
T1	12,13 \pm 0,29 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,001$)

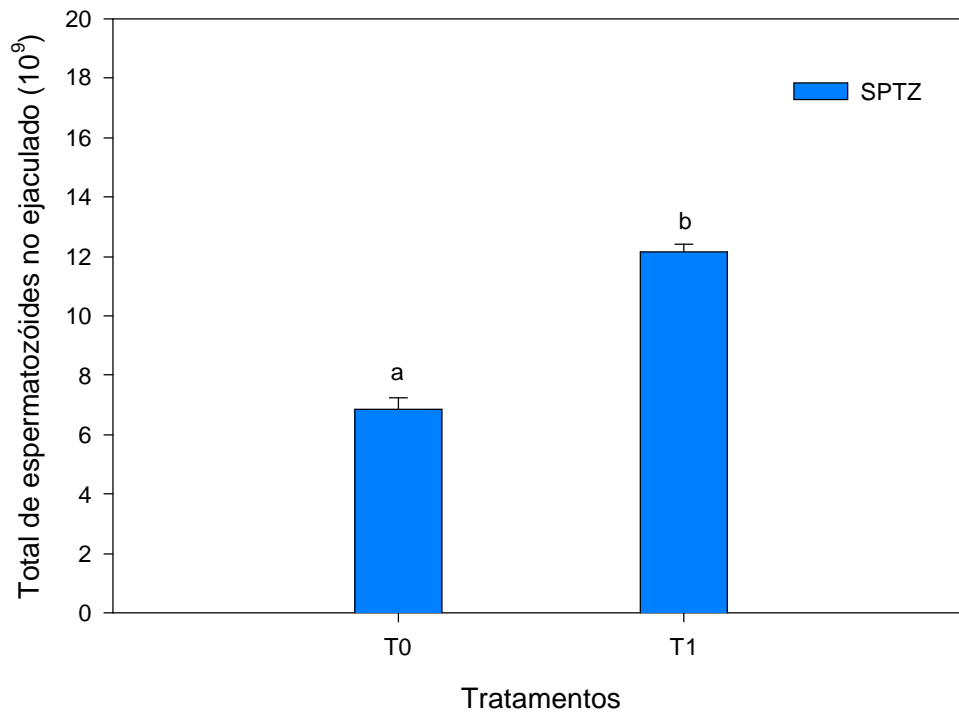


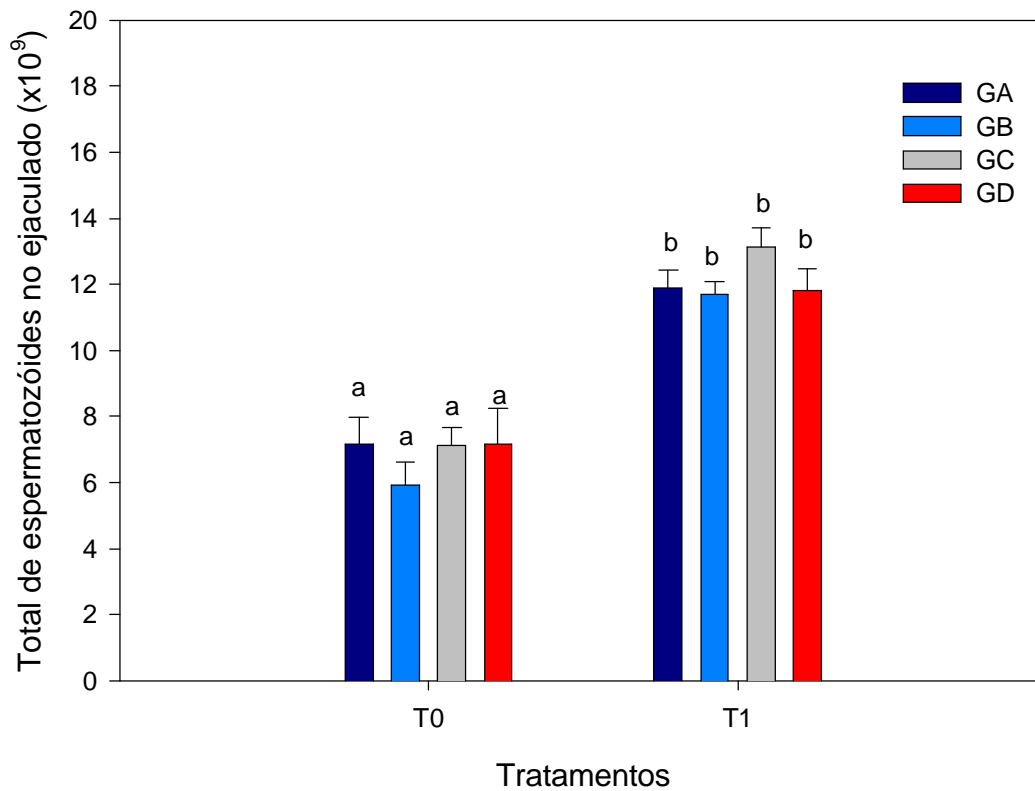
Figura 17. Representação gráfica da média \pm EPM da variável Total de Espermatozóides no Ejaculado comparado entre o grupo controle (T0) e tratado (T1).

Resultados e Discussão

Tabela 12. Médias e erros padrão da variável Total de Espermatozóides no Ejaculado (TSptz-x10⁹) para os ganhões "A" (GA), "B" (GB), "C" (GC) e "D" (GD) no grupo controle (T0) e tratado (T1).

Tratamento	GA	GB	GC	GD
T0	7,16±0,82 ^a	5,92±0,70 ^a	7,14±0,51 ^a	7,15±1,08 ^a
T1	11,89±0,55 ^b	11,69±0,40 ^b	13,13±0,59 ^b	11,79±0,69 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,001$)

**Figura 18.** Representação gráfica da média ± EPM da variável Total de Espermatozóides no Ejaculado para os diferentes ganhões nas diferentes etapas do tratamento.

O aumento significativo no número total de espermatozoides por ejaculado parece estar também correlacionado a disponibilização de maior fonte energética para os processos celulares, dentre os quais podemos destacar os de divisão celular. Conforme observação realizada por DI LISA *et al.* (1995) a ação da L-carnitina na síntese e transporte de ATP para fora da mitocôndria ajudaria no suprimento energético em processos de grande consumo de energia, como a espermatogênese.

ROSAS FILHO *et al.* (2001) estudaram os efeitos da suplementação oral de L-carnitina em garanhões Puro Sangue Árabe e não observaram diferenças significativas para os parâmetros estudados. A metodologia e a dose utilizada de L-carnitina (10 gramas/dia) pelos autores acima poderia justificar as diferenças encontradas após a suplementação com 15 gramas de L-carnitina por dia.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO:-

Os resultados do presente trabalho, sob as condições em que foi realizado, permitem as seguintes conclusões:-

- O uso da L-carnitina provou ser eficaz principalmente para as variáveis Total de Espermatozoides no Ejaculado, Motilidade Total e Integridade da Membrana Espermática em sêmen criopreservado.
- Houve uma queda na qualidade espermática muito mais acentuada no grupo controle quando comparado com o grupo tratado após a realização do Teste de Termo-Resistência.
- Houve uma variação na resposta individual de cada ganhão em função do tratamento adotado.
- Novos estudos deverão ser realizados utilizando-se diferentes tipos de diluidores para se avaliar o motivo da queda nas velocidades espermáticas.
- A administração oral de L-carnitina para ganhões pode se tornar uma importante ferramenta terapêutica para a melhoria dos parâmetros espermáticos desta espécie.
- A ação da L-carnitina sobre os parâmetros espermáticos do ganhão parece estar intrinsecamente relacionada aos processos metabólicos envolvidos desde o processo de espermatogênese até a uma melhoria na qualidade final do espermatozoide.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:-

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-73, 1987.

ARDUINI, A.; HOLME, S.; SWEENEY, J.D.; DOTTORI, S.; SCIARROMI, A.F.; CALVANI, M.; Addition of L-carnitine to additive solution-suspended red cells stored at 4 degrees C reduces *in vitro* hemolysis and improve *in vivo* ability. **Transfusion**, v.37, n.2, p.166-74, 1997.

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, 2000, 121 p. Tese Livre-Docência. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A.; Características seminais de eqüídeos destinados a seleção para a congelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.1, p.214, Suplemento, 1989 a.

ASHIZAWA, K.; KAMIYA, T.; TAMURA, I.; TSUZUKI, Y.; Inhibition of flagellar motility of fowl spermatozoa by L-carnitine: its relationship with respiration and phosphorylation of axonemal proteins. **Mol. Reprod. Dev.**, v.38, n.3, p.318-25, 1994.

ATSUSHI, E.; WEMPE, M.F.; TSUCHIDA, H. et al; Molecular identification of a novel carnitina transporter specific to human testis. **JBC Online**, 2002.

BALL, B.A.; An introduction to the use and implication of cryopreserved equine semen. In: **Equine Assisted Reproductive Technology Workshop**, Davis, CA. Proceeding Davis: School of Veterinary Medicine University of California, p.25-43, 1998.

BAUMGARTNER, M.; BLUM, R.; L-carnitine and sperm quality. In: **L-carnitine in animal nutrition**. Basel: Lonza, p. 1-6, 1997.

BACH, A.C.; SCHIRARDIN, H.; SIHR, M.O.; STORCK, D.; Free and total carnitina in human serum after oral ingestion of L-carnitine. **Diabete and Metabolisme**, v.9, p.121-24, 1983.

Referências Bibliográficas

- BIEBER, L.L.; Carnitine; **Ann. Rev. Biochem.**, v.57, p.261-83, 1988.
- BROOKS, D.E.; Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa. Proc.Virginia Lazenby O'Hara, **Biochemical Symposium**, 1979, p.219-35, New York.
- BUTTERFIELD, D.A.; RANGACHARI, A.; Acetyl carnitina increase membrane cytoskeletal protein-protein interactions. **Life Science**, v.52, p.297-303, 1992.
- COSTA, M.; CANALE, D.; FILICORI, M.; D'IDDIO, S.; LENZI, A.; L-carnitine in idiopathic astenozoospermia: a multicenter study. Italian study group on carnitine and male infertility. **Andrologia**, v.26, n.3, p.155-9, 1994.
- CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L.; Effects of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v.55, n.3, p.793-803, 2001.
- DELL'ACQUA JUNIOR, J.A.; **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. Botucatu, 2000, 80p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2000.
- DI LISA, F.; BARBATO, F.; MENABO, R.; SILIPRANDI, N.; Carnitine and carnitine esters in mitochondrial metabolism and function. **Dev. Cardivasc. Med.**, v.162, p.21-38, 1995.
- DIMITROPOULOS, R.; La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Ann. Méd. Vét.**, v.4, p.215-24, 1967.
- DURU, N.K.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S.; Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm mobility or membrane damage after cryopreservation-thwing. **Fertility and Sterility**, v.74, n.4, p.715-20, 2000.
- FERREIRA, J.C.P.; PAPA F.O.; NEVES NETO, J.R.; Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhão com fertilidade comprovada. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 12^o. Belo Horizonte, p.131-33, 1997.

Referências Bibliográficas

- FERREIRA, J.C.P.; **Avaliação computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen eqüino**. Botucatu, 1999. Tese Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1999.
- FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J.; **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA, Belo Horizonte, MG, 1992.
- GANDINI, L.; AGARWAL, A.; SGRO, P. et al; A prospective double blind placebo controlled cross over trial of carnitine therapy in selected cases of male infertility. **Fertility and Sterility**, v.78, n.3, p.68-69, 2002. Abstracts.
- GOLAN,R.; SETCHELL B.P.; BURROW, P.V.; LEWIN, L.M.; A comparative study of carnitina and acylcarnitine concentration in semen and male reproductive tract fluids. **Comp. Biochemical e Physiology**, v.72, n.3, 457-60, 1982.
- GRIZARD, G.; LOMBARD-VIGNON, N.; BOUCHER, D.; Changes in carnitina and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. **Human Reproduction**, v.7, n.9, p.1245-8, 1992.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E.; Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.11, p.73-88, 1990,
- HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C.; Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.47-53, 1996.
- HERFEN, K.; HARMEYER, J.; BOSTEDT, H.; BAUMGARTNER, M.; The impact of l-carnitine on sperm quality in stallions. In: **Reproduction, Physiology and Pathology Conference**, 30th, 1997, Viena. Proceeding p. 77.
- HINTON, B.T.; BROOKS, D.E.; DOTT, H.M.; SETCHELL, B.P.; Effects of carnitina and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, n.1, p.59-64, 1981.

Referências Bibliográficas

HOLT, W.V.; Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.

JASKO, D.J.; Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v.39, n.6, p.1159-67, 1988.

JEULIN, C.; LEWIN, L.M.; Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post gonadal maturation of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, v.2, n.2, p.87-102, 1996.

JEULIN, C.; DACHEUX, J.L.; SOUFIR, J.C.; Uptake and release of free L-carnitine by boar epididimal spermatozoa *in vitro* and subsequent acetylation rate. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, n.1, p.263-71, 1994.

JOUANNET, P.; SOUFIR, J.C.; DUCOT, B.; SPIRA, A.; SOUMAH, A.; MARSON, J.; Semen characteristics and fertility. **Annual Endocrinology**, v.42, n.4-5, p.416-22, 1981.

JOHANSEN, L.; BOHMER, T.; Motility related to the presence of L-Carnitine in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 2, p.201-210, 1979.

KOHENGKUL, S.; Levels of L-Carnitine and Acetyl-L-Carnitine in normal and infertile human semen: a lower level of Acetyl-L-Carnitine in infertile semen. **Fertility and Sterility**, v. 28, p.1333-36, 1977.

KOLIBIANAKIS, E.M.; TARLATZIS, B.C.; BONTIS, J.; PAPADIMAS, J.; SPANOS, E.; MANTALENAKIS, S.; Evaluation of Hamilton-Thorn automated semen analysis system. **Archives of Andrology**, v.28, p. 213-22, 1992.

LENZI, A.; LOMBARDO, F.; GANDINI, L.; DONDERO, F.; Metabolism and actino of L-carnitine: its posible role in sperm tail function. **Archieve Ital. Urol. Nefrol.**, v.64, n.2, p.187-96, 1992.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W.; Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: American Association of Equine Practice. **Proceedings** p.327-35, 1975.

MAHONY, M.C.; ALEXANDER, N.J.; SWANSON, R.J.; Evaluation of semen parameter by means of automated sperm motion analyzers. **Fertility and Sterility**, v.49, p.876-880, 1998.

Referências Bibliográficas

- MANGANO, N.G.; SABELLA, P.; MANGANO, A.; *In vitro* effects of L-carnitine on the inhibition of sperm motility induced by FANS. **Clin. Ter.**, v. 151, n.3, p. 173-6, 2000.
- MARQUES, A.; **Efeitos do ácido ascórbico e da pentoxifilina sobre o sêmen criopreservado de eqüinos submetidos a incubação *in vitro***. Dissertação Mestrado, 69p., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R.; Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.47-51, 1979. Supplement.
- MARCK, S.O.; WOLF, D.P.; TASH, J.S.; Quantification of specific parameter of motility in large members of human sperm by digital image processing. **Biology Reproduction**, v.37, p.270-81, 1988.
- MATALLIOTAKIS, I.; KOUMANTAKI, Y. et al.; L-carnitine levels in seminal plasma of fertile and infertile men correlation with sperm quality. **International Journal of Fertility**, v.45, n.3, p.236-40, 2000.
- MATTOS, R.C.; MALSCHITZKY, E.; CASTILHO, L.F.F. et al; Efeitos de diferentes diluentes na sobrevivência de espermatozoides eqüinos *in vitro*. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993, Belo Horizonte, MG, Anais CBRA, v.2, p.325, Resumo.
- MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; RONCONI, C.; GERMINI, B.; DONDERO, F.; Intra-spermatocytic L-carnitine and survival of sperm motility. **Minerva Gynecology**, v.51, n.4, p.129-34, 1999.
- MENCHINI-FABRIS, G.F.; CANALE, D.; IZZO, P.L.; OLIVIERI, L.; BARTELLONI, M.; Free L-carnitine in human semen: its variability in different andrologic pathologies. **Fertility and Sterility**, v.42, n.2, p.263-7, 1984.
- MESCHEDE, D.; DWORNICZAK, B.; NIESCHLAG, E.; HORST, J.; Genetic diseases of the seminal ductis. **Biomedical & Pharmacother**, v. 52, p.197-203, 1998.
- MICIC, S.; LALIC, N.D.; DOTLIC, R.D.; Seminal carnitina and glucosidase in oligospermic and azoospermic men, **Journal of Andrology**, v.15, p.77, 1994, Supplement.

Referências Bibliográficas

- MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A.; VACCARCEL, A.; Use of computerized motility analysis for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v.27, n.1, p.25-9, 1995.
- NEUMAN, S.L.; LIN, T.L.; HESTE, P.Y.; The effect of dietary carnitina on semen traits of white Leghorn roosters. **Poultry Science**, v.81, n.4, p.495-503, 2002.
- PALMER, E.; Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: **Congress on Animal Reproduction**, Champaign, 1984, p.769.
- PAPA, F.O.; **Contribuição ao estudo da utilização do sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para congelamento e inseminação artificial**. Botucatu, 1987. Tese Livre-Docência. 150 p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- PAPA, F.O.; Avanços na tecnologia de sêmen eqüino. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 8, 1989, Belo Horizonte, MG. Anais CBRA, p.318-39, Palestra.
- PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C. et al.; Glicina-gema: proposta de um novo diluïdor para congelação de sêmen eqüino. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993, Belo Horizonte, MG. Anais CBRA, v.2, p.326. Resumo.
- SAS/STAT **User's Guide**, version 6, 4 ed., vol. 2, Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 1990.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; **Principles and Procedures of Statistics – A biometrical Approach**, 2 ed., Singapura: McGraw-Hill, Inc., 633p., 1980.
- ROSAS FILHO, A.C.; SPERS, A.; MAZZA, P.H.R.; ARRUDA, R.P.; GAMA, R.D.; ROSSA, L.A.F.; Efeito da L-carnitina na alimentação de garanhão puro sangue árabe sobre os parâmetros reprodutivos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.369-371, 2001.
- ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B.W.; Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic ester. **Biochemistry**, v.55, p.134-41, 1966.
- RUIZ-PESINI, E.; ALVAREZ, E; ENRÍQUEZ, J.A.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J.; Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. **International Journal of Andrology**, v.24, n.6, p.335-40, 2001.

Referências Bibliográficas

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R. et al.; Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitina acetyltransferase activity in young Maremmno stallions. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.233-45, 2000.

SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E; Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. **The Physiology of Reproduction**, v.1, p.1063-75, 1994.

SNYDER, J.W.; KYLE, M.E.; FERRARO, T.N.; L-carnitine delays the killing of culture hepatocytes by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.276, p.132-8, 1990.

SOUFIR, J.C.; MARSON, J.; JOUANNET, P.; Free L-carnitine in human seminal plasma. **International Journal of Andrology**, v.4, n.3, p.388-97, 1981.

SOUZA, D.B.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; Study of two methods of collect the ram semen (Artificial vagina and eletroejaculation) being used conventional and computerized analysis (HTMA-IVOS-10). In: **26th WORLD VETERINARY CONGRESS**, 1999, Lion, France.

TRIMECHE, A.; YVON,J.M.; VIDAMENT,M.; PALMER,E.; MAGISTRINI, M.; Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-93, 1999.

VAAGENES, H.; MADSEN, L.; ASIEDU, D.K.; LILLEHAUG, J.R.; BERGE, R.K.; Early modulation of genes encoding peroximal and mitochondrial β -oxidation enzymes by 3-thia fatty acids. **Biochemical and Pharmacology**, v.56, p.1571-82,1998.

VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSIN, L.; Use of computadorized system for evaluation of equine spermatozoa motility. **Animal Journal of Veterinary Research**, v.52, p.224, 1991.

YI, Q.; KUIWU, T.; DANTONG, Y. *et al.*; The changes of Carnitine content in seminal plasma after reversible injection occlusion of vas deferens. **Contraception**, v.51, p.261-63. 1995.

ZEYNER, A.; HARMEYER, J.; Metabolic functions of L-carnitine and its effects as feed additive in horses. A review. **Arch Tierernahr**, v. 52, p. 115-38, 1999.

Referências Bibliográficas

ZÖPFGEN, A.; PRIEM, F.; SUDHOFF, F.; JUNG, K.; LENK, S.; LOENING, S.A.; SINHA, P.; Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitina, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 840-45, 2000.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; PAPA, F.O.; Utilização do método de fluorescência para a avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozóide eqüino. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 11, 1995, Belo Horizonte, MG, Anais CBRA, p.293, Resumo.

7. APÊNDICE

7. APÊNDICE:-**FÓRMULAS****DILUIDOR DE KENNEY (KENNEY *et al.*, 1975)**

Para 100 ml:-

Glicose	4,9g
Leite Desnatado	2,4g
Bicarbonato de Sódio	0,15g
Água Bidestilada, (q.s.p.)	100 ml

DILUIDOR EDTA-LACTOSE-GEMA DE OVO (MARTIN *et al.*, 1979)

Lactose 11%	50,0 ml
Diluidor EDTA*	24,0 ml
Gema de Ovo	20 ml
Penicilina G	100.000 UI (0,07g)
<i>Orvus est Paste</i> (Equex STM)	0,8 ml
Glicerol	5,0 ml
Água Bidestilada (q.s.p.)	100 ml

* Diluidor EDTA

Glicose Monohidratada	6,0g
Citrato de Sódio	0,375g
EDTA (etileno diamino tetracetato dissódico)	0,370g
Bicarbonato de Sódio	0,120g
Água Bidestilada (q.s.p.)	100,0 ml