

Título: Efeito de diferentes crioprotetores penetrantes na congelabilidade do sêmen caprino criopreservado em diluidor à base de lecitina de soja.

Resumo: Este estudo teve por objetivo investigar o efeito da suplementação do diluidor à base de lecitina de soja com diferentes crioprotetores penetrantes na qualidade espermática e potencial fertilizante in vitro do sêmen caprino criopreservado. No primeiro experimento, o sêmen de três bodes Saanen (17 ejaculados) foi individualmente diluído em Tris-lecitina de soja (LS) suplementado com crioprotetores penetrantes na concentração de 5%, obtendo-se os seguintes grupos amostrais: glicerol (GLI; controle), dimetilformamida (DMF), etilenoglicol (EG) ou dimetilsulfóxido (DMSO). Após a diluição (200×10^6 espermatozoides/mL), as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e congeladas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para cada bode, duas palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s) e agrupadas para análise in vitro da cinética espermática, através do CASA; e da integridade de membrana plasmática (IMP), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridade de acrossoma (IAC), através de microscopia de epifluorescência. Após a formação do pool, as amostras foram incubadas em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e analisadas após 15 min (T0) e 2 horas (T2) de incubação. DMF proporcionou melhores resultados de cinética espermática que os demais crioprotetores avaliados, sendo os mais baixos valores obtidos para EG e DMSO ($P < 0,05$). A IMP e PMM não diferiram entre GLI e DMF ($P > 0,05$), mas foram reduzidas nos grupos EG e DMSO. Durante a incubação, a IAC foi superior ($P < 0,05$) no grupo DMF quando comparado ao GLI. Além disso, após duas horas de incubação, IAC foi maior no grupo DMSO em relação ao GLI e EG ($P < 0,05$). Baseado nestes resultados, amostras dos grupos GLI e DMF foram utilizadas para investigar o potencial fertilizante através do ensaio de fertilização in vitro (FIV) heteróloga utilizando oócitos bovinos ($n = 337$) oriundos de abatedouro. Não foram observadas diferenças entre GLI e DMF ($P > 0,05$) quanto à taxa de estruturas não fertilizadas (38,8% vs. 25,33%, respectivamente), taxa de prováveis zigotos (25,68% vs. 27,92%, respectivamente) e taxa de clivagem (35,52% vs. 46,27%, respectivamente). Com base nestes resultados, concluímos que DMF foi capaz de preservar os parâmetros de qualidade espermática melhor que o GLI, EG e DMSO, sendo o crioprotetor de escolha para criopreservar o sêmen caprino em diluidor à base de lecitina de soja. No segundo experimento, o efeito de um diluidor de descongelação adicionado ou não de L-carnitina foi investigado. Para tanto, ejaculados de três bodes Saanen foram individualmente congelados em Tris-LS + 5% DMF. Após a descongelação, para cada animal, duas palhetas foram agrupadas e diluídas em TALP suplementado ou não com 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM de L-carnitina (LC). Ao todo, cinco pools de sêmen foram processados. As amostras foram incubadas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 30 (T0) e 90 (T1) minutos pós-descongelação e avaliadas quanto a cinética espermática, IMP, PMM e IAC. Não foram observadas diferenças entre as amostras descongeladas e tratadas ou não com LC ($P > 0,05$). Contudo, a motilidade total e a velocidade curvilínea das amostras tratadas com 1,0 mM de LC foram reduzidas no T1 em relação ao T0 ($P < 0,05$). Por outro lado, o

número de células apresentando alto potencial mitocondrial aumentou com o decorrer do tempo de incubação ($P < 0,05$) para os grupos controle e 1,0 mM de LC. Baseado nos resultados do presente estudo, conclui-se que DMF preserva a cinética espermática e a IAC, sem alterar a potencial capacidade fertilizante *in vitro* do sêmen caprino congelado-descongelado em Tris-LS, no entanto, a diluição e suplementação pós-descongelação com L-carnitina não melhora a qualidade seminal.

Palavras-chave: glicerol; dimetilsulfóxido; L-carnitina; criopreservação; fertilização *in vitro*.