



STENIA SEVERO RABELO

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E
VITAMINA E AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO
PROCESSADO OU NÃO COM PERCOLL**

LAVRAS-MG

2016

STENIA SEVERO RABELO

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E VITAMINA E AO SÊMEN
SUÍNO RESFRIADO PROCESSADO OU NÃO COM PERCOLL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Orientador

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Coorientador

LAVRAS-MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rabelo, Stenia Severo.

Adição de ácido clorogênico e vitamina e ao sêmen suíno resfriado processado ou não com Percoll / Stenia Severo Rabelo. – Lavras: UFLA, 2016.

59 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.

Bibliografia.

1.Antioxidante. 2.Seleção espermática. 3.Espécies reativas ao oxigênio. 4.Ácido clorogênico. 5.Vitamina E. I. Universidade Federal de Lavras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

STENIA SEVERO RABELO

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E VITAMINA E AO SÊMEN
SUÍNO RESFRIADO PROCESSADO OU NÃO COM PERCOLL**

***ADDITION OF CHLOROGENIC ACID AND VITAMIN E TO COOLED
SWINE SEMEN, PROCESSED OR NOT WITH PERCOLL***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Prof. Dr. Luciano José Pereira UFLA

Prof. Dr. Juliano Vogas Peixoto UFLA

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

LAVRAS-MG

2016

*A Deus, por sempre me dar forças em todos os momentos,
Aos meus pais, Wilson e Marilda, pelo amor incondicional e o incentivo,
À minha irmã Maysa por sempre estar ao meu lado,
À minha avó Divina, sei que estará sempre me protegendo,
Pela minha família, que amo tanto,
A vocês, ofereço e dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por ter me dado forças para continuar a cada dia, superando as dificuldades desta jornada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, pela ajuda, carinho e companheirismo, além de todos os aprendizados a mim fornecidos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pela oportunidade, o incentivo e a atenção.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, por me apoiar e auxiliar na condução dos trabalhos.

Ao Grupo GETESE, pela amizade e companheirismo, além de ajuda com conhecimentos adquiridos.

Aos meus pais Wilson e Marilda, pela vida, eu dedico essa vitória a vocês.

À minha irmã Maysa, pelos conselhos e amor. Você é para sempre na minha vida.

Aos amigos de Patos de Minas e Lavras, pelo amor e companheirismo, em especial às meninas da pós-graduação e a Ana Paula Castro. Juntas fomos mais fortes.

Às famílias Severo e Rabelo pelo apoio sempre.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa história comigo.

RESUMO GERAL

O Percoll é uma substância utilizada para selecionar subpopulações espermáticas com melhores características morfológicas. Porém, efeitos negativos podem ocorrer devido à ação de espécies reativas de oxigênio nesse procedimento, prejudicando a qualidade do sêmen resfriado. Dessa forma, objetivou-se verificar se a adição de vitamina E (tocoferol) ou ácido clorogênico aos meios de diluição melhoram a qualidade do sêmen suíno resfriado e processado em Percoll. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (ejaculados) em esquema fatorial 2x3 (com ou sem Percoll e três sistemas antioxidantes: controle - sem adição -, ácido clorogênico e vitamina E), totalizando os seis tratamentos e 12 repetições de um ejaculado cada. O ácido clorogênico e a vitamina E foram adicionados nas doses de 4,5 mg/ml e 400 µg/ml de diluidor, respectivamente. Às 0, 48 e 72 horas de armazenamento a 15 °C, as doses inseminantes de 80 mL contendo 2,0 bilhões de espermatozoides foram submetidas ao protocolo de centrifugação com Percoll e então avaliadas. O uso do Percoll prejudicou ($P < 0,01$) todos os padrões de motilidade, porém, reduziu ($P < 0,01$) o total de alterações espermáticas em todos os tempos de armazenamento do sêmen. Tanto a vitamina E quanto o ácido clorogênico melhoraram ($P < 0,05$) a motilidade total após o processamento com Percoll, mas somente no sêmen armazenado por 48 horas. O mesmo efeito não foi observado ($P > 0,05$) quando o sêmen foi armazenado por 72 horas. O ácido clorogênico melhorou ($P < 0,05$) a motilidade total do sêmen armazenado por 72 horas, mas esse efeito não foi observado ($P > 0,05$) quando o sêmen foi processado em Percoll. Os antioxidantes não influenciaram ($P > 0,05$) a viabilidade e a integridade de acrossoma, porém, o ácido clorogênico reduziu ($P < 0,05$) o total de alterações morfológicas do sêmen fresco (0 horas), enquanto que a vitamina E aumentou o número de células anormais no sêmen armazenado por 72 horas, independente do uso do Percoll. Não houve efeito ($P < 0,05$) dos antioxidantes e do Percoll na concentração de malondialdeído no plasma seminal. O uso do Percoll não influenciou ($P > 0,05$) o efluxo de colesterol no sêmen, porém, o ácido clorogênico aumentou o efluxo no sêmen fresco processado em Percoll e reduziu esse efluxo no sêmen armazenado por 72 horas não processado com Percoll. Conclui-se que a adição de ácido clorogênico e vitamina E ao meio diluidor melhora a qualidade do sêmen suíno independente do uso da técnica de seleção espermática em Percoll. Entretanto, os benefícios não são suficientes para manter a qualidade seminal após o uso dessa técnica.

Palavras-chave: Antioxidantes. Malondialdeído. Reprodução. Seleção espermática. Varrão.

GENERAL ABSTRACT

Percoll is a substance used to select spermatic sub-populations with better morphologic traits. However, negative effects can occur due to the action of reactive oxygen species, impairing the quality of the cooled semen. Thus, we aimed at verifying if the addition of vitamin E (tocopherol) or chlorogenic acid to the dilution mediums improves the quality of cooled swine semen processed in Percoll. The experimental design was in randomized blocks (ejaculates) in a 2x3 factorial scheme (with and without Percoll and in three antioxidant systems: control – no addition, chlorogenic acid and Vitamin E), totalizing six treatments and 12 replicates of each ejaculate. The chlorogenic acid and Vitamin E were added in the doses of 4.5 mg/mL and 400 µg/ml of dilutor, respectively. At 0, 48 and 72 hours of storage and 15°C, the inseminating doses of 80 mL, containing 2.0 billion spermatozoa, were submitted to centrifuge protocol with Percoll for later evaluation. The use of Percoll impaired ($P < 0.01$) all motility standards, however, reduced ($P < 0.01$) total spermatic change in all storage periods. Both Vitamin E and chlorogenic acid improved ($P < 0.05$) total motility after processing with Percoll, but only for the semen stored for 48 hours. The same effect was not verified ($P > 0.05$) when the semen was stored for 72 hours. The chlorogenic acid improved ($P < 0.05$) total motility for semen stored for 72 hours, but this effect was not verified ($P > 0.05$) when the semen was processed in Percoll. The antioxidants did not influence ($P > 0.05$) the feasibility and integrity of the acrosome, however, chlorogenic acid reduced ($P < 0.05$) the total of morphologic changes to the fresh semen (0 hours), while Vitamin E increased the number of abnormal cells in the semen stored for 72 hours, regardless of the use of Percoll. There was no effect ($P < 0.05$) of the antioxidants and Percoll over the concentration of malondialdehyde in the seminal plasma. The use of Percoll did not influence ($P > 0.05$) the efflux of cholesterol in the semen, however, the chlorogenic acid increase the efflux in the fresh semen processed in Percoll and reduced this efflux in the semen stored for 72 hours not processed with Percoll. In conclusion, the addition of chlorogenic acid and Vitamin E to the dilutor medium improves the quality of the swine semen regardless of the use of the spermatic selection technique in Percoll. However, the benefits are not sufficient to maintain seminal quality after using the technique.

Keywords: Antioxidants. Malondealdehyde. Reproduction. Spermatic selection. Boar.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Representação do procedimento para a centrifugação do sêmen em Percoll com diferentes densidades..... 16
- Figura 2 - Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico.....21
- Figura 3 - Estrutura química dos isômeros com atividade biológica da vitamina E.23

SEGUNDA PARTE

- Figura 1. Efeito do ácido clorogênico (AC) e vitamina E (VE), com ou sem uso do Percoll, sobre a motilidade total do sêmen suíno em diferentes tempos de armazenamento. ^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).....58
- Figura 2. Efeito do ácido clorogênico (AC) e vitamina E (VE), com ou sem uso do Percoll, sobre a concentração de colesterol total no plasma seminal suíno em diferentes tempos de armazenamento. ^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).....58

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

- Tabela 1. Padrões de motilidade do sêmen suíno armazenado a 15 °C após a adição de ácido clorogênico (AC) (4,5 mg/ml de sêmen) ou vitamina E (VE) (400 µg/ml de sêmen), com ou sem o uso de Percoll.....55
- Tabela 2. Viabilidade espermática, integridade de acrossoma e total de alterações morfológicas no sêmen suíno armazenado a 15 °C após adição de ácido clorogênico ou vitamina E, com ou sem o uso de Percoll.56
- Tabela 3. Efeito do ácido clorogênico e vitamina E e a utilização do Percoll sobre a concentração de MDA (µM) no plasma seminal suíno, nos diferentes tempos de armazenamentos, a 15 °C.57

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Técnicas de seleção espermática	13
2.2 Percoll.....	14
2.3 Espécies reativas de oxigênio e a célula espermática	18
2.4 Espécies reativas de oxigênio e a capacitação espermática	19
2.5 Ácido clorogênico	20
2.6 Vitamina E.....	22
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS.....	29
SEGUNDA PARTE - ARTIGO.....	39
ARTIGO 1 - ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E VITAMINA E AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO PROCESSADO OU NÃO COM PERCOLL	39

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A seleção de espermatozoides viáveis é de extrema importância para fertilização tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, métodos laboratoriais de seleção de células com melhor integridade e, conseqüentemente, da função espermática são de grande relevância. Dentre as técnicas disponíveis na atualidade, o gradiente de centrifugação em Percoll é o método mais utilizado na espécie suína, podendo ser aplicado no sêmen fresco, resfriado ou congelado. No entanto, as técnicas desenvolvidas até o momento não são totalmente eficazes, pois a integridade dos espermatozoides selecionados pode ser afetada durante o procedimento de seleção. Com a aplicação de força de centrifugação, ocorre a liberação de substâncias não desejáveis, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem afetar diretamente a qualidade e a funcionalidade dos espermatozoides selecionados.

Sabe-se que a integridade da membrana espermática é essencial para o processo de fertilização. Alterações como perda da fluidez da membrana podem reduzir a motilidade, diminuir a capacidade de penetração no oócito e aumentar a permeabilidade da membrana. A ação de ERO sobre a membrana plasmática prejudica o metabolismo espermático, e assim é necessário o desenvolvimento de técnicas que melhorem o potencial antioxidante do sêmen para que permitam um eficiente combate aos radicais livres produzidos durante o processamento com Percoll.

A adição de substâncias antioxidantes tem sido efetiva na prevenção dos danos oxidativos provocados pelas ERO. Nesse sentido, a vitamina E é um importante oxidante de membrana, sendo um dos principais agentes protetores contra peroxidação lipídica e conseqüente morte celular. Já o ácido clorogênico

é uma substância hidrossolúvel e está presente na bebida do café. É um composto fenólico que tem a capacidade de neutralizar a ação de radicais livres no organismo. A atividade antioxidante desse composto é decorrente de suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres. Assim, a adição dessas substâncias ao sêmen suíno processado com Percoll poderia resultar em subpopulações de espermatozoides de melhor qualidade para serem utilizadas tanto na inseminação artificial (IA) quanto na fertilização *in vitro* (FIV).

Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de ácido clorogênico e da vitamina E ao sêmen suíno resfriado e processado com Percoll.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Técnicas de seleção espermática

O sêmen suíno é composto por uma população heterogênea de espermatozoides com diferentes graus estruturais e funcionais (HOLT, 2009). A seleção fisiológica de espermatozoides durante a monta natural ocorre por vários mecanismos no trato reprodutivo da fêmea (DRUART, 2012). Após a ejaculação, milhões de espermatozoides são depositados na vagina e passam ao longo do trato genital da fêmea até chegarem ao local da fertilização. O processo de seleção se inicia no colo do útero, continua através dos cornos uterinos e termina no oviduto. Esse processo é importante para selecionar somente os espermatozoides funcionalmente normais, capazes de chegar e fertilizar o ovócito (SUAREZ, 2007).

Em técnicas de reprodução assistida, biotecnologias são utilizadas na tentativa de mimetizar a seleção espermática que ocorre fisiologicamente no trato reprodutivo da fêmea. Várias estratégias *in vitro* têm sido desenvolvidas para selecionar espermatozoides de melhor qualidade no ejaculado (MORRELL; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2009). De uma forma geral, os métodos selecionam espermatozoides pela integridade da membrana, motilidade ou densidade. De acordo com Henkel e Schill (2003), a técnica de separação de espermatozoides ideal deve ser rápida, fácil e de baixo custo; isolar espermatozoides móveis o máximo possível; não causar danos ou alterações fisiológicas nas células selecionadas; eliminar espermatozoides mortos e outras células como leucócitos e bactérias; eliminar as substâncias tóxicas ou bioativas, como ERO e ainda permitir o processamento de grandes volumes do ejaculado.

Existem diversos métodos de seleção espermática, como lavagem por centrifugação, filtração em coluna de gel Sephadex, o *swim up* e a utilização de

gradientes descontínuos de densidade, como o Percoll. Essas técnicas são utilizadas para selecionar uma população espermática que possua maior número de células móveis e morfológicamente normais (HALLAP et al., 2004). Na tentativa de melhorar a qualidade de ejaculados e também otimizar a fertilização *in vitro*, o Percoll tem sido o mais utilizado na espécie suína, pois possibilita selecionar espermatozoides com morfologia normal e melhor integridade do núcleo (MORRELL, 2006).

Esse procedimento tem resultado em melhores taxas de fertilização e subsequente desenvolvimento do embrião *in vitro* (GRANT; LONG; PARKINSON, 1994; JEONG; YANG, 2001; SUZUKI; NAGAI, 2003). Entretanto, apesar do progresso das tecnologias de reprodução assistida, as técnicas para seleção dos espermatozoides ainda são insuficientes, necessitando de mais estudos para identificar o melhor espermatozoide para fertilização (MCDOWELL et al., 2014).

2.2 Percoll

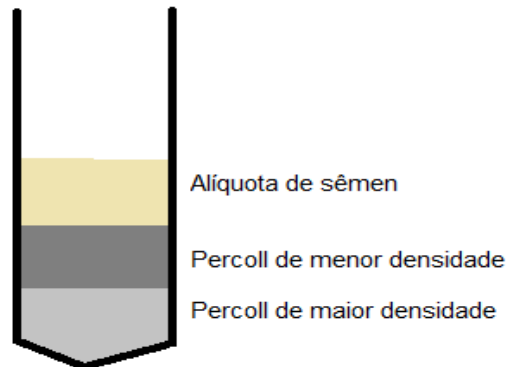
O Percoll é um meio utilizado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares (MORRELL, 2006). A solução estéril é composta por sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona (SAMARDZIJA et al., 2006).

O primeiro registro da utilização do Percoll foi em 1977, pelo cientista sueco Håkan Pertoft, o qual foi o inventor dessa substância (PERTOFT et al., 1977). Nesse estudo realizado na Universidade de Uppsala, a toxicidade do Percoll foi estudada em culturas de células do fígado em ratos, de testículos de bezerros e de células do rim de suínos. Esse pesquisador concluiu que o Percoll selecionou células viáveis. No ano seguinte, Schumacher et al. (1978) isolaram células de Leydig de ratos por centrifugação em gradientes de Percoll e

obtiveram como resultado uma retenção de células com maior integridade morfológica e bioquímica. Desde então, separação de células utilizando o Percoll foi incluída em protocolos de reprodução assistida. Em 1999, o uso do Percoll foi proibido na utilização em reprodução humana assistida, pois foi relatado efeito tóxico dessa solução aos espermatozoides (MAKKAR et al., 1999). Atualmente, em animais, a técnica de gradientes de Percoll é muito utilizada nos laboratórios (HENNING; NGO; WABERSKI, 2015).

Durante a técnica de processamento com Percoll, o gradiente descontínuo de densidade é preparado depositando as diferentes camadas de densidades (FIGURA 1) em um tubo de ensaio. A preparação do gradiente de densidade mais utilizada em experimentos é realizada na proporção de 45 e de 90% de Percoll (MATÁS et al., 2003). As amostras de sêmen são então depositadas sobre o gradiente e centrifugadas. No processo de centrifugação, as células se movem para o local no gradiente correspondente à sua própria densidade, chamado de ponto isopícnico (MORTIMER, 1991). No gradiente de maior densidade, ao fundo do tubo de ensaio, forma-se um *pellet* com as células espermáticas que apresentam uma boa morfologia. Espermatozoides imaturos, com anormalidades na estrutura e com DNA danificado, assim como células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, são retidos nas camadas superiores do gradiente (SAKKAS et al., 2000).

Figura 1 - Representação do procedimento para a centrifugação do sêmen em Percoll com diferentes densidades.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

O objetivo principal da técnica é selecionar subpopulações espermáticas com melhores características morfológicas. Oliveira et al.(2011) sugerem que a centrifugação em gradiente de Percoll reduz o número de células alteradas no sêmen bovino. Já na espécie suína, o procedimento de centrifugação de sêmen congelado em Percoll isolou células espermáticas com um bom estado morfológico (NOGUCHI et al., 2015). Isso ocorre, em razão da seleção de espermatozoides de acordo com a densidade, que está relacionada com seu estado de maturação ou integridade. Sabe-se que o processo de maturação espermática envolve intensas alterações morfológicas e bioquímicas. Tais mudanças alteram a estrutura nuclear e a membrana dos espermatozoides (KHOSRO; BEYGI; ZARGHAMI, 2007), afetando assim suas densidades. As células espermáticas com boa maturação e morfologia nuclear são mais densas e são depositadas na área de maior densidade do gradiente de Percoll (LE LANNOU; BLANCHARD, 1988).

Sabe-se que a estrutura e funcionalidade do núcleo do espermatozoide são de grande importância para a subsequente fertilização (AMANN; PICKETT, 1987; OURA; TOSHIMORI, 1990). Em suínos, a integridade da cromatina está diretamente relacionada com a fertilidade (EVENSON, 1999). Assim, células selecionadas com melhor integridade nuclear pelo procedimento com o Percoll, podem ter maior capacidade fertilizante (GRANT; LONG; PARKINSON, 1994; JEON; YANG, 2001; MÁTAS et al., 2003). Porém, essa substância também pode apresentar efeitos tóxicos à célula espermática, já que danos aos espermatozoides selecionados e ao embrião têm sido relatados (DE VOS et al., 1997; GARCÍA-ROSELLÓ et al., 2006; REN et al., 2004). Acredita-se que a toxicidade do Percoll esteja relacionada à polivinilpirrolidona (PVP) encontrada na sua composição (KATO; NAGAO, 2009).

Embora o gradiente de Percoll tenha o potencial para isolar e aumentar a concentração de células móveis e viáveis, a força de centrifugação apresenta um fator de estresse para organelas e membranas celulares, uma vez que gera um aumento nos níveis de ERO, em razão da lesão física dos espermatozoides (MORTIMER, 1991), predispondo as células a danos irreversíveis e comprometimento das taxas de fertilização (SILVA et al., 2007). Segundo Guimarães et al. (2014), a força de centrifugação com Percoll aumentou a produção de ERO e reduziu os parâmetros de qualidade do espermatozoide de bovinos, como vigor e motilidade. Essa redução de qualidade pode estar relacionada não só ao aumento das ERO, mas também à menor capacidade antioxidante total da célula espermática (SIKKA, 2001).

Nesse sentido, embora o gradiente de Percoll seja eficaz na seleção de melhores espermatozoides e com acrossoma íntegro, os danos oxidativos causados às células espermáticas decorrentes do procedimento de centrifugação podem representar um problema, resultando na seleção de subpopulações espermáticas de baixa qualidade.

2.3 Espécies reativas de oxigênio e a célula espermática

Radicais livres são substâncias químicas que apresentam número ímpar de elétrons, sendo assim muito instáveis e altamente energéticos (ARAÚJO, 2006). Para se tornarem estáveis, os radicais livres transferem a energia acumulada para as substâncias próximas a eles, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). As ERO, como o ânion superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), óxido nítrico (NO) ou peroxinitrito (ONOO) constituem classes dessas substâncias (BATHGATE, 2011). A estrutura especializada dos espermatozoides e sua membrana plasmática rica em PUFA, o grande número de mitocôndrias, pequena quantidade de citoplasma e baixa capacidade antioxidante tornam essas células vulneráveis aos danos causados pelos radicais livres (BOLLWEIN; FUCHS, I.; KOESS, 2008).

A produção de ERO em quantidades fisiológicas desempenham um importante papel durante a capacitação espermática, reação acrossômica e ligação do espermatozoide à zona pelúcida (AGARWAL et al., 2006). Porém, quando há uma exposição às altas concentrações de ERO, há uma redução da capacidade fecundante do sêmen. Uma das manifestações primárias decorrentes de danos aos espermatozoides compreende o rompimento de ligações carbono-hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados e do colesterol, levando à formação de radicais livres (SHARMA; AGARWAL, 1996). Esse processo acarreta em alterações na estrutura e permeabilidade da membrana, perda da seletividade iônica e liberação do conteúdo das organelas, reduzindo a motilidade e podendo levar à morte celular (AITKEN, 1995).

Segundo Lamirande e Gagnon (1992), a redução da motilidade na presença de elevados níveis de ERO é provocada não só pela instabilidade da membrana plasmática, mas também em decorrência da redução dos níveis intracelulares de ATP, por meio da inibição da fosforilação oxidativa e/ou da

glicólise. Essa ação inibitória ocorre, em razão das ERO atuarem na enzima gliceraldeído-3-fosfato sintetase, que é um intermediário da glicólise, limitando assim o reabastecimento de energia (WESTHOFF; KAMP, 1997).

2.4 Espécies reativas de oxigênio e a capacitação espermática

As ERO, por muito tempo, foram indicadas como agentes tóxicos para os espermatozoides, entretanto segundo Baldi et al. (2002), essas moléculas quando presentes em baixa quantidade, estariam também envolvidas em algumas funções fisiológicas como, por exemplo, a capacitação espermática. A capacitação do espermatozoide é o processo que apresenta uma série de modificações estruturais e funcionais do espermatozoide a fim de torná-lo apto para a fertilização (ROLDAN; GOMENDIO, 1992).

Os eventos que fazem parte do processo de capacitação são basicamente ativação dos canais iônicos, influxo de cálcio, aumento da fluidez da membrana com o efluxo de colesterol, remoção dos fatores de capacitantes das membranas, produção de ERO, exteriorização de receptores, aumento do pH intracelular e AMP cíclico, fosforilação de diversas proteínas, migração das proteínas de membrana e hiperativação da motilidade (SIGNORELLI; DIAS; MORALES, 2012).

Estudos têm sugerido que as ERO estão envolvidas em um dos primeiros eventos da capacitação espermática (GANGWAR; ATREJA, 2015; NAZ; RAJESH, 2004; VISCONTI et al., 1998; VISCONTI; KOPF, 1998), por estimular a cascata de sinalização de fosforilação da tirosina e desativar enzimas fosfatases, por meio da ativação da adenilato ciclase solúvel, aumentando assim o AMPc intracelular e, conseqüentemente, ativando proteínas quinases envolvidas na capacitação (GANGWAR; ATREJA, 2015). O' Flaherty, Lamirande e Gagnon (2006) observaram que a adição de ERO, no meio de

incubação espermática, aumentou as taxas de fosforilação dos resíduos de tirosina. Além disso, a adição de inibidores da NADPH-oxidase, um complexo enzimático que gera superóxido no meio intracelular, diminuía fosforilação de tirosina em espermatozoides.

Contudo, as ERO não têm efeito desejável na capacitação espermática quando a mesma ocorre de forma antecipada. Durante o processamento do sêmen com o Percoll, ocorre aumento da formação de ERO, e isso pode induzir uma capacitação prematura, reduzindo a viabilidade dos espermatozoides no processo de fertilização (WATSON, 1995). Logo, antioxidantes são os principais fatores de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelos radicais livres, no intuito de prevenir efeitos indesejáveis na manipulação do sêmen (SILVA et al., 2011).

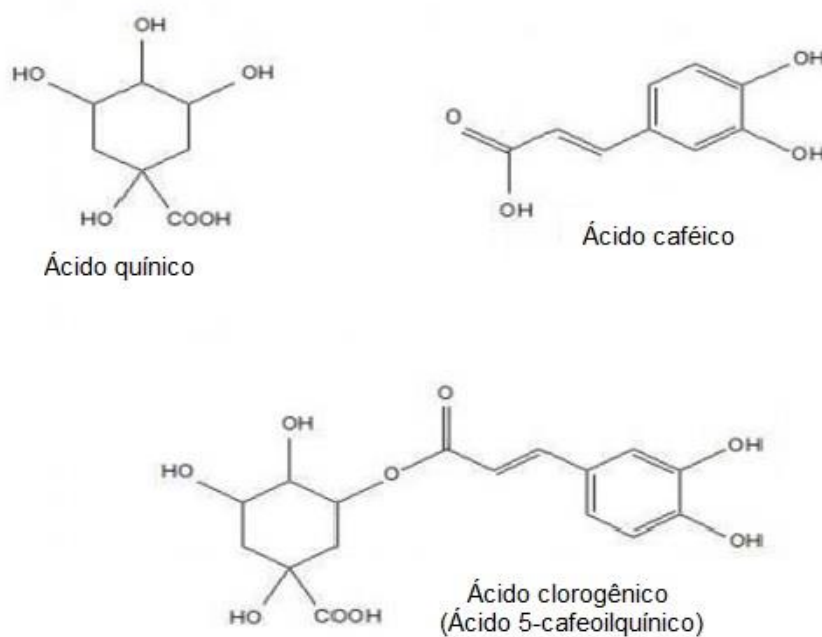
2.5 Ácido clorogênico

Ácidos clorogênicos pertencem a uma família de ésteres formados por ácidos hidroxinâmicos e o ácido quínico (NARDINI, 2002). Esse último, junto ao ácido caféico, forma um éster chamado ácido clorogênico (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001) que é um polifenol. Esse ácido é um composto químico natural encontrado em folhas e sementes de inúmeras plantas.

O primeiro relato sobre a utilização de ácido clorogênico foi realizado por Robiquet e Boutron (1837), mas o termo propriamente dito foi utilizado pela primeira vez por Payen (1846), que designou esse nome a um composto fenólico com função ácida e estrutura química desconhecida, que conferia cor verde em meio levemente alcalino quando exposto ao ar (CLIFFORD, 1999). Em 1907, essa substância foi isolada na forma de um complexo cristalino, mas teve sua estrutura estabelecida em 1932 por Fisher (MARIA; MOREIRA, 2004). Esse pesquisador concluiu que o ácido clorogênico consistia da união do ácido

cafeico com o ácido quínico, formando o composto ácido 5-cafeoilquínico (FIGURA 2).

Figura 2 - Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico.



Estudos recentes têm demonstrado que o ácido clorogênico apresenta diversas atividades farmacológicas incluindo efeitos anti-inflamatórios, anti-hipertensivos e de propriedades protetoras do miocárdio (HWANG et al., 2014; KANNO et al., 2013). Estudos mostraram também que esse composto pode atenuar o metabolismo da glicose e de lipídeos ao final da diabetes em ratos e humanos e também amenizar a fibrose renal (JIN et al., 2015; LEE et al., 2016). Também tem sido relatado que o ácido clorogênico possui efeito antidiabético notavelmente eficaz e proteção dos rins em ratos (NISHI; KUMAR, 2013). Além disso, outros estudos também têm sugerido que esse ácido é um

antioxidante polifenólico muito potente (BONITA et al., 2007; HOELZL et al., 2010; KONO et al., 1997).

Wittayarat et al. (2013) estudaram o efeito de diferentes doses de polifenóis derivados do chá verde sobre a qualidade do sêmen canino armazenado a 5 °C por quatro semanas e observaram que a suplementação exógena com esses antioxidantes aumentou a viabilidade e a motilidade espermática. Esses autores atribuíram esse resultado à ação de transformar o radical livre em outro menos reativo, reduzindo assim a presença de radicais livres no meio de conservação.

Apesar desse resultado satisfatório, atribuído a esse polifenol em cães, trabalhos que avaliaram o efeito da adição dessa substância sobre os parâmetros seminais do sêmen resfriado de suíno (MARTIN-HIDALGO et al., 2013) e descongelado de ovino (SILVA et al., 2012) indicam que essa substância reduz o potencial de membrana mitocondrial e a quantidade intracelular de ATP das células espermáticas. No entanto, Pereira et al. (2014) constatou que a adição de 4500 µg/mL de ácido clorogênico, durante o processamento de doses inseminantes de suínos diluídos em BTS foi viável para garantir melhor qualidade seminal por até 72 horas de armazenamento a 15°C.

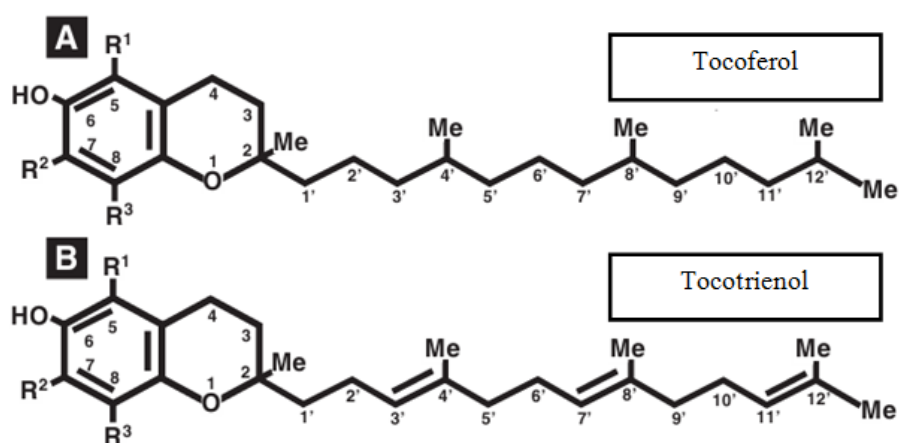
Embora haja evidências que a adição de ácido clorogênico ao meio de conservação seminal possa trazer benefícios à qualidade espermática, os resultados podem estar relacionados à espécie, à concentração dessa substância, da quantidade de radicais livres presentes no meio e do estado funcional e metabólico da célula espermática.

2.6 Vitamina E

A vitamina E é uma substância lipossolúvel e apresenta diversas funções biológicas. O principal papel biológico do tocoferol é a sua capacidade de

proteger um organismo contra os efeitos nocivos dos radicais livres, impedindo a propagação das reações em cadeia nas membranas biológicas (JEONG et al., 2009). Além disso, a vitamina E melhora a imunidade, tem propriedades antiangiogênicas, inibe a atividade da proteína quinase C, adesão celular e proliferação celular (BRIGELIUS-FLOHE et al., 2002). Na natureza, oito substâncias têm sido encontradas com atividade da vitamina E: alfa, beta, gamma e delta- tocoferol e alfa, beta, gamma e delta- tocotrienol (FIGURA 3) (SEN; KHANNA; ROY, 2006), sendo alfa tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma (RILEY, 1994).

Figura 3 - Estrutura química dos isômeros com atividade biológica da vitamina E.



(Fonte: SEN; KHANNA; ROY, 2006).

O alfa-tocoferol é o principal agente antioxidante presente na membrana plasmática, protegendo contra a peroxidação lipídica sem influenciar diretamente na geração de ERO (JEONG et al., 2009; SHARMA; AGARWAL, 1996). A vitamina E pode proteger células contra os danos oxidativos, tanto *in*

vivo como *in vitro* (WU et al., 1990). A adição de alfa tocoferol em sêmen de várias espécies de mamíferos, como coelhos (CASTELLINI et al., 2002), equinos (ALMEIDA & BALL, 2005), suínos (MENDEZ et al., 2013) e ovinos (TSANTARLOTOU et al., 2002), visando a melhorar a qualidade seminal, levou a resultados eficientes. Na administração em seres humanos por via oral, esse antioxidante melhorou a taxa de fertilização *in vitro* e pode ser utilizado como um tratamento de infertilidade masculina causada pelas ERO (GEVA et al., 1996).

Em estudos mais recentes, a adição de vitamina E combinada com vitamina C no sêmen preservou os parâmetros de sobrevivência e melhor qualidade de refrigeração de espermatozoides de ovinos (AZAWI; HUSSEIN, 2013). Em outro estudo sobre os efeitos da vitamina E no sêmen de carneiros, a adição dessa substância melhorou a motilidade progressiva e a viabilidade de espermatozoides, tanto antes como após a criopreservação (AMINIPOUR; TAHMASBI; NASERIAN, 2013).

Entretanto, os efeitos do alfa tocoferol dependem de sua concentração no sêmen. Em humanos, altas concentrações desse composto podem atuar como um estimulador de oxidação, não agindo então como agente antioxidante (MINAEI et al., 2012). Segundo Cao e Cutler (1993), a quantidade elevada de vitamina E diminui a capacidade de adsorção do radical hidroxila, e o mecanismo envolvido na redução da capacidade oxidante da vitamina E pode estar relacionada com a sua reação com outros radicais de oxigênio, produzidos na presença de H₂O₂ e íons cobre. Assim, essa reação pode levar à formação de radicais adicionais e aumentar os danos causados na célula.

Na espécie suína, a inclusão de alfa tocoferol no diluidor de congelamento produziu uma melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelamento, em razão da redução dos danos oxidativos à célula (BREININGER et al., 2005), diminuindo células em estado de capacitação

(SATORRE et al., 2007) e reduzindo da expressão dos genes apoptóticos, levando a uma diminuição da fragmentação do DNA (JEONG et al., 2009). Assim, concentrações ideais desse antioxidante podem melhorar os parâmetros seminais e, conseqüentemente, elevar a qualidade seminal dos ejaculados.

Na literatura, não há estudos que avaliam o efeito de antioxidantes sobre o sêmen suíno resfriado processado com Percoll. Portanto, a associação do uso de uma metodologia de seleção espermática junto com antioxidantes torna-se importante para reduzir a quantidade de ERO no meio, reduzindo assim, a ocorrência dos danos oxidativos. Então, em razão da capacidade antioxidante do ácido clorogênico (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996) e da vitamina E (MENDEZ et al., 2013) a utilização desses compostos com a aplicação do Percoll poderia trazer resultados benéficos para o sêmen armazenado por tempos superiores.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Percoll promove a separação e seleção dos espermatozoides potencialmente férteis. Porém, durante o processo de centrifugação com o gradiente de densidade, pode levar a formação de ERO. Assim, durante o processamento da seleção, o espermatozoide está exposto à ação dos radicais livres, afetando diretamente a funcionalidade da célula.

Portanto, a associação do procedimento de seleção espermática junto com antioxidantes de resultados comprovados, torna-se importante para reduzir a quantidade de ERO no meio, diminuindo assim a ocorrência dos danos oxidativos. Então, em decorrência da capacidade antioxidante do ácido clorogênico e da vitamina E, a utilização desses compostos com a aplicação do Percoll pode trazer resultados benéficos para o sêmen resfriado.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 86, n. 4, p. 878-858, Oct. 2006.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 7, n. 4, p. 659-668, Jan. 1995.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 87, n. 3/4, p. 321-337, July 2005.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, Fort Collins, v. 7, n. 3, p. 145-173, May/June 1987.

AMINIPOUR, H.; TAHMASBI, A. M.; NASERIAN, A. A. The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. **International Journal of Zoological Research**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 94-99, Nov. 2013.

ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2006. 478 p.

AZAWI, O. I.; HUSSEIN, E. K. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5° C. **Veterinary Research Forum**, Urmia, v. 4, n. 3, p. 157-160, Dec. 2013.

BALDI, E. et al. Signal transduction pathways in human spermatozoa. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 53, n. 1/2, p. 121-131, Jan. 2002.

BATHGATE, R. Antioxidant Mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 23-25, Sept. 2011.

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 189-195, Apr. 2008.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal and human studies. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 187-198, Mar. 2007.

BREININGER, E. et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic Antioxidants in boar sperm cryopreservation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, May 2005.

BRIGELIUS-FLOHE, R. et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 76, n. 4, p. 703–716, Oct. 2002.

CAO, G.; CUTLER, R. G. High concentration of antioxidants may not improvedefense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Baltimore, v. 17, n. 3, p. 189-201, Sept. 1993.

CASTELLINI, C. et al. Effect of supranutritional level of dietary a-tocopherol acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, n. 9, p. 1723-1732, Dec. 2002.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 362–372, Mar. 1999.

DE VOS, A. et al. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 1980-1984, Sept. 1997.

DRUART, X. Sperm interaction with the female reproductive tract. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 348–352, Aug. 2012.

EVENSON, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to un compensable sperm nuclear defects. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 11, n. 1, p. 1–15, 1999.

GANGWAR, D.; ATREJA, S. Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 5, p. 705–711, Out. 2015.

GARCÍA-ROSELLÓ, E. et al. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 268-275, Mar./Apr. 2006.

GEVA, E. et al. Effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. **Fertility and Sterility**, New York, v. 66, n. 3, p. 430–434, Sept. 1996.

GRANT, S. A.; LONG, S. E.; PARKINSON, T. J. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 477–483, Mar. 1994.

GUIMARÃES, A. C. et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 146, n. 3/4, p. 103-110, May 2014.

HALLAP, T. et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 3/4, p. 702-13, Aug. 2004.

HENKEL, R. E.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, p. 108-129, Nov. 2003.

HENNING, H.; NGO, T. T.; WABERSKI, D. Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. **Andrology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 834-842. Sept. 2015.

HOELZL, C. et al. Instant coffee with high Chlorogenic acid levels protects human against oxidative damage of macromolecules. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 12, p. 1-12, Dec. 2010.

HOLT, W. Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 31–38, Sept. 2009.

HWANG, S. J. et al. Antiinflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, Basel, v. 63, n. 1, p. 81–90, Jan. 2014.

JEONG, B. S.; YANG, X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 3, p. 330–335, July 2001.

JEONG, Y. J. et al. Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen

cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 181–189, Apr. 2009.

JIN, S. et al. Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db mice. **PLoSOne**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0120842, Apr. 2015.

KANNO, Y. et al. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **International Heart Journal**, Tokyo, v. 54, n. 3, p. 176-180, Mar. 2013.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v. 72, n. 5, p. 624-635, Sept. 2009.

KHOSRO, B.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, Edinburgh, v. 77, n. 2, p. 117-121, Aug. 2007.

KONO, Y. et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1335, n. 3, p. 335–342, June 1997.

LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, Toronto, v. 13, n. 5, p. 379–386, Sept./Oct. 1992.

LE LANNOU, D.; BLANCHARD, Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 551-556, Nov. 1988.

LEE, A. H. et al. Plasma concentrations of coffee polyphenols and plasma biomarkers of diabetes risk in healthy Japanese women. **Nutrition & Diabetes**, Houndmills, v. 6, n. 6, p. e212, June 2016.

MAKKAR, G. et al. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, n. 5, p. 796-802, Nov. 1999.

- MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. de. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, São Paulo, v. 4, n. 27, p. 586-592, jun./jul. 2004.
- MARTIN-HIDALGO, D. et al. The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 5, n. 8, p. 231-242, Aug. 2013.
- MATÁS, C. et al. Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 133- 141, Jan. 2003.
- MCDOWELL, S. et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 28, n. 10, Oct. 2014. 1 CD010461.
- MENDEZ, M. F. et al. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 793-798, May 2013.
- MINAEI, M. B. et al. Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, Yazd, v. 10, n. 2, p. 99-104, Mar. 2012.
- MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 63-67, Feb. 2006.
- MORRELL, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal**, Uppsala, v. 1, n. 1, p. 1–9, Dec. 2009.
- MORTIMER, D. **Practical laboratory andrology**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 393 p.
- MORTIMER, D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in vitro fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 173-6, Feb. 1991.
- NARDINI, M. et al. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 20, p. 5735-5741, Sept. 2002.
- NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, n. 1, p. 75, Nov. 2004.

NISHI, A. A.; KUMAR, P. A protective effect of chlorogenic acid against diabetic nephropathy in high fat diet/streptozotocin induced type-2 diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, New Delhi, v. 5, n, 2, p. 489-495, Apr. 2013.

NOGUCHI, M. et al. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 68-75, Feb. 2015.

O'FLAHERTY, C.; LAMIRANDE, E. de; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 41, n. 4, p. 528–540, Aug. 2006.

OLIVEIRA, L. Z. et al. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 12, n. 3, p. 267–272, Sept. 2011.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 131, n. 1, p. 66-71, Jan. 2001.

OURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, New York, v. 122, p. 105-151, 1990.

PEREIRA, B. A. et al. Effet de l'acide chlorogénique sur la peroxydation lipidique et la capacité antioxydante du sperme de verrat. In: 46èmes Journées de la recherche porcine. **Journées de la Recherche Porcine**, Paris, v. 46. p. 293-294, 2014.

PERTOFT, H. et al. The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll(TM). **Experimental cell research**, New York, v.110, n. 2, p. 449-457, Dec. 1977.

REN, S. S. et al. Comparison of four methods for sperm preparation for IUI. **Archives of andrology**, New York, v. 50, n. 3, p. 139-143, May/June 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933–956, Apr. 1996.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 65, n. 1, p. 27-33, Jan. 1994.

ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M. Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28, n. 1/4, p. 69-78, July 1992.

SAKKAS, D. et al. The use of two density centrifugation techniques and the Swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1112-1116, May 2000.

SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of bovipure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 91, n. 3/4, p. 237-247, Feb. 2006.

SATORRE, M. M. et al. a-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**, Los Altos, v. 68, n. 7, p. 958-965, Oct. 2007.

SCHUMACHER, M. et al. Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 333-338, July 1978.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 18, p. 2088-2098, Mar. 2006.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Ridgewood, v. 48, n. 6, p. 835-850, Dec. 1996.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 349, n. 3, p. 765-782, Sept. 2012.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 8, n. 7, p. 851-862, June 2001.

SILVA, E. C. B. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, May 2012.

SILVA, P. F. N. et al. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 3, p. 609-619, Feb. 2007.

SILVA, S. et al. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 5, p. 874-881, Oct. 2011.

SUAREZ, S. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 19, n. 1, p. 103–110, Dec. 2007.

SUZUKI, K.; NAGAI, T. In vitro fertility and motility characteristics of frozen–thawed boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. **Theriogenology**, Los Altos, v. 60, n. 8, p. 1481–1494, Nov. 2003.

TSANTARLOTOU, M. P. et al. Dexamethasone reduces acrosin activity of ram spermatozoa. **Andrologia**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 188-193, June 2002.

VISCONTI, P. E. et al. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, New York, v. 19, n. 2, p. 242–248, Mar./Apr. 1998.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of reproduction**, New York, v. 59, n. 1, p. 1–6, July 1998.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, Apr. 1995.

WESTHOFF, D.; KAMP, G. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Journal of Cell Science**, London, v. 110, n. 15, p. 1821-1829, Aug. 1997.

WITTAYARAT, M. et al. Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5 °C. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 13, n. 3, p. 251–254, Sept. 2013.

WU, T. W. et al. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 68, n. 10, p. 1189–1194, Oct. 1990.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

**ARTIGO 1 - ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E VITAMINA
E AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO PROCESSADO OU NÃO
COM PERCOLL**

S. S. Rabelo¹, M.G. Zangeronimo¹,

*¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras,
Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil*

1. Introdução

A obtenção de sêmen suíno de melhor qualidade destinado à inseminação artificial (IA) ou a fertilização *in vitro* (FIV) fez com que diferentes metodologias fossem desenvolvidas. Uma delas, a técnica de seleção espermática com uso de Percoll tem sido amplamente difundida (Cesari et al., 2006; Zhou et al., 2010). Essa técnica seleciona, a partir da densidade celular, subpopulações espermáticas com maior integridade física. Tal procedimento é indicado para se obter células com melhor estrutura nuclear (Le Lannou e Blanchard, 1988) e menor número de alterações morfológicas (Henkel e Schill, 2003).

Entretanto, efeitos negativos na motilidade espermática têm sido relatado (Guimarães et al., 2014), provavelmente devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o processo de centrifugação (Iwasaki e Gagnon, 1992) ou devido à própria toxicidade do Percoll (De Vos et al., 1997), que contém, em sua composição, a polivinilpirrolidona (Kato e Nagao, 2009). Além de antecipar o processo de capacitação espermática, a presença de ERO poderia aumentar o total de anormalidades celulares e de acrossoma após a seleção, diminuindo assim a qualidade do sêmen (Breininger et al., 2005). Nesse caso, a adição de antioxidantes nas doses inseminantes poderia amenizar os danos espermáticos causados pelas ERO.

A vitamina E (Mendez et al., 2013) e o ácido clorogênico (Basile et al., 2005; Pereira et al., 2014) são substâncias antioxidantes que melhoram a qualidade espermática quando utilizada em meios de processamento do sêmen. A vitamina E (tocoferol) é um antioxidante não enzimático (Maneesh e Jayalekshmi, 2006) e lipossolúvel que pode proteger os espermatozoides contra danos oxidativos ao DNA e à membrana plasmática (Breininger et al., 2011). Mendez et al. (2013) relataram que a adição de 400 µg/ml de vitamina E durante o processamento das doses inseminantes de suínos reduziu a peroxidação

lipídica do sêmen armazenado a 15 °C por 72 horas. Por outro lado, o ácido clorogênico é um composto fenólico, hidrossolúvel, amplamente distribuído na natureza e encontrado principalmente em vegetais (Basile et al., 2005). A presença de 4,5 mg/mL dessa substância no sêmen suíno parece melhorar a qualidade das doses inseminantes, principalmente quando armazenadas por períodos superiores a 24 horas (Pereira et al., 2014).

Dessa forma, objetivou-se verificar se a adição de vitamina E ou ácido clorogênico aos meios de diluição melhoram a qualidade do sêmen suíno resfriado e processado com Percoll.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta do sêmen e processamento das doses inseminantes

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Suínos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA, com protocolo número 034/16.

Foram utilizados 16 ejaculados provenientes de quatro animais (quatro ejaculados de cada) das raças Duroc, Large White e Pietrain, com fertilidade comprovada, pertencentes ao Centro Experimental de Suínos da UFLA. Os ejaculados foram obtidos pelo método da mão enluvada durante a rotina da granja, sempre às 9:00 am. As coletas eram realizadas dos três machos, com intervalo de três dias para descanso.

O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso (ejaculados) em esquema fatorial 2x3 (com ou sem Percoll e três sistemas antioxidantes: controle - sem adição -, ácido clorogênico e vitamina E), totalizando os seis tratamentos e 12 repetições de um ejaculado cada.

Antes da coleta do sêmen, os meios de diluição BTS (*Beltville Thawing Solution*[®] - Minitub do Brasil LTDA) foram preparados, sem a adição de

antioxidantes, com a adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico (chlorogenic acid crystalline, C3878 - *Sigma-Aldrich*[®]) (Pereira et al., 2014) ou com 400 µg/ml de vitamina E (DL- α -tocoferol acetato, T3251 - *Sigma-Aldrich*[®]) (Mendez et al., 2013), todas mantidas a 35 °C. Imediatamente após a coleta, a concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer, após a diluição de uma amostra do ejaculado em solução formol aldeído-citrato de sódio a 3% (Blom e Jensen, 1984) (1:100), para o cálculo do número de espermatozoides/mL de sêmen. De cada ejaculado, três doses inseminantes de 40 mL contendo dois bilhões de espermatozoides foram processadas utilizando um dos três meios de diluição previamente preparados. As doses inseminantes foram então mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz por 40 minutos. Em seguida, foram armazenadas em geladeira a 15 °C.

Às 0, 48 e 72 horas de armazenamento, amostras de 2,0mL de sêmen foram centrifugadas (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Electron Led GmbH, Osterode, Alemanha) a $1000 \times g$ durante 15 minutos a 37 °C em tubos de ensaio 24 x 150 mm contendo 2,0mL de Percoll (Percoll[™], GE Healthcare – Uppsala, Suécia) previamente preparado em gradiente de densidade 45/90 em solução salina (0,9%) (Zhou et al., 2010). Após esse procedimento, a lavagem da amostra com 500 µl de BTS foi realizada por centrifugação de $1000 \times g$ por 10 minutos à 37 °C. O sedimento de espermatozoides recolhido no fundo do tubo de ensaio foi então ressuspenso em 3,0mL de BTS aquecido a 37°C e mantidos nessa temperatura por 15 minutos em banho-maria para as avaliações microscópicas e bioquímicas do sêmen.

2.2. Avaliação microscópica do sêmen

Todos os parâmetros cinéticos dos espermatozoides foram analisados no sistema CASA (*Sperm Class Analyzer SCA 5.0*, Microptic, Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio de contraste de fases com mesa aquecida

a 37 °C. Para realização do teste, 3,0 µL de sêmen foram depositados em uma lâmina de vidro específica (Leja[®] 20 micron - Microptic, Barcelona, Espanha) previamente aquecida à 37 °C. As imagens foram capturadas no aumento de 100×.

Para avaliar o total de células anormais, uma amostra de 200 µL sêmen foi diluída em 700 µL de solução formol aldeído-citrato de sódio a 3% (Pursel et al., 1972). Posteriormente, 10 µl dessa mistura foram colocadas entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de contraste de fase (Olympus CX31, Olympus - Tokyo, Japão) em aumento de 1000×. As alterações de acrossoma, de cabeça, de peça intermediária e de cauda foram contabilizadas em um total de 200 células. Os valores foram expressos em porcentagem, considerando o número total de alterações detectadas em relação ao número total de células avaliadas.

A viabilidade espermática foi avaliada após a mistura de uma gota de sêmen a uma gota de eosina-nigrosina (Blom, 1950). Após esfregaço em lâmina de microscopia, um total de 200 células foi avaliado em microscópio óptico (Olympus CX31, Olympus – Tokyo, Japão) em aumento de 400×. Células não coradas foram consideradas como tendo membranas íntegras e células coradas foram consideradas mortas. Os valores foram expressos em porcentagem de células com membranas íntegras em relação ao número total de células contadas.

Para integridade acrossômica, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi adicionada em 10 µl de corante de POPE – *Fast Green/Rosa de Bengala* (Pope et al., 1991) e incubada por 60 segundos a 37°C. Após esse período, foi confeccionado um esfregaço em lâmina de microscopia, onde se avaliou em 200 células o número de espermatozoides com o acrossoma íntegro (região acrossomal corado de azul) e não íntegro (região acrossomal não corada ou fracamente corada) em microscopia de contraste de fases (Olympus CX31, Olympus - Tokyo, Japão) em aumento de 1000×.

2.3. *Avaliações bioquímicas do sêmen*

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de 1,0 mL de sêmen centrifugadas a $3000 \times g$ durante dez minutos (Ahluwalia e Holman, 1969). O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia das análises.

Para avaliar a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma seminal, o Kit Quanti Chrom™ TBARS ASSAY (DTBA- 100- Bioassay Systems - Hayward, EUA) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante (Brzezińska-Ślebodzińska et al., 1995). Para a mensuração do colesterol total utilizou-se o kit comercial Colesterol Oxidase (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Brasil) utilizando as instruções do manual do fabricante (Melo et al., 2009).

2.4. *Análise estatística*

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene e, em seguida à análise de variância. Para as variáveis que não atenderam as pressuposições da ANOVA foi utilizada a raiz quadrada para transformação dos dados. As interações foram estudadas quando significativas ($P < 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%. Toda análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico Action versão 3.0.2.

3. **Resultados**

Houve interação ($P < 0,05$) Antioxidante x Percoll na motilidade total no sêmen armazenado por 48 ou 72 horas (Tabela 1). Tanto a vitamina E quanto o ácido clorogênico melhoraram ($P < 0,05$) a motilidade total quando o sêmen armazenado por 48 horas foi processado em Percoll, porém, o mesmo efeito não foi observado ($P > 0,05$) quando o sêmen foi armazenado por 72 horas (FIGURA

1). Com 72 horas de armazenamento, o ácido clorogênico melhorou ($P<0,05$) a motilidade total do sêmen não processado em Percoll, porém, o mesmo efeito não foi observado ($P>0,05$) quando a técnica de seleção foi utilizada.

Não houve interação ($P>0,05$) Antioxidante x Percoll para os demais padrões de motilidade espermática, para viabilidade, para integridade de acrossoma, para o total de alterações morfológicas (Tabela 2) e para concentração de MDA (Tabela 3) no plasma seminal suíno. O processamento com Percoll prejudicou ($P<0,01$) todos os padrões de motilidade, porém, reduziu o total de alterações espermáticas ($P<0,01$) em todos os tempos de armazenamento do sêmen. A viabilidade melhorou ($P<0,01$) somente sêmen armazenado por 48 horas. Não houve efeito ($P>0,05$) do uso do Percoll sobre a concentração de MDA no plasma seminal.

Os antioxidantes não influenciaram ($P>0,05$) a viabilidade e a integridade de acrossoma, porém, o ácido clorogênico reduziu ($P<0,05$) o total de alterações morfológicas do sêmen fresco (0 horas), enquanto que a vitamina E aumentou o número de células anormais no sêmen armazenado por 72 horas, independente do uso do Percoll. Não houve efeito ($P<0,05$) dos antioxidantes na concentração de MDA no plasma seminal.

Quanto à concentração de colesterol no plasma seminal, houve interação ($P<0,05$) entre os tipos de antioxidantes e o uso de Percoll. No sêmen fresco, o uso de ácido clorogênico aumentou ($P<0,05$) os níveis de colesterol no plasma seminal somente quando o Percoll foi utilizado. Já com 72 horas, quando comparado ao controle (sem antioxidante), o ácido clorogênico reduziu ($P<0,05$) a concentração de colesterol somente no sêmen não processado em Percoll. O Percoll não influenciou ($P>0,05$) o efluxo de colesterol do sêmen suíno.

4. Discussão

O uso do Percoll, embora tenha sido eficiente na seleção de subpopulações espermáticas com menor número de alterações morfológicas, reduziu os padrões de motilidade espermática, independente da adição de antioxidantes ao meio diluidor. Esse resultado indica que tanto o ácido clorogênico quanto a vitamina E não foram eficientes em amenizar os efeitos negativos propiciado pelo uso da técnica de seleção espermática com Percoll.

A técnica de processamento do sêmen em Percoll é recomendada quando se faz a FIV (Matás et al., 2011). Nesses casos, a integridade física dos espermatozoides é mais importante do que a capacidade locomotora dessas células. Por outro lado, o uso do Percoll para a produção de doses inseminantes para serem utilizadas na fertilização *in vivo* ainda é inviável.

Inúmeros trabalhos comprovam que o uso de substâncias com propriedades antioxidantes melhoram a qualidade do sêmen suíno congelado (Ma et al., 2015; Shen et al., 2016), cuja manipulação é intensa, porém, não há informações suficientes que comprovem esses achados em sêmen processado em Percoll. Os benefícios esperados com o uso de antioxidantes adicionadas ao meio diluidor poderiam se estender à utilização do sêmen processado em Percoll também em programas de IA.

De acordo com Iwasaki e Gagnon (1992), a manipulação do sêmen pode resultar na formação de ERO. O mesmo ocorre também com o sêmen suíno resfriado (Martin-Hidalgo et al., 2013). Sabe-se que as ERO podem danificar a membrana espermática e, com isso, reduzir a motilidade (De Lamirande e Gagnon, 1991), além de induzir alterações irreversíveis às proteínas e ácidos nucleicos dos espermatozoides, estimulando a apoptose e a morte celular (Lewis e Aitken, 2005).

Entretanto, o aumento da concentração de MDA no plasma seminal decorrente do processamento do sêmen em Percoll não pode ser verificado no

presente estudo. Dessa forma, acredita-se que os efeitos negativos dessa técnica sobre a qualidade do sêmen possa estar mais relacionada à toxicidade da polivinilpirrolidona presente no Percoll (Barak et al., 2001), embora existam indícios que o MDA pode reagir com proteínas e aminoácidos presentes no meio (Chio e Tappel, 1969). Nesse caso, o uso de técnicas de identificação de MDA no meio poderiam não ser eficientes para comprovar a presença de ERO no meio. A reação entre MDA e as proteínas é bastante complexa e é dependente da temperatura, pH e período de incubação (Shin et al., 1972). Porém, essa característica não tem sido identificada no sêmen suíno. Assim, os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos tóxicos da polivinilpirrolidona possam ter influenciado de maneira mais expressiva a qualidade do sêmen.

Independentemente do uso do Percoll, tanto o ácido clorogênico quanto a vitamina E mostraram efeitos positivos sobre a qualidade do sêmen suíno. Ambas as substâncias já foram estudadas como agentes protetores do estresse oxidativo do sêmen, provavelmente por seus efeitos inibitórios sobre as ERO (Mendez et al., 2013; Pereira et al., 2014), porém nenhum estudo tem associado tais substâncias à técnica de processamento do sêmen em Percoll.

A vitamina E já vem sendo amplamente estudada devido aos seus efeitos protetores contra os danos oxidativos nos espermatozoides (Jeong et al., 2009; Satorre et al., 2012). Por outro lado, mais recentemente, o ácido clorogênico apresentou comprovados benefícios para a funcionalidade celular e saúde animal (Darvesh et al., 2010; Sato et al., 2011) e também sobre a qualidade do sêmen (Pereira et al., 2014), provavelmente devido as suas propriedades antioxidantes de combate às ERO. Sabe-se que as ERO são capazes de induzir a capacitação espermática por mecanismos ainda não totalmente elucidados (O'Flaherty et al., 2006).

Um dos eventos que fazem parte do processo de capacitação é o aumento da fluidez da membrana espermática devido à saída de colesterol da

membrana (Signorelli et al., 2012). O processamento do sêmen em Percoll não foi suficiente para induzir o processo de capacitação (FIGURA 2), exceto no sêmen fresco (0 horas) quando o ácido clorogênico foi adicionado ao meio diluidor. Esse resultado sugere a que a presença dessa substância no sêmen, aliado ao estresse provocado pelo Percoll, tenham ativado algum mecanismo envolvido no efluxo de colesterol do espermatozoide.

Por outro lado, esse efeito do ácido clorogênico não foi observado no sêmen armazenado por 72 horas. Do contrário, o ácido clorogênico reduziu o efluxo de colesterol, porém somente no sêmen não processado em Percoll. O mesmo não pode ser observado com a vitamina E, quando comparado ao grupo controle (sem adição de antioxidante). Esse resultado sugere um efeito antioxidante tardio do ácido clorogênico quando comparado à vitamina E, amenizando o estresse oxidativo que ocorre no sêmen armazenado por períodos prolongados. De fato, o ácido clorogênico resultou em maior motilidade no sêmen armazenado por 72 horas não processado em Percoll (FIGURA 1). Esse comportamento do ácido clorogênico também foi observado por Pereira et al. (2014). Entretanto, os benefícios propiciados pelo ácido clorogênico ao sêmen suíno resfriado não foram suficientes para manter a qualidade seminal após o processamento em Percoll.

De uma forma geral, os resultados do presente estudo mostraram que o maior benefício da aplicação do método de seleção pelo Percoll foi reduzir o percentual das anormalidades da célula espermática e que a adição de substâncias antioxidantes ao meio diluidor podem amenizar os efeitos nocivos provocados pelo uso da técnica. No entanto, tais benefícios não foram suficientes para evitar a perda de qualidade seminal após o uso do Percoll. Nesse sentido, mais estudos devem ser conduzidos na tentativa de se melhorar a qualidade do sêmen suíno processado em Percoll para posterior uso em programas de IA.

5. Conclusão

A adição de ácido clorogênico e vitamina E ao meio diluidor melhora a qualidade do sêmen suíno independente do uso da técnica de seleção espermática em Percoll. Entretanto, os benefícios não são suficientes para manter a qualidade seminal após o uso dessa técnica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (PNPD Institucional), processo número 2457/2011 e Programa Pesquisador Visitante Especial - PVE, processo número 88881,030399 / 2013-01), FAPEMIG (PPM-00359-14), Minitub do Brasil, Fazenda São Paulo e Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / UFLA, por seu apoio.

Referências

- Ahluwalia, B., Holman, R.T., 1969. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 18, 431-437.
- Barak, Y., Menezes, Y., Veiga, A., Elder, K., 2001. A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Human Fertility* 4, 99-103.
- Basile, A., Ferrara, L., Pezzo, M.D., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D., 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 32-36.
- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility* 1, 176-177.

Blom, E., Jensen, P.T., 1984. Studies on boar semen. III. Sperm concentration and seminal plasma total solids followed in Danish AI boars through a 10-year-period. *Acta Veterinaria Scandinavica* 25, 107.

Breininger, E., Beorlegui, N.B., O'Flaherty, C.M., Beconi, M.T., 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63, 2126-2135.

Breininger, E., Descalzo, A., Rossetti, L., Abramovich, D., Beconi, M.T., 2011. Boar sperm functionality is related to α -tocopherol content after freezing-thawing. *Andrologia* 43, 409.

Brzezińska-Ślebodzińska, E., Ślebodziński, A., Pietras, B., Wiczorek, G., 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research* 47, 69-74.

Cesari, A., Kaiser, G.G., Mucci, N., Mutto, A., Vincenti, A., Fornes, M.W., Alberio, R.H., 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 66, 1185-1193.

Chio, K.S., Tappel, A.L., 1969. Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry* 8, 2827-2832.

Darvesh, A.S., Carroll, R.T., Bishayee, A., Geldenhuys, W.J., Van der Schyf, C.J., 2010. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Review of Neurotherapeutics* 10, 729-745.

De Lamirande, E., Gagnon, C., 1991. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology* 13, 379-386.

De Vos, A., Nagy, Z.P., Van de Velde, H., Joris, H., Bocken, G., Van Steirteghem, A., 1997. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12, 1980-1984.

Guimarães, A.C.G., Leivas, F.G., Santos, F.W., Schwengber, E.B., Giotto, A.B., Machado, C.I.U., Gonçalves, C.G.M., Folchini, N.P., Brum, D.S., 2014. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 103-110.

Henkel, R.R., Schill, W.B., 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1, 108.

Iwasaki, A., Gagnon, C., 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 57, 409-416.

Jeong, Y.J., Kim, M.K., Song, H.J., Kang, E.J., Ock, S.A., Kumar, B.M., Balasubramanian, S., Rho, G.J., 2009. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58, 181-189.

Kato, Y., Nagao, Y., 2009. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology* 72, 624-635.

Le Lannou, D., Blanchard, Y., 1988. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *Journal of Reproduction and Fertility* 84, 551-556.

Lewis, S.E.M., Aitken, R.J., 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research* 322, 33-41.

Ma, H., Liu, D., Wang, W., Wang, L., Fu, B., Li, Z., He, X., 2015. Effect of Semen Extender Supplementation with Trehalose, Vitamin C and E on Post-Thaw Min Pig Sperm Qualities. *CryoLetters* 36, 308-312.

Maneesh, M., Jayalekshmi, H., 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21, 80-89.

Martin-Hidalgo, D., Baron, F.J., Robina, A., Bragado, M.J., Llera, A.H., Garcia-Marin, L.J., Gil, M.C., 2013. Inter- and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during long-term storage in MR-A and XCell extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 109-114.

Matás, C., Vieira, L., García-Vázquez, F.A., Avilés-López, K., López-Úbeda, R., Carvajal, J.A., Gadea, J., 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 62-72.

Melo, C.L., Queiroz, M.G., Arruda Filho, A.C., Rodrigues, A.M., de Sousa, D.F., Almeida, J.G., Pessoa, O.D., Silveira, E.R., Menezes, D.B., Melo, T.S., Santos, F.A., Rao, V.S., 2009. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8776-8781.

Mendez, M.F., Zangeronimo, M.G., Rocha, L.G., Faria, B.G., Pereira, B.A., Fernandes, C.D., Chaves, B.R., Murgas, L.D., Sousa, R.V., 2013. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal* 7, 793-798.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C., 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* 41, 528-540.

Pereira, B.A., Zangeronimo, M.G., Sousa, R.V., Teles, M.C., Mendez, M.F.B., Rocha, L.G.P., 2014. Effet de l'acide chlorogénique sur la peroxydation lipidique et la capacité antioxydante du sperme de verrat, In: 46èmes Journées de la Recherche Porcine, Paris, pp. 293-294.

Pope, C.E., Zhang, Y.Z., Dresser, B.L., 1991. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 87-95.

Pursel, V., Johnson, L., Rampacek, G., 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science* 34, 278-283.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal Pharmaceutics* 403, 136-138.

Satorre, M.M., Breininger, E., Beconi, M.T., 2012. Cryopreservation with alpha-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology* 78, 1548-1556.

Shen, T., Jiang, Z.L., Li, C.J., Hu, X.C., Li, Q.W., 2016. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. *Zygote* 24, 259-265.

Shin, B.C., Huggins, J.W., Carraway, K.L., 1972. Effects of pH, concentration and aging on the malonaldehyde reaction with proteins. *Lipids* 7, 229-233.

Signorelli, J., Diaz, E.S., Morales, P., 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and Tissue Research* 349, 765-782.

Zhou, Q.Z., Feng, C.Q., Zou, Y.G., Shu, W., Li, T.Q., Li, F., Liu, C.D., Mao, X.M., 2010. Single- and two-layer gradient centrifugation in sperm separation: comparison and appraisal. *Zhonghua Nan Ke Xue* 16, 217-219.

Tabela 1. Padrões de motilidade do sêmen suíno armazenado a 15 °C após a adição de ácido clorogênico (AC) (4,5 mg/ml de sêmen) ou vitamina E (VE) (400 µg/ml de sêmen), com ou sem o uso de Percoll.

Tempo de armazenamento	Percoll (Pe)		Antioxidante (Ao)			CV (%)	Valor de P		
	Com	Sem	Sem	AC	VE		Pe	Ao	Pe*Ao
Motilidade total (%)									
0 horas	84,1	88,1	83,8	88,0	86,8	8,96	0,04	0,16	0,98
48 horas	46,0	74,3	53,6 ^b	65,4 ^a	64,1 ^a	10,72	<0,01	<0,01	0,03
72 horas	26,3	66,8	44,8 ^b	54,2 ^a	43,9 ^b	10,00	<0,01	<0,01	0,06
Motilidade progressiva (%)									
0 horas	30,8	46,4	41,9	46,7	43,9	14,74	<0,01	0,14	0,21
48 horas	13,2	27,6	22,4	24,6	19,9	16,95	<0,01	0,28	0,93
72 horas	1,82	12,6	8,69	8,79	9,82	11,04	<0,01	0,30	0,12
VAP - Velocidade média (µm/s)									
0 horas	39,5	47,5	42,9	44,6	43,6	9,64	<0,01	0,77	0,87
48 horas	21,9	31,9	28,0	25,0	28,8	15,97	<0,01	0,12	0,14
72 horas	12,5	26,0	19,9	17,8	21,1	12,49	<0,01	0,14	0,16
ALH - Deslocamento lateral de cabeça (µm)									
0 horas	2,01	2,28	2,22	2,10	2,13	10,09	<0,01	0,69	0,64
48 horas	1,51	1,65	1,61	1,52	1,63	7,48	0,01	0,30	0,36
72 horas	1,28	1,61	1,55	1,38	1,43	12,12	<0,01	0,12	0,13
LIN - Coeficiente de linearidade (%)									
0 horas	0,524	0,549	0,527	0,569	0,517	11,32	0,10	0,12	0,19
48 horas	0,362	0,539	0,436	0,485	0,444	14,15	<0,01	0,49	0,18
72 horas	0,353	0,511	0,401	0,455	0,451	11,28	<0,01	0,25	0,21
WOB - Coeficiente de oscilação (%)									
0 horas	0,711	0,750	0,730	0,745	0,720	5,85	<0,01	0,17	0,23
48 horas	0,553	0,714	0,626	0,650	0,638	8,95	<0,01	0,86	0,11
72 horas	0,511	0,693	0,578	0,610	0,633	7,15	<0,01	0,12	0,21

^{a, b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Viabilidade espermática, integridade de acrossoma e total de alterações morfológicas no sêmen suíno armazenado a 15 °C após adição de ácido clorogênico ou vitamina E, com ou sem o uso de Percoll.

Tempo de armazenamento	Percoll		AO			CV (%)	Valor de P		
	Com	Sem	Sem	AC	VE		Perc	Ant	P*A
Viabilidade espermática (%)									
0 horas	87,4	86,4	86,8	87,1	86,8	4,73	0,28	0,95	0,17
48 horas	86,4	82,1	83,4	84,0	85,4	5,51	<0,01	0,31	0,26
72 horas	83,8	81,9	83,9	81,3	83,3	5,01	0,09	0,14	0,50
Integridade de acrossoma (%)									
0 horas	94,9	96,6	95,7	95,7	95,9	1,60	<0,01	0,86	0,31
48 horas	91,0	90,8	90,3	91,7	90,7	3,93	0,80	0,37	0,29
72 horas	89,7	89,9	89,3	89,9	90,3	3,40	0,76	0,62	0,58
Total de alterações morfológicas (%)									
0 horas	4,12	6,44	5,07 ^{ab}	3,54 ^b	7,24 ^a	23,07	<0,01	<0,01	0,11
48 horas	5,81	10,00	8,41	7,81	7,50	22,83	<0,01	0,76	0,36
72 horas	7,25	10,12	7,43 ^b	6,11 ^b	12,51 ^a	19,08	<0,01	<0,01	0,13

^{a, b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Efeito do ácido clorogênico e vitamina E e a utilização do Percoll sobre a concentração de MDA (μM) no plasma seminal suíno, nos diferentes tempos de armazenamentos, a 15 °C.

Tempo de armazenamento	Percoll (Pe)		Antioxidante (Ao)			CV (%)	Valor de P		
	Com	Sem	Sem	AC	VE		Pe	Ao	Pe*Ao
0 horas	0,910	0,864	0,884	0,868	0,907	15,57	0,57	0,98	0,24
48 horas	0,716	0,858	0,767	0,813	0,775	22,42	0,10	0,84	0,88
72 horas	0,708	0,809	0,701	0,866	0,726	15,46	0,13	0,13	0,58

Não houve diferenças estatísticas pelo teste F ($P < 0,05$)

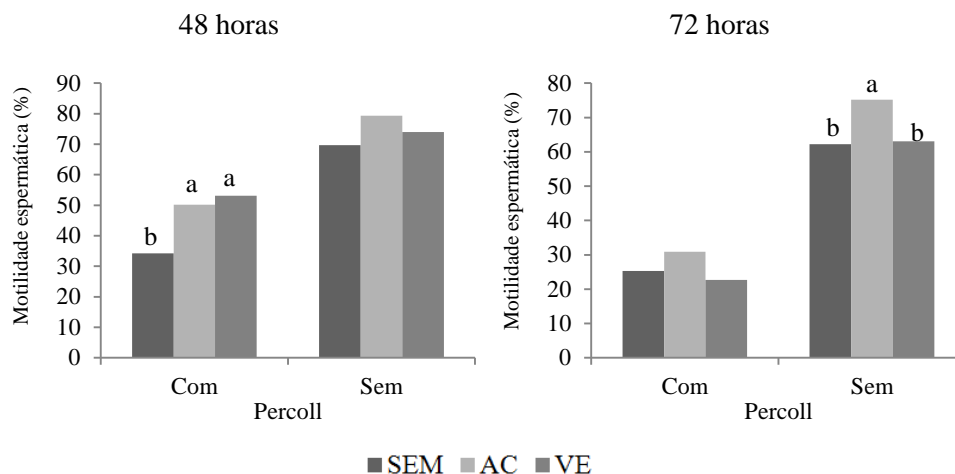


Figura 1. Efeito do ácido clorogênico (AC) e vitamina E (VE), com ou sem uso do Percoll, sobre a motilidade total do sêmen suíno em diferentes tempos de armazenamento. ^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

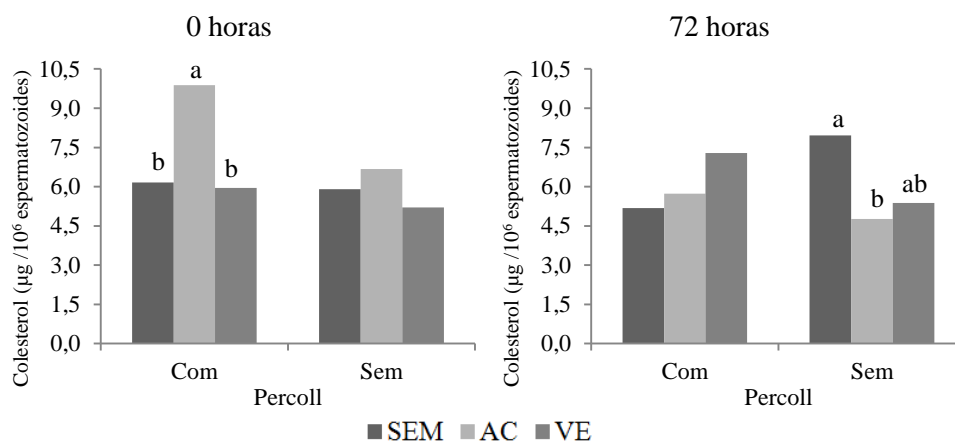


Figura 2. Efeito do ácido clorogênico (AC) e vitamina E (VE), com ou sem uso do Percoll, sobre a concentração de colesterol total no plasma seminal suíno em diferentes tempos de armazenamento. ^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso Animais CEUA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Adição de ácido clorogênico e vitamina E ao sêmen resfriado suíno processado com Percoll®", protocolo nº 034/16, sob a responsabilidade de Márcio Gilberto Zangeronimo, Stenia Severo Rabelo, Bárbara Azevedo Pereira e William Eduardo da Silva, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 28/04/2016.

Início do projeto: 01/05/2016

Término do projeto: 30/07/2016


Espécie/linhagem: Suíno / Landrace x Large White x Duroc

Número de animais aprovados: 3

Peso/Idade: 150-300 kg / 12-36 meses

Sexo: macho

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Ejaculados provenientes de reprodutores suínos pertencentes ao Centro Experimental de Suínos do Departamento de Zootecnia da UFLA - Responsável pelos Animais: Márvio Lobão Teixeira de Abreu.


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.pp.ufla.br