

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Natália de Castro Alves

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE RESVERATROL E NIACINA SOBRE A
QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE EQUINO**

Belo Horizonte

2024

Natália de Castro Alves

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE RESVERATROL E NIACINA SOBRE A
QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE EQUINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Monique de Albuquerque Lagares.

Coorientadores: Profa. Dra. Erica Azevedo Costa e Profa. Dra. Fernanda Radicchi Lobato de Almeida

Belo Horizonte

2024

A474i Alves, Natália de Castro, 1993-
Influência da adição de resveratrol e niacina sobre a qualidade do espermatozoide criopreservado de equino/ Natália de Castro Alves.-2024.
127f: il.

Orientadora: Monique de Albuquerque Lagares
Coorientadoras: Fernanda Radicchi Lobato de Almeida
Érica Azevedo Costa

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.
Inclui Bibliografia

1. Equino – Reprodução - Teses - 2. Sêmen - Análise - Teses –
3. Criopreservação – Teses- I. Lagares, Monique de Albuquerque – II. Almeida, Fernanda Radicchi Lobato de - III. Costa, Érica Azevedo - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATÁLIA DE CASTRO ALVES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **doutora** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Reprodução Animal**. Defesa da tese intitulada: **"INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE RESVERATROL E NIACINA SOBRE A QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE EQUINO."**

Aprovado(a) em 01 de outubro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Monique de Albuquerque Lagares - Orientador(a)

Dr.(a). Ivan Cunha Bustamante Filho

Dr.(a). Paola Pereira das Neves Snoeck

Dr.(a). Priscila Fantini

Dr.(a). Guilherme Mattos Jardim Costa

Dr.(a). Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner



Documento assinado eletronicamente por **Monique de Albuquerque Lagares, Professora do Magistério Superior**, em 02/10/2024, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner, Usuário Externo**, em 02/10/2024, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Fantini, Professora do Magistério Superior**, em 03/10/2024, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivan Cunha Bustamante Filho, Usuário Externo**, em 03/10/2024, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paola Pereira das Neves Snoeck, Usuária Externa**, em 03/10/2024, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do**



Magistério Superior, em 03/10/2024, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3596764** e o código CRC **E8E66B09**.

Referência: Processo nº 23072.207548/2021-73

SEI nº 3596764

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou todas as oportunidades e alegrias que tive até hoje e me amparou nos momentos mais difíceis.

A minha família pelo apoio incondicional, por ser minha fonte de inspiração e por acreditar em mim em todos os momentos.

Ao Felipe, meu amigo e amor, que me apoiou e incentivou nessa trajetória.

A minha orientadora Profa. Monique, por ser muito mais que uma professora em todos estes anos de orientação.

Aos colegas, estagiários e ICs do setor de reprodução pela ajuda e cumplicidade em todos os momentos de nossos árduos projetos. Sem essa equipe nada disso seria possível. Obrigada Jade, Marina, César, Isis, Camilla e Alexia.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho e ao pesquisador Márcio Sobreira, do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ Minas, pelo auxílio nas análises no citômetro de fluxo.

Aos professores Erica Azevedo e Guilherme Mattos, por todas as sugestões e auxílios para a realização desse projeto.

Às pesquisadoras Jaqueline Santos e Márcia Borges da Fundação Ezequiel Dias - FUNED e ao professor Arlindo Moura da Universidade Federal do Ceará pelo auxílio nas análises de proteômica.

A todos os proprietários de garanhões e haras, aos médicos veterinários e colaboradores dos haras e fazendas por disponibilizarem os animais e pessoal para realização do experimento.

Aos professores do Setor de Reprodução da Escola de Veterinária pelos valiosos ensinamentos.

Aos equinos, os seres mais incríveis com os quais se é possível trabalhar.

A todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado.

*“Eu prefiro ter perguntas que podem ser
respondidas a ter respostas que não podem ser
questionadas”*

Richard Feynman

Resumo

Embora a criopreservação de sêmen equino permita a preservação e o transporte de material genético, o processo de congelamento induz a danos espermáticos. Para minimizar esses danos, antioxidantes têm sido adicionados aos diluentes de sêmen. O objetivo deste estudo foi aumentar a qualidade do espermatozoide equino criopreservado com a suplementação de substâncias com ação antioxidante. No experimento 1, ejaculados de 10 garanhões foram congelados com diluidor de congelamento INRA 96 (grupo controle 0 μ M) e adicionado de, 5-, 10-, 100- e 150 μ M de resveratrol. No experimento 2, foram adicionadas ao mesmo diluidor 0-, 10- e 20 mM de niacina. Nos dois experimentos, após o descongelamento foram avaliados os parâmetros motilidade, cinemática, morfologia, viabilidade, funcionalidade e integridade de membrana plasmática, integridade acrossômica, potencial mitocondrial, peroxidação lipídica espermática, concentração de espécies reativas de oxigênio, expressão gênica e taxa de ligação de espermatozoides a explantes de tuba uterina bovina. No experimento 1, a inclusão de 10 μ M de resveratrol ao diluidor de congelamento de sêmen equino aumentou a motilidade, a atividade mitocondrial, a expressão do gene SPACA3 associado a capacidade de ligação do espermatozoide à zona pelúcida e o número de espermatozoides ligados aos explants de tuba uterina bovina, comparada ao grupo controle. Por outro lado, 10 μ M de resveratrol reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio totais, a expressão de gene ROMO1 associado a produção de EROS mitocondriais e a expressão de gene BAX associado a apoptose em comparação ao controle. No experimento 2, a inclusão de 10 mM de niacina ao diluidor de congelamento de sêmen equino aumentou a motilidade, a atividade mitocondrial, a expressão do gene SPACA3, e o número de espermatozoides ligados aos explants de tuba uterina bovina, e reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio totais, a expressão do gene ROMO1 e BAX. Portanto, a adição de resveratrol e niacina ao diluidor de congelamento de sêmen equino aumentou a qualidade do espermatozoide criopreservado podendo ser uma alternativa para melhorar a capacidade fecundante do espermatozoide equino em programas de inseminação artificial.

Palavras chave: antioxidante; reprodução; criopreservação; sêmen; garanhão

Abstract

Although equine semen cryopreservation allows for the preservation and transport of genetic material, the freezing process induces sperm damage. To minimize these deleterious effects on spermatozoa, the addition of antioxidants to semen extenders has been tested. The aim of this study was to improve the quality of equine sperm with the supplementation of substances with antioxidant action, such as resveratrol and niacin, to the semen freezing extender. In experiment 1, ejaculates from 10 stallions were frozen with INRA 96 freezing extender (control group 0 μ M) and with the addition of 5, 10, 100, and 150 μ M of resveratrol. In experiment 2, 0, 10, and 20 mM of niacin were added to the same freezing extender. In both experiments, after thawing, the parameters evaluated were motility, kinematics, morphology, viability, functionality and integrity of the plasma membrane, acrosomal integrity, mitochondrial potential, sperm lipid peroxidation, concentration of reactive oxygen species, gene expression, and the rate of sperm binding to bovine oviduct explants. In experiment 1, the inclusion of 10 μ M of resveratrol in the equine semen freezing extender compared to the control group increased motility, mitochondrial activity, the expression of the SPACA3 gene, associated with the sperm's ability to bind to the zona pellucida, and the number of sperm bound to bovine oviduct, while reducing the production of total reactive oxygen species, the expression of the ROMO1 gene, associated with mitochondrial ROS production, and the expression of the BAX gene associated with apoptosis. In experiment 2, the inclusion of 10 mM of niacin in the equine semen freezing extender increased motility, mitochondrial activity, the expression of the SPACA3 gene, and the number of sperm bound to bovine oviduct explants, while reducing the production of total reactive oxygen species, the expression of the ROMO1 gene, and BAX. Therefore, the addition of resveratrol and niacin to the equine semen freezing extender improved sperm quality and may be an alternative to enhance the fertilizing capacity of equine sperm in artificial insemination programs.

Keywords: antioxidante; spermatozoa; cryopreservation; semen; stallion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido”	23
Figura 2: Representação esquemática das mudanças físicas do espermatozoide equino durante o congelamento	28
Capítulo 2 – Artigo 1	
Figure 1: Sperm that underwent lipid peroxidation stained green/orange, and sperm that did not undergo lipid peroxidation are stained red using the fluorescent lipid probe C11-BODIPY581/591.....	72
Figure 2: Bright green fluorescent sperm showing ROS activity using the DCFDA fluorescent probe. The intensity of their fluorescence was measured with the Cytation 5 microplate reader (Biotek, Santa Clara, CA, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm.....	74
Figure 3: Sperm chromatin condensation level with Toluidine Blue. The figure shows sperm with compact chromatin (head lightly stained in light blue) and decondensed chromatin (head stained in dark blue or violet) indicated by the black arrow.....	76
Figure 4: Percentage of post-thawed sperm with mitochondrial membrane potential (Mitotracker+) and intact plasma membrane (PI-) with the addition of different concentrations of resveratrol (mean $\pm$ standard error). ab Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). Trat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol.....	82
Figure 5: Number of sperm bound to bovine oviduct explants with the addition of different concentrations of resveratrol (mean $\pm$ standard error). abc Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). Trat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol.....	84
Figure 6: BAX, BCL2-associated X protein; BCL2, B-cell lymphoma 2; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ROMO1, reactive oxygen species modulator 1; SPACA3, sperm acrosome associated 3. ^{ab} Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol.....	85

Capítulo 3 – Artículo 2

Figure 1: Image (magnification $\times 40$) showing sperm bound to a bovine oviduct explant after 30 minutes of co-incubation.....104

Figure 2: Number of sperm with addition of different concentrations of resveratrol bound post-thaw to bovine oviduct explants (mean $\pm$ standard error). Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin. Different letters differ statistically ($P < 0.05$) 110

Figure 3: Expression of the genes BAX, BCL2-associated X; BCL2, B-cell lymphoma 2; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ROMO1, Reactive Oxygen Species Modulator 1; SPACA3, Sperm Acrosome Associated 3. ab Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM niacin..... 111

Figure 4: The ROC curve (solid blue line) for comparison scenarios A (a) and B (c) is shown, with the dashed red line representing the performance of a random classifier. The histograms (b and d) display the distribution of classification probabilities for the samples in scenarios A and B, respectively. The solid lines in the histograms represent the KDE (Kernel Density Estimation) probability density for each group of samples, providing a smooth estimate of the distribution of classification probabilities.....113

Figure 5: SHAP summary plots for comparison between control and addition of 10 mM of niacin (scenario A). The parameters SPACA3, sperm bound to explants, factors related to preventing apoptosis (BAX and BCL2) and factors related to antioxidant activity (ROMO1, total ROS, OGG1, Mitotracker+, H_2O_2 , Malondialdehyde) were considered of great significance.....115

Figure 6: SHAP summary plots for comparison between control and addition of 20 mM of niacin (scenario B). The parameters SPACA 3, sperm bound to explants, BCF, ROMO1 and BAX were considered of great significance.....116

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – Artigo 1

Table 1: Primer sequence used for gene expression analysis of post-thaw equine sperm	77
Table 2: Sperm characteristics of fresh semen (n=10).....	79
Table 3: Post-thawed sperm motility and kinematic parameters evaluated by CASA system in different treatments with varying concentrations of Resveratrol.....	79
Table 4: Post-thawed sperm morphology with resveratrol addition (mean $\pm$ standard error)...	80
Table 5: Percentage of post-thawed sperm with functional sperm membrane (HOST+), and intact plasma membrane (PM) and spontaneous acrosome reaction (RA) with resveratrol addition (mean $\pm$ standard error).....	81
Table 6: Post-thawed sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+), hydrogen peroxide (H ₂ O ₂ , μ M/ μ g of protein), nitrite (NO ₂ ⁻ , μ M/ μ g of protein), and malondialdehyde (nM/ml of TBARS/mL) concentration and fluorescence intensity (AU) of total reactive oxygen species (ROS, mean $\pm$ standard error).....	82
Table 7: Percentage of post-thawed sperm DNA integrity with different resveratrol concentrations using CMA3 and Toluidine Blue (mean $\pm$ standard error).....	83

Capítulo 3 – Artigo 2

Table 1. Primer sequence used for gene expression analysis of post-thaw equine sperm.....	105
Table 2: Post-thaw sperm motility and kinematics parameters evaluated by the CASA system in different treatments with varying concentrations of niacin.....	107
Table 3: Percentage of post-thaw sperm with the addition of different concentrations of niacin with normal morphology and defects (mean $\pm$ standard error).....	108
Table 4: Percentage of sperm with functional sperm membrane (HOST+), intact plasma membrane (intact PM, PI-), and spontaneous acrosomal reaction (AR) with the addition of different concentrations of niacin (mean $\pm$ standard error).....	108
Table 5: Percentage of sperm with lipid peroxidation (BODIPY +), concentration of hydrogen peroxide (H ₂ O ₂ , μ M/ μ g of protein), nitrite (NO ₂ ⁻ , μ M/ μ g of protein), and malondialdehyde	

(nM/ml of TBARS/mL), and fluorescence intensity (UA) of total reactive oxygen species (ROS) in post-thaw semen (mean ± standard error).....109

Table 6: Sperm percentage with deficiency in DNA protamination (CMA3) and chromatin decondensation (Toluidine Blue) post-thawing with the addition of different concentrations of niacin (mean ± standard error).....109

Table 7: Performance metrics of the five ML models used to classify the samples in scenarios A and B (X ±SD).....111

LSTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MP	Motilidade Progressiva
NA	Niacina
PKA	Proteína Quinase Ativa
RESV	Resveratrol
RL	Radicais Livres
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. A célula espermática	21
2.2. Plasma seminal	24
2.3. Metabolismo espermático	25
2.4. Princípios da criopreservação do sêmen	26
2.5. Componentes dos diluentes	28
2.5.1. Crioprotetores	29
2.5.1.1 Crioprotetores não penetrantes	30
2.5.1.1.1 Açúcares.....	30
2.5.1.1.2 Gema de ovo	30
2.5.1.1.3 Leite	31
2.5.1.2. Crioprotetores penetrantes	31
2.5.1.2.1. Glicerol	31
2.5.1.2.2. Etilenoglicol.....	32
2.5.1.2.3. Dimetilsulfóxido (DMSO).....	32
2.5.1.2.4. Amidas	33
2.5.2. Antibióticos.....	34
2.5.3. Tampões.....	34
2.6. Processo de criopreservação do sêmen equino	34
2.7. Estresse oxidativo	37
2.7.1. Espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio	38
2.7.1.1. Superróxido.....	38
2.7.1.2. Peróxido de hidrogênio	38

2.7.1.3. Radical hidroxila.....	38
2.7.1.4. Nitrito.....	39
2.7.2. Antioxidantes.....	39
2.7.2.1. Resveratrol.....	39
2.7.2.2. Niacina.....	42
2.8. Teste de ligação de espermatozoides a explantes de tuba uterina.....	44
2.9. Expressão gênica do espermatozoide.....	45
3 Hipóteses.....	46
4 Objetivos.....	46
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO 2.....	66
Artigo 1: Effects of resveratrol supplementation to equine sperm during semen cryopreservation	
Abstrat.....	67
1. Introduction.....	68
2. Materials and Methods.....	69
2.1 Semen Collection and Evaluation.....	69
2.2 Semen Freezing.....	69
2.3 Post-Thaw Sperm Evaluation.....	70
2.3.1 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA).....	70
2.3.2 Sperm Morphology.....	70
2.3.3 Plasma membrane functionality evaluation.....	70
2.3.4 Plasma and acrosomal membrane integrity evaluation.....	71
2.3.5 Mitochondrial membrane potential assessment.....	71
2.3.6 Sperm lipid peroxidation assessment.....	72
2.3.7 Measurement of Nitrite (NO ²⁻) Concentration.....	72
2.3.8 Measurement of Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂) Concentration.....	73

2.3.9 Measurement of Malondialdehyde Concentration.....	73
2.3.10. Measurement of Total Levels of Reactive Oxygen Species (ROS).....	74
2.3.11. Evaluation of chromatin protamination deficiency in sperm using Chromomycin A3 (CMA3).....	75
2.3.12. Chromatin condensation with Toluidine Blue	75
2.3.13. Number of equine sperm bound to bovine oviduct explants	76
2.3.14. Gene Expression Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)	77
2.3.15. Statistical Analysis.....	78
3 Results	78
4 Discussion.....	85
5 Conclusion.....	88
6 References	88
CAPÍTULO 3.....	94

Artigo 2: Niacin supplementation to the equine semen freezing extender

Abstrat	95
1. Introduction	96
2. Material and Methods.....	97
2.1 Semen Collection and Evaluation.....	97
2.2 Semen Freezing.....	98
2.3 Post-Thaw Sperm Evaluation	98
2.3.1 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA).....	98
2.3.2 Sperm Morphology	99
2.3.3 Plasma membrane functionality evaluation	99
2.3.4 Plasma and acrosomal membrane integrity evaluation.....	99
2.3.5 Mitochondrial membrane potential assessment.....	100
2.3.6 Sperm lipid peroxidation assessment.....	100

2.3.7 Measurement of Nitrite (NO ²⁻) Concentration.....	100
2.3.8 Measurement of Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂) Concentration	101
2.3.9 Measurement of Malondialdehyde Concentration.....	101
2.3.10. Measurement of Total Levels of Reactive Oxygen Species (ROS).....	102
2.3.11. Evaluation of chromatin protamination deficiency in sperm using Chromomycin A3 (CMA3).....	102
2.3.12. Chromatin condensation with Toluidine Blue	103
2.3.13. Number of equine sperm bound to bovine oviduct explants	103
2.3.14. Gene Expression Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ..	104
2.3.15 Statistical Analysis.....	105
2.4. Machine Learning modeling.....	106
3 Results	107
4 Discussion.....	117
5 Conclusion	119
6 References	120
Supplemental Figure	126
1 ANEXO I – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	127

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil vem se desenvolvendo muito nos últimos tempos, sendo que certos segmentos, como os esportes, possuem representatividade internacional. O turismo rural é outra área que vem ganhando adeptos, aumentando as opções de renda com a utilização do cavalo. (Lima *et al.*, 2012). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), baseados no Censo Agropecuário e na Pesquisa Pecuária Municipal, Minas Gerais continua sendo o principal estado criador de equinos, seguido por Rio Grande do Sul, Bahia, Goiás e São Paulo (MAPA, 2016).

Segundo Ginther et al (1992) a espécie equina possui os menores índices de fertilidade, quando comparada com as demais espécies domésticas. Parte desse resultado está relacionada com o fato de que nesta espécie, na maioria das vezes, não ocorre uma seleção por fertilidade (Merkt, 1986). O aumento da demanda nos sistemas de criação equina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitassem um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo da espécie (Brandão, 2008).

O resfriamento e a criopreservação do sêmen são biotecnologias comumente usadas para a preservação dos espermatozoides e da fertilidade de animais domésticos a longo prazo (Hezavehei et al, 2018). A criopreservação do sêmen proporciona várias vantagens como aumento da longevidade do espermatozoide, facilita os trabalhos de reprodução assistida, permite o armazenamento de sêmen de garanhões com comprovada superioridade genética fora e dentro da estação de monta, e quebra de barreiras geográficas, o que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (Barreto et al., 2008). No entanto, esses processos induzem a um estresse oxidativo, redução da qualidade e motilidade espermáticas e consequente redução da capacidade de fecundação (Alvarez e Storey 1989, Bell et al, 1993).

A principal fonte de estresse oxidativo tem sido relacionada à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados localizados nas membranas espermáticas. Isso favorece a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), (Chatterjee et al., 2001, Kim et al., 2010) durante procedimentos de congelamento e descongelamento (Moussa et al, 2002). As ROS são representadas principalmente pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila ($OH^\cdot$). Essas moléculas são geradas durante as etapas de redução de

oxigênio. As ROS têm um impacto negativo sobre a morfologia e integridade das proteínas celulares, do DNA e dos lipídios da membrana plasmática (MP, Bansal, e Bilaspuri, 2011). Uma concentração baixa e controlada de ROS é necessária para a hiperativação, capacitação, reação acrossômica e ligação a zona pelúcida do oócito (Bathgate 2011). No entanto, quando atingem níveis muito elevados, ocorre estresse oxidativo, levando a danos nos espermatozoides (Bansal, e Bilaspuri, 2011).

No ejaculado, os níveis de ROS são controlados por um equilíbrio entre sua produção celular e o catabolismo de compostos antioxidantes. Este é mantido pelas moléculas antioxidantes, estabilizadores de membrana e açúcares contidos no plasma seminal (Maxwell e Johnson, 1999). Entretanto, durante o procedimento de diluição e resfriamento, o sêmen fica exposto a um estresse mais acentuado. Isso ocorre devido aos espermatozoides não possuírem reservas suficientes de antioxidantes naturais para reduzir o impacto negativo das ROS. Estas induzem a peroxidação lipídica (LPO) durante a preparação do espermatozoide para criopreservação (Aurich et al, 1997). A maior parte da produção de ROS ocorre nas mitocôndrias durante o mecanismo de fosforilação oxidativa (Collodel et al, 2011). A criopreservação tem sido correlacionada aos danos na MP do espermatozoide decorrentes das mudanças de temperatura, formação de gelo intra e extracelulares e estresse osmótico (Di Santo et al., 2012). Os níveis de ROS no sêmen aumentam significativamente durante o processo de criopreservação (Bathgate, 2011).

Para reduzir o estresse oxidativo que ocorre ao espermatozoide durante o processo de criopreservação do sêmen, antioxidantes têm sido suplementados aos diluidores (Naijian et al, 2013). Antioxidantes, como o resveratrol e niacina foram adicionados aos diluentes de sêmen bovino (Sariözkan et al, 2009), equino (Nouri et al, 2018), canino (Andersen et al, 2018), ovino (Aisen et al, 2002) e suíno (Estrada et al, 2017) aumentando a qualidade espermática pós-descongelamento.

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol que pertence aos estilbenos dietéticos, uma classe de compostos que exibe atividades biológicas significativas de interesse medicinal. Este composto é um dos polifenóis mais conhecidos e investigados encontrados na natureza, produzido por mais de 70 tipos diferentes de plantas e está presente no vinho tinto e em vários extratos botânicos (Gambini et al, 2015). Em células somáticas, tem atividade antioxidante como redução da produção de ROS mitocondriais, dos radicais superóxido, da peroxidação lipídica, e regulação da expressão de enzimas e cofatores antioxidantes (Pervaiz e Holme, 2009). A adição de resveratrol a diluidores de congelamento melhorou a motilidade espermática

e a atividade mitocondrial de touros (Bucak et al, 2015) e reduziu o dano ao DNA do espermatozoide humano (Garcez et al, 2010).

A niacina (NA, vitamina B3, ácido nicotínico, niacinamida) é um precursor da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Este é utilizado na síntese de ácidos graxos e produção de esteroides com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitrombóticos (Jacob et al, 2006). Kim et al. (2015) mostraram que o tratamento com 5 e 10 mM de NA no sêmen melhorou a crioassistência e a qualidade dos espermatozoides de suínos. Em combinação com ácido fólico, a NA exibiu um efeito crioprotetor em espermatozoides humanos (Rarani et al 2019).

A espécie equina apresenta índice variável de fertilidade com a inseminação artificial principalmente com sêmen criopreservado. Por isso, o desenvolvimento de alternativas para maximizar o sucesso da reprodução equina com sêmen congelado é de grande importância. A adição de antioxidantes e potenciadores da motilidade espermática a diluidores de sêmen pode ser uma opção melhorar a qualidade do sêmen congelado equino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A célula espermática

O espermatozoide equino é uma célula altamente especializada constituído de duas partes morfológicas e funcionalmente distintas: a cabeça e a cauda (Meyers, 2009, Amann e Pickett, 1987). A principal característica da cabeça é o núcleo achatado, contendo cromatina altamente condensada que codifica a informação genética. Esta formação é resultado da interação do DNA com protaminas, as quais substituem as histonas e são responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina espermática (Hafez, 2004). Na extremidade da cabeça do espermatozóide tem-se o acrossoma, uma vesícula que recobre dois terços da superfície da cabeça do espermatozoide e a qual contém enzimas hidrolíticas, tais como acrosina, hialuronidase e outras hidrolases e esterases. Estas enzimas são essenciais na lise da zona pelúcida que reveste o oócito, permitindo a penetração da corona radiata (Chlopik e Wysokińska, 2020).

A cauda do gameta masculino é composta de colo e peças intermediária, principal e terminal (Hafez, 2004). A cauda é a parte mais longa do espermatozoide (55µm) sendo formada pela

peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária caracteriza-se pela presença de um grande número de mitocôndrias dispostas em formato helicoidal que envolvem o axonema e as fibras externas densas, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática. Em mamíferos, o axonema consiste em um par central de microtúbulos circundado por nove pares de microtúbulos periféricos, localizado na região central da cauda sendo responsável pela movimentação espermática (Chlopik e Wysokińska, 2020). O par de microtúbulos centrais conecta-se entre si através de pequenas pontes compostas por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (Warner, 1976, Olson e Linck, 1977, Alberts, 2004). O ATP produzido pelas mitocôndrias é degradado pelas ATPases presentes na dineína. Consequentemente, ocorre a transformação da energia química na forma de ATP em energia cinética através do deslocamento de microtúbulos adjacentes uns sobre os outros. Isto resulta na dobra do axonema, iniciando o movimento flagelar (Mortimer, 1997).

Estruturas membranosas fazem parte da constituição do espermatozoide, tais como a membrana plasmática, acrossômica externa e interna, nuclear e a membrana mitocondrial. Nos espermatozoides, a membrana plasmática segue o modelo estrutural de bicamada fosfolipídica e proteínas associadas (Chlopik e Wysokińska, 2020; Fig. 1, Arquivo pessoal). Ela também desempenha papel fundamental na fertilização, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenamento no epidídimo, ejaculação, ligação ao trato genital feminino e, capacitação e penetração do oócito (Cunha, 2002). Os lipídios das membranas são em sua maioria fosfolipídios, glicolipídios e colesterol. A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide (Amann e Graham, 1992; Andrade et al, 2011), sendo que no equino sua composição lipídica é de aproximadamente 57% de fosfolipídios, 37% de colesterol e 6% de glicolipídios (Gadella *et al.*, 2001).

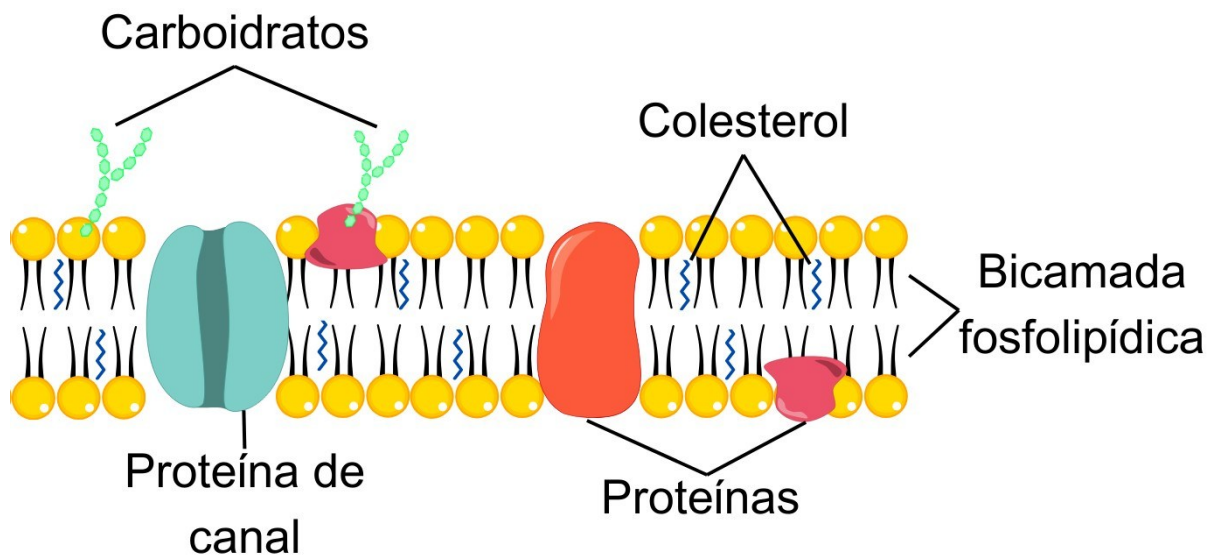


Figura 1: Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido” (Arquivo pessoal)

A membrana plasmática dos espermatozoides contém grandes quantidades de fosfolípidios e, em sua estrutura são encontrados colesterol e glicoproteínas (Chlopik e Wysokińska, 2020). A fluidez da membrana depende de alguns fatores, como temperatura, concentração de colesterol e o grau de saturação lipídica (Andrade et al, 2011). Os ácidos graxos saturados garantem maior rigidez, enquanto que os insaturados conferem maior fluidez a membrana (Andrade et al, 2011).

A proporção entre colesterol e fosfolípidios com cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, bem como a natureza dos fosfolípidios determinam a fluidez da membrana. No espermatozoide equino essa proporção é de 0,36, um valor médio em comparação a outras espécies (0,45 bovino, 0,99 humano e 0,26 suíno) (Amann e Graham, 1992; Parks e Graham, 1992). O colesterol estabiliza a membrana plasmática de tal forma que quanto maior a concentração de colesterol presente, menos fluída e flexível é esta área da membrana. Porções da membrana plasmática com maior proporção de colesterol são mais resistentes às mudanças de temperatura. Os espermatozoides da espécie equina são mais sensíveis ao choque térmico durante a redução da temperatura porque possuem relativamente pouco colesterol na sua membrana plasmática (Amann e Picket, 1987).

Os componentes das membranas acrossômicas interna e externa, do núcleo e mitocondriais são os elementos mais suscetíveis aos danos causados pela redução brusca de temperatura (Amann; Graham, 2011). Os espermatozoides submetidos ao resfriamento sofrem mudança irreversível, caracterizada por perda de motilidade, danos na membrana acrossômica e plasmática, aumento

na permeabilidade, redução do metabolismo e perda de componentes celulares (Graham, 1996). Os principais danos sofridos pela célula no processo de criopreservação ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento. Assim, uma taxa de resfriamento e aquecimento adequada e a adição de diluentes são necessárias para prevenir danos causados à membrana, pelo choque térmico (Amann e Pickett, 1987).

2.2. Plasma Seminal

O plasma seminal é uma secreção produzida pelos epidídimos, ampolas dos ductos deferentes, próstata, vesículas seminais e bulbouretrais (Varner et al., 1987). Ele atua como o fluido que envolve os espermatozoides no ejaculado, desempenhando um papel crucial na sobrevivência e transporte dessas células pelos órgãos genitais masculinos e femininos (Mann e Lutwak-Mann 1981). Esse fluido é complexo e composto por uma alta porcentagem de água, íons inorgânicos, ácido cítrico, açúcares, sais orgânicos, prostaglandinas e uma variedade de proteínas. Essas proteínas atuam como um tampão para manter o pH e osmolaridade adequados, além de fornecer fontes de energia para os espermatozoides, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. O plasma seminal também contém antioxidantes importantes para a preservação dos espermatozoides durante a criopreservação (Hofner et al, 2020). Estes são o ascorbato, urato, grupos tióis, glutathione, α -tocoferol, e enzimas como catalases, superóxido dismutase e glutathione redutase (Hofner et al, 2020).

As proteínas presentes no plasma seminal têm influência na maturação espermática, estabilização da membrana, capacitação dos espermatozoides e interação com as secreções da tuba uterina (Topfer-Petersen et al., 1998; Gwathmey et al., 2016). No entanto, há controvérsias quanto aos efeitos positivos e negativos do plasma seminal na função espermática durante a criopreservação do sêmen dependendo da espécie. (Alvarenga et al., 2017). Essas variações podem ser explicadas pelas diferentes composições de proteínas do plasma seminal entre as espécies (Leahy et al., 2010).

Estudos destacaram o efeito deletério do plasma seminal no resfriamento e congelamento do sêmen equino (Alvarenga et al., 2017; Alghamdi et al., 2019). A motilidade espermática total apresenta-se mais alta quando o sêmen é criopreservado com baixas taxas de plasma seminal (aproximadamente 5%), comparado a altas taxas (10% - 30%) (Alvarenga et al., 2017; Alghamdi et al., 2019). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) recomenda a retirada de todo o plasma seminal para o congelamento de sêmen equino. No entanto, Brinsko

et al. (2000) sugerem que a presença de pequena porcentagem de plasma seminal é necessária para o armazenamento do sêmen e a fertilidade, devido ao seu papel antioxidante.

2.3. Metabolismo espermático

O espermatozoide maduro possui três regiões altamente especializadas: 1) a cabeça contendo o DNA, 2) a peça intermediária com as mitocôndrias, envolvida na produção de energia, e 3) o flagelo responsável pela motilidade celular. No entanto, após a ejaculação o espermatozoide não está apto à fecundação, sendo necessário passar por uma série de mudanças metabólicas e na membrana plasmática (MP) durante seu trajeto através do trato reprodutivo feminino. Estas mudanças fazem parte de um processo denominado capacitação espermática (Mortimer *et al.*, 1998).

Os espermatozoides são células flagelares, com movimento próprio e metabolicamente ativas (Piomboni *et al.*, 2012). A manutenção das funções espermáticas depende do consumo de substratos energéticos obtidos com base no plasma seminal. A via glicolítica e a fosforilação oxidativa são as vias metabólicas de utilização desses substratos (Chlopik e Wysokińska, 2020). A célula espermática requer uma produção permanente de ATP para manter a estrutura celular, composição iônica intracelular e motilidade. Quando o espermatozoide é expulso do epidídimo e entra em contato com as secreções das glândulas sexuais acessórias, a adenililciclase solúvel é ativada e gera o aumento das concentrações intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc, Chen *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2007). O AMPc é um mensageiro celular responsável pela ativação de proteínas quinase que fosforilam uma série de outras proteínas que atuam sobre diferentes rotas metabólicas e, consequentemente, sobre a função celular. Portanto, o metabolismo espermático, de forma geral, está diretamente relacionado à concentração interna de AMPc (Simpson e White, 1987). A motilidade espermática, assim como o processo de capacitação, hiperativação e reação acrossômica, são regulados pelas vias de sinalização do AMPc, a qual é dependente de energia (Darszon *et al.*, 1999). Este primeiro padrão de motilidade espermática é caracterizado por batimentos flagelares simétricos e de baixa amplitude que produzem uma trajetória de movimentação linear (Olson *et al.*, 2011).

A motilidade espermática ocorre em razão da atividade motora de proteínas do axonema localizadas no flagelo, as quais são ativadas por tirosina quinases. Esse processo é dependente de AMPc que ativa a *proteína* quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, atua em múltiplas vias de controle da função flagelar baseada na ativação de vias de tirosina quinase, as quais serão

responsáveis pela fosforilação de proteínas localizadas no flagelo, resultando na motilidade do espermatozoide (Leclerc, Lamirande, Gagnon, 1997)

2.4. Princípios da criopreservação do sêmen

O processo de criopreservação do sêmen permite o armazenamento das células espermáticas por longos períodos contribuindo para a comercialização do sêmen independentemente do tempo de transporte e do local onde estão o garanhão e a égua, e para a preservação do sêmen de animais de alto valor zootécnico (Barreto *et al.*, 2008). Suas vantagens incluem a maximização da utilização de garanhões premiados e a redução nos custos de transporte das éguas, bem como a redução do potencial de transmissão de doenças (Miller, 2008). Contudo, este tipo de processo gera diversos danos aos espermatozoides, os quais por sua vez comprometem a viabilidade, a motilidade e funções fisiológicas intracelulares complexas (Roca *et al.*, 2013).

A inseminação artificial com sêmen congelado necessita de um meticuloso trabalho de controle folicular ovariano das éguas. Aliada há alta variabilidade entre garanhões à tolerância ao processo de criopreservação, muitos garanhões apresentam fertilidade reduzida com o uso do sêmen congelado (Ramires Neto *et al.*, 2016). Os garanhões são selecionados por sua constituição ou seu desempenho esportivo. Geralmente a sua fertilidade não é levada em consideração em detrimento ao seu desempenho esportivo. Desta forma, a qualidade do sêmen congelado varia muito entre os garanhões, sendo estes classificados como de boa, média ou baixa congelabilidade, de acordo com a capacidade de suportar os processos de congelamento e descongelamento (González-Fernández *et al.*, 2012).

A criopreservação do sêmen equino é um importante instrumento no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de bons reprodutores. Entretanto, os índices de fertilidade obtidos com sêmen criopreservado de equinos ainda estão muito abaixo dos obtidos com sêmen resfriado (Ramires Neto *et al.*, 2016). A redução da taxa de fertilidade observada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos ocorridos pelas mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana espermática, toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico (Watson, 2000).

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37° a 20° C), o que parece não ocasionar danos aos espermatozoides quando estes se encontram diluídos em meio adequado (Keith, 1998). O estresse inicial se dá quando o espermatozoide passa da temperatura corporal para 5°C (Squires et al., 1999). Isto se dá devido à fase de transição da membrana plasmática, do estado líquido cristalino para o estado de gel (Graham, 1996, Medeiros, 2002). Este efeito pode ser minimizado pelo controle da taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19° a 8° C, pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (Graham, 1996), além do uso de curvas de resfriamento adequadas (Sancler-Silva e Monteiro, 2019). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, as células sofrem um fenômeno conhecido como choque térmico, o qual induz danos irreversíveis aos espermatozoides, que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade, longevidade, danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (Graham, 1996, Squires et al., 1999).

Quando o sêmen é congelado abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares começam a se formar. Isto resulta em um aumento da concentração de sais no meio extracelular (Vidament *et al.*, 2000). Consequentemente, a água sai do meio intra para extracelular, levando a desidratação espermática. Devido a presença da MP, a água intracelular do espermatozoide congela posterior e abaixo do ponto de congelamento extracelular. Se não houver saída de água suficiente do meio intracelular, haverá a formação de gelo no interior do espermatozoide, o qual danifica a MP levando a morte celular (Ricker *et al.*, 2006; Silva e Monteiro, 2019). Se a taxa de congelamento for muito lenta, a elevada concentração de sais intracelular pode causar um efeito tóxico para o espermatozoide. O sucesso do processo do congelamento também é influenciado pela curva do processo de descongelamento. Em termos gerais, se a taxa de congelamento for rápida (-60°C/min), a taxa de descongelamento também deve ser rápida (4000°C/min). Por outro lado, se a taxa de congelamento for lenta (-10°C/min) a taxa de descongelamento também deverá ser lenta (700°C/min, Amann e Pickett, 1987, Fig. 2, Arquivo pessoal).

As taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de 3 categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (>1,0°C/min). Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min, sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 3 cm acima do vapor de nitrogênio (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984).

A taxa de descongelamento do sêmen envasados em palhetas é convencionalmente controlada pela temperatura da água de descongelamento e pela duração da exposição da palheta à água. Amann e Pickett (1987) concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5 ml, deve ser feito à temperatura de 37°C por 30 segundos levando a uma curva de descongelamento de 700°C/min.

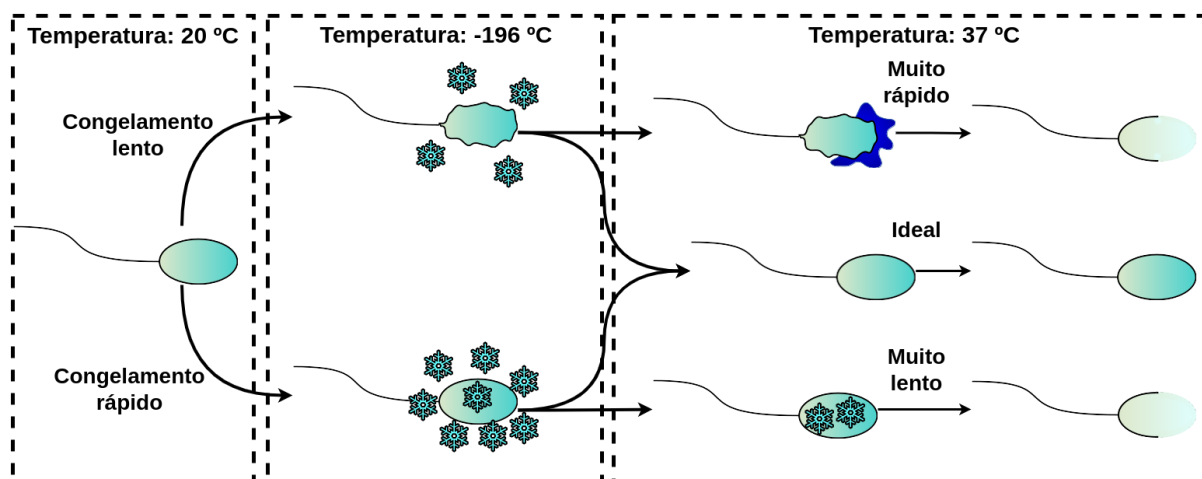


Figura 2: Representação esquemática das mudanças físicas do espermatozoide equino durante o congelamento (Arquivo pessoal).

Dentre outros efeitos deletérios da criopreservação de sêmen ocorre redução da viabilidade, queda do potencial de membrana mitocondrial e redução da motilidade após o descongelamento (Flesch e Gadella, 2000; Vidament *et al.*, 2000; Ramires Neto *et al.*, 2016). Durante o processo de congelamento, os espermatozoides são submetidos a um estresse osmótico. Isso ocorre no momento que os diluidores de congelamento são adicionados e posteriormente no descongelamento. Visando minimizar o choque osmótico, além de curvas adequadas, agentes crioprotetores são adicionados aos diluidores de congelamento (Ricker *et al.*, 2006; Alvarenga *et al.*, 2016).

2.5. Componentes dos diluentes

Como forma de otimizar a qualidade do sêmen e protegê-lo, deve-se acrescentar diluentes ao sêmen com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos do congelamento (Coelho e Dias, 2021). Assim, devem ser adicionados crioprotetores e macromoléculas que terão função de proteger a membrana plasmática das possíveis injúrias (Aidar, 2013), também,

deve-se adicionar fonte de energia para o metabolismo espermático e meio tampão para manutenção do pH (Parks e Graham, 1992; Aidar, 2013). Um diluidor ideal deve propiciar pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides, combinação de nutrientes, capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos, substâncias com capacidade protetora para as alterações de temperatura, capacidade de estabilizar membranas e sistema enzimático, ambiente livre de microorganismos patogênicos, baixo custo, não oferecer toxicidade ao espermatozoide, baixa irritabilidade ao sistema genital e fácil aquisição (Amann e Pickett, 1987; Canisso et al., 2008; Oliveira et al., 2013). Faz-se necessário ressaltar que, a composição adequada para um diluidor seminal não depende apenas de uma adequada concentração de crioprotetores, tanto intra como extracelulares, mas de uma combinação adequada de todas as substâncias que são utilizadas, levando-se em consideração a fonte de energia para os espermatozoides, as substâncias não iônicas, o tipo de macromoléculas e a concentração e o tipo ideal de crioprotetor (Snoeck et al, 2007).

2.5.1. Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência dos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento, seu mecanismo de ação consiste na redução do ponto de solidificação da solução, promovendo um maior tempo para a desidratação da célula, assim reduzindo a formação dos cristais de gelo intracelulares (Silva e Monteiro, 2019). Embora os crioprotetores sejam essenciais ao processo de congelamento dos espermatozoides, eles podem apresentar efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando em concentrações elevadas (De Vita, 2006). Devido aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, eles não garantem a sobrevivência de 100% dos espermatozoides, dependendo da concentração utilizada do crioprotetor no meio diluidor (Fürst, 2006).

Os crioprotetores podem ser classificados, de acordo com sua penetrabilidade ou capacidade de atravessar a membrana celular em não-penetrantes (macromoléculas: proteínas do leite e gema de ovo, sacarose, carboidratos: glicose, lactose, manose, rafinose, trealose dentre outros) e penetrantes (moléculas de baixo peso molecular: glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanodiol, acetamidas e amidas (Mckinnon, 1996).

Os agentes crioprotetores não penetrantes são responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular, através de um efeito osmótico, induzindo a saída da água intracelular

prevenindo a formação de cristais de gelo (Oliveira et al., 2013). Além disso, promovem uma maior estabilidade a membrana plasmática do espermatozoide (Amam e Pickett, 1987). Alguns exemplos são: açúcares (lactose, frutose, rafiose ou trealose) e polímeros sintéticos (metil celulose) (Aidar, 2013; Castro et al., 2017).

Os crioprotetores penetrantes possuem um mecanismo de ação baseado em suas propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água. Estas ligações criam um ambiente menos nocivo para o espermatozoide. Consequentemente, limitam a formação de cristais de gelo, retardando seu crescimento e reduzindo as concentrações de soluto no meio intracelular (Nash, 1966, Dalimata e Graham, 1997). Alguns exemplos de crioprotetores penetrantes são: glicerol, dimetil sulfóxido, etileno glicol e propileno glicol, que podem ser utilizados individualmente ou em associação (Aidar, 2013).

2.5.1.1. Crioprotetores não penetrantes

2.5.1.1.1. Açúcares

A atuação dos açúcares, açúcares (lactose, frutose, sacarose, rafinose, trealose) como parte dos diluentes, ocorre através da pressão osmótica, promovendo a desidratação celular, reduzindo a água que seria congelada do interior da célula, diminuindo, também, os problemas que são causados pela formação de cristais de gelo durante o congelamento (Aisen et al., 2002, Aidar, 2013). Além disso, o açúcar tem função de atuar como substrato energético para o espermatozoide e proteção à membrana plasmática durante o processo de congelamento/descongelamento (Fürst, 2006, Aidar, 2013). Geralmente, os dissacarídeos, sacarose e trealose, são mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (De Leeuw, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida na ausência de água, inibindo os danos causados pela desidratação extrema. (Anchordoguy et al., 1987, Crowe et al., 1987) inibindo os danos causados pela desidratação extrema.

2.5.1.1.2. Gema de ovo

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico (Oliveira et al., 2021). Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana do espermatozoide (Moussa et al., 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, consequentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (Farstad, 2009). Os fosfolípidos que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C (Ferrer et al., 2020)

2.5.1.1.3. Leite

O leite é um dos diluentes mais utilizados, talvez pelo fato de possuir lipoproteínas parecidas com as da gema do ovo, promovendo proteção da membrana plasmática (Amann e Graham, 1992). As proteínas do leite podem estabilizar elementos proteicos da membrana espermática, a caseína, liga-se fortemente com os íons cálcio, impedindo o acúmulo de quantidade tóxica de cálcio intracelular, levando a danos na membrana, além disso, o leite também possui lactenina, que é uma proteína de baixo peso molecular (Aidar 2013). A eficiência das proteínas do leite na criopreservação do sêmen se assemelha a da gema, devido à composição proteica que atua como tampão, além de possuir propriedade quelante de metais pesados, contribuindo para minimização dos danos causados durante o congelamento (Nikitkina et al., 2020). Além disso, já se verificou a existência de diferenças significativas quanto ao uso do leite desnatado e integral na qualidade do sêmen conservado, evidenciando que não são os lipídeos do leite os responsáveis pela proteção (Motta, 2010).

2.5.1.2. Crioprotetores penetrantes

2.5.1.2.1. Glicerol

O glicerol tem sido o crioprotetor mais empregado para a criopreservação de espermatozoides da maioria dos animais domésticos (Amann e Pickett, 1987), inclusive para o equino (Vidament et al. 1997). O glicerol é um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxila, os quais se ligam fortemente com o hidrogênio das moléculas de água (Oliveira et al., 2021), assim

tornando a desidratação do espermatozoide mais lenta durante o congelamento (Fürst, 2006, Consuegra, 2019). Os efeitos protetores do glicerol são representados por suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelamento e pela consequente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra. Inicialmente, o glicerol ocasiona um estresse osmótico na célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (Oliveira et al., 2021). Por outro lado, em alta concentração o glicerol apresenta efeitos deletérios, os quais incluem estresse osmótico, mudanças na organização, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (Watson, 2000).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozoide é espécie dependente, e varia de acordo com a curva de congelamento, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase. Em bovinos, varia entre 7 a 9%, nos caprinos, de 3 a 4%, em cães varia de 2 a 10% e em humanos é congelado com 5 a 10 % (Farstad, 1996). Em equinos, existem grandes variações nas concentrações de glicerol utilizadas, mas se considera necessário o uso de um percentual inferior ao utilizado para bovinos (Keith et al., 1998). Em estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores, dentre eles etileno glicol, dimetilformamida e dimetilsulfóxido, utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões, constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetilsulfóxido, que determinou resultado inferior (Alvarenga et al., 2017).

2.5.1.2.2. Etilenoglicol

O etilenoglicol é um álcool, com quatro pares de elétrons isolados, os quais têm a possibilidade de ligação com os átomos de hidrogênio (Keith, 1998, Oliveira et al., 2013). Alvarenga et al. (2000) promoveram um estudo comparativo entre o glicerol e o etilenoglicol, demonstrando ação semelhante entre eles e quando combinados possibilitou a redução do glicerol, logo, diminuindo seu efeito tóxico.

2.5.1.2.3. Dimetilsulfóxido (DMSO)

O dimetilsulfóxido é muito utilizado como crioprotetor por penetrar rapidamente na membrana plasmática (Candeias, 2010). No entanto, o DMSO causa alterações na membrana, danificando e inviabilizando as células (Candeias, 2010). O DMSO atua como molécula eletricamente

carregada, interagindo com os grupos fosfato das membranas interna e externa dos espermatozoides, promovendo certa proteção contra eventuais danos que possam ser causados durante a criopreservação (Castro et al., 2018). Ao serem adicionadas concentrações entre 1 e 9% de DMSO em um diluente contendo lactose, gema de ovo e citrato associado ou não ao glicerol, a célula espermática apresentou maior viabilidade pós-descongelamento, sendo este protocolo superior ao uso isolado do glicerol (Keith, 1998, Candeias, 2010). No entanto, segundo Alvarenga (2000) o DMSO tem sido menos eficiente, quando comparado com outros crioprotetores penetrantes, quanto aos parâmetros de motilidade total e progressiva.

2.5.1.2.4. Amidas

As amidas são formadas por três pontes de ligação ao hidrogênio, e são menos viscosas e menos solúveis em água, quando comparadas ao glicerol, logo tem uma menor permeabilidade a membrana. Essa característica é favorável na criopreservação, pois diminui a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (Oliveira et al. 2013, Hernández-Avilés et al., 2023).

Dimetilformamida e metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso no congelamento de sêmen equino. Seu uso para congelamento de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (Keith, 1998). No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação, manifestou melhores resultados quando comparados com o glicerol (Gomes et al., 2002).

O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (Soni et al., 2019). Assim, a associação da dimetilformamida e do glicerol, proporciona uma melhor proteção da célula espermática durante o congelamento, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós-descongelamento determinou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura. Este diluente combina os dois agentes citados, e também é enriquecido com açúcares e substratos de cultivo celular, como fontes de macromoléculas, além da presença de gema de ovo e leite desnatado, de modo que a associação destes componentes, da dimetilformamida e do glicerol foi extremamente favorável à proteção do espermatozoide equino durante o processo de congelamento (Gomes et al., 2002).

2.5.2. Antibióticos

A utilização de antibióticos nos meios diluidores é recomendada para reduzir o crescimento bacteriano durante a manipulação do sêmen, no entanto, esses antibióticos não devem interferir na qualidade do sêmen ou prejudicar a microflora vaginal (Aidar, 2013). Para isso são utilizados vários antibióticos como penicilina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, entre outros, além da associação entre estes, que atuam como bactericida de amplo espectro (Nogueira, 2010).

2.5.3. Tampões

Como o metabolismo espermático funciona de forma contínua, produzindo grandes quantidades de catabólitos tóxicos, alterando o PH e podendo ocasionar a morte dos espermatozoides, torna-se necessário o uso de tampões nos diluidores de sêmen (Aidar, 2013). Primeiramente foi testado o fosfato para este fim, porém, o citrato de sódio possui maior eficiência para tal função, aumentando, ainda, a capacidade de diluição da gema de ovo ao meio líquido, favorecendo sua ação sobre as células (Holt, 2000).

2.6. Processo de criopreservação de sêmen equino

O sêmen equino normalmente é coletado com o auxílio de uma vagina artificial (Amann e Pickett, 1987, Hafez, 1995). Em seguida, são avaliadas a coloração e aspecto do ejaculado, e com auxílio da microscopia, características como motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração espermáticas (Hafez, 1995). Para a criopreservação, deve-se selecionar ejaculados que apresentem no mínimo 50% de motilidade progressiva e 60 milhões espermatozoides/ml (Jasko, 1992).

Após a adição de diluidor ao sêmen, geralmente na proporção de 1:1, é preconizada a realização da centrifugação visando dois objetivos: 1) eliminação de 90% do plasma seminal, e 2) formação de uma suspensão com alta concentração de espermatozoides (Alvarenga et al., 2017). A composição do plasma seminal pode variar entre garanhões e tal fato pode explicar a diferente congelabilidade dos espermatozoides de garanhões (Moore *et al.*, 2005). Amann e Pickett (1987) relataram que a remoção de plasma seminal antes do congelamento é necessária para a sobrevivência dos espermatozoides criopreservado e pode aumentar a motilidade dos

espermatozoides pós-descongelamento. Por outro lado, o plasma seminal contém componentes que protegem as membranas durante a criopreservação. Dentre estes estão antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Sikka, 2004). Portanto, a permanência de 10% de plasma seminal pós-centrifugação é benéfica à motilidade espermática equina pós-descongelamento (Brinsko *et al.*, 2000). Ainda assim, o processo de centrifugação pode gerar efeitos deletérios sobre os espermatozoides. Estes podem ser minimizados ao se utilizar uma baixa força centrífuga (300-400xg) por tempo adequado (10-15min) ou através da adição de um meio diluidor de sêmen prévia à centrifugação (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996). Após o processo de centrifugação, o sobrenadante é desprezado e em seguida o sedimento é ressuspensionado com o diluidor de congelamento. Para o congelamento tem se preconizado concentrações finais que variam de 100 a 200 milhões espermatozoides/ml (Jasko, 1992, Vidament *et al.*, 1997, Nascimento, 2006).

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozoides sejam preservados com diluidores apropriados (Silva e Monteiro, 2019). Os diluidores seminais reduzem a concentração de plasma seminal, controlam o pH e a osmolaridade, suprem os espermatozoides com nutrientes, antioxidantes, antimicrobianos, e protegem o espermatozoide contra o choque térmico durante o armazenamento. Na sua composição possuem uma série de componentes básicos como a água (solvente), tampões e substâncias não iônicas (manutenção da osmolaridade e pH do meio); macromoléculas da gema do ovo e do leite (previnem o choque térmico, carboidratos (fonte de energia), antibióticos (controlam o crescimento microbiano); detergentes (emulsificam os lipídios presentes na gema de ovo, permitindo melhor interação entre esses componentes e a membrana plasmática), quelantes que se ligam ao cálcio e ao magnésio (limitam o movimento de íons bivalentes por meio da membrana, impedindo que penetrem nas células espermáticas e as danifiquem durante o choque térmico (Amann e Pickett, 1987). Independente do protocolo ou técnica de congelamento utilizada faz-se necessário o uso de crioprotetores durante o congelamento e o descongelamento. O leite age como crioprotetor, estando presente na composição de vários diluidores de resfriamento e congelamento de sêmen (Aurich *et al.*, 1997). Diluidores a base de leite desnatado são rotineiramente utilizados na criopreservação do sêmen equino. Estudos indicam que os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozoide pelo leite são as micelas de caseína. Essas interagem com as proteínas BSP, e conseqüentemente reduzem a retirada de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática pelas mesmas (Bergeron e Manjunath, 2006). O fosfocaseínato mostrou-se o componente com maior influência positiva sobre o espermatozoide de garanhões

armazenados a 4°C, em relação a qualidade espermática *in vitro* e quanto a fertilidade *in vivo* (Battelier *et al.* 1997).

A gema de ovo no meio diluidor de criopreservação estabiliza a membrana espermática durante o congelamento e descongelamento ao manter a pressão coloidal do meio, e por conter lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas lipoproteínas estabilizam a membrana espermática durante o congelamento e descongelamento, e reduzem os efeitos das proteínas do plasma seminal (Oliveira *et al.*, 2021).

Atualmente, os sistemas de envasamento mais comumente utilizados são as palhetas plásticas com capacidade de 0.5mL com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (Vidament *et al.*, 1997).

As taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de três categorias: lentas, médias e rápidas, segundo Douglas-Hamilton *et al.* (1984), variando de acordo com o diluidor utilizado. De acordo com Amman e Pickett (1987) na maioria dos protocolos para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min., sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, três cm acima do vapor de nitrogênio, durante 20 minutos. Estes pesquisadores também concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5 ml, deve ser feito à temperatura de 37° C por 30 segundos. Dentre os tipos de curvas de congelamento utilizadas, na curva lenta os espermatozoides sofrem danos por excessiva desidratação da célula, impedindo a formação de cristais de gelo intracelular, porém altas concentrações de soluto podem gerar lesões nas células. Se congelados muito rápido, os espermatozoides não perdem água suficiente, provocando a formação de cristais de gelo intracelular, que geram danos irreversíveis. Sendo assim a curva de congelamento deve ser suficientemente lenta para permitir a saída de água de dentro da célula evitando os cristais de gelo, e suficientemente rápida para minimizar os danos causados pela exposição prolongada a concentrações altas de solutos (Watson, 1995).

O processo de descongelamento depende do método em que o sêmen foi congelado, a curva de aquecimento deve acompanhar a velocidade com que ocorreu o congelamento. Assim se a curva de congelamento utilizada foi lenta, a de descongelamento também deve ser lenta, permitindo a reidratação da célula e quebrando os cristais de gelo intracelulares, e vice e versa, caso o sêmen tenha sido congelado rapidamente, também deve ser descongelado na mesma velocidade possibilitando assim que o gelo intracelular formado não tenha tempo de recrystalizar (Amman e Pickett, 1987).

As máquinas de congelamento automático e programáveis surgiram com o intuito de facilitar e objetivar o processo de criopreservação. Estão sendo utilizadas por serem convenientes para o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de controlar a taxa de congelamento. O benefício do congelamento automatizado é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5° C por 4 min., de -5 a -110° C por 25 min. e de -110 a -140° C por 35 min. e, somente então, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (Purdy, 2006).

O sucesso da criopreservação do sêmen em equinos, depende de diversas etapas que determinarão se a célula será viável ao final da criopreservação (Alvarenga et al., 2017). Esse sucesso está condicionado à qualidade do sêmen fresco e suas interações com o diluidor e com os crioprotetores e com as curvas de congelamento e descongelamento utilizadas, variáveis essas com grande influência racial e individual entre garanhões (Silva e Monteiro, 2019).

2.7. Estresse oxidativo

O processo de criopreservação das células espermáticas consiste em armazenar o sêmen à uma temperatura de -196° C de forma a estagnar o metabolismo espermático, aumentando assim a longevidade da célula (Silva e Monteiro, 2019). Porém, todo o processo de criopreservação, como diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento, pode levar a um estresse oxidativo, reduzindo a qualidade espermática e capacidade de fertilização na inseminação artificial (Lecewicz, 2018). Há pouca reserva de antioxidante no citoplasma e a presença de ácidos graxos poli-insaturados susceptíveis à peroxidação lipídica na membrana espermática (Vieira, 2018).

O estresse oxidativo ocorre quando a concentração de oxidantes ultrapassa a de antioxidantes (Aitken, 1994). Os termos radicais livres (RL), oxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS), são usados para identificar os intermediários químicos originários do metabolismo do oxigênio, ou seja, os subprodutos do metabolismo aeróbico (Maia et al., 2009). Em condições aeróbicas, a produção de ROS é um evento fisiológico, sendo que, estes metabólitos são essenciais para o funcionamento das células, geralmente atuando como gatilhos fisiológicos (Garrido et al., 2004). Normalmente a redução completa do oxigênio ocorre na mitocôndria, através de uma reação tetravalente aceitando quatro elétrons e formando água. Nessa condição, a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (Nordberg e Arnér, 2001).

As ROS são encontradas em baixas concentrações, atuando como mediadores das funções espermáticas normais, entretanto, quando são produzidas em excesso, elas são altamente tóxicas às células espermáticas (Michael et al., 2007). Provavelmente a presença de ROS está relacionada a condições fisiológicas relacionadas aos processos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica e outros ainda não elucidados. Os espermatozoides possuem sistemas sensivelmente regulados para manter as ROS em concentrações basais, em que a produção e eliminação são precisamente balanceadas (Lushchak, 2014).

2.7.1. Espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio

Os três principais tipos de ROS são superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\bullet$) (Andrade et al., 2010).

2.7.1.1. Superóxido

O superóxido é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória. É pouco reativo, pois não penetra as membranas lipídicas, agindo apenas na região onde é produzido (Nordberg e Arnér, 2001).

2.7.1.2. Peróxido de hidrogênio

A formação do peróxido de hidrogênio ocorre quando a molécula de oxigênio recebe somente dois elétrons ao invés de quatro, e com isso também é parcialmente reduzido como o radical superóxido (Gaté et al., 1999). O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o $OH^\bullet$ (Andrade et al., 2010).

2.7.1.3. Radical hidroxila

Radical hidroxila é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. (Andrade et al., 2010). O radical hidroxila é

gerado através da Reação de Fenton, a partir do H_2O_2 em excesso, que é catalisado por metais de transição, como por exemplo, ferro e cobre (Maia et al., 2009). Molécula altamente reativa em sistemas biológicos, e reage rápido com estruturas que estão próximas, atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio (Nordeberg e Arnér, 2001).

2.7.1.4. Nitrito

O óxido nítrico (NO) tem função importante na fisiologia espermática (Aitken e Fisher, 1994). É uma molécula altamente reativa, de vida curta e lipofílica, com uma meia-vida de apenas alguns segundos, o que dificulta a medição (Ignarro et al., 1989). Dessa forma, seus metabólitos, nitrito e nitrato, são mais estudados. A formação de nitrito endógeno derivam tanto da oxidação de NO, como de fontes dietéticas (Bryan et al., 2007; Dejam et al., 2005). Estudos demonstraram a relação da presença de NO com a redução de ATP (Weinberg et al. 1995), e outros correlacionaram os níveis de nitrato com motilidade espermática (Ghavamzadeh et al., 2011).

2.7.2. Antioxidantes

2.7.2.1. Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol que pertence aos estilbenos dietéticos, uma classe de compostos que exhibe atividades biológicas significativas de interesse medicinal. Este composto é um dos polifenóis mais conhecidos e investigados encontrados na natureza, produzido por mais de 70 tipos diferentes de plantas e está presente no vinho tinto e em vários extratos botânicos (Gambini et al, 2015). Em células somáticas, tem atividade antioxidante como redução da produção de ROS mitocondriais, dos radicais superóxido, da peroxidação lipídica, e regulação da expressão de enzimas e cofatores antioxidantes (Pervaiz e Holme, 2009). No entanto, o papel do resveratrol na função reprodutiva masculina não está claramente estabelecido. Alguns estudos indicam que a suplementação oral com resveratrol melhora a qualidade do sêmen humano (Garcez et al 2010, Collodel et al 2011) e de animais domésticos (Ourique et al 2013, Li et al 2015). Isso parece ser possível graças a sua capacidade de atravessar a barreira hemato-testicular, conferindo efeito protetor no testículo (Aitken e Roman, 2008). A administração oral de resveratrol diminuiu a apoptose das células germinativas, aumentou a concentração sérica de testosterona e aumentou a qualidade e concentração espermática do

sêmen de homens (Revel et al, 20003, Shin et al 2008). Essas diferentes ações do resveratrol no sistema reprodutor masculino resultaram de uma estimulação direta do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, sem prejudicar a espermatogênese (Juan et al 2005).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram que o resveratrol, graças ao seu efeito protetor contra a peroxidação lipídica e danos ao DNA, melhorou a qualidade espermática durante o processo de criopreservação (Collodel et al, 2011).

O resveratrol tem como funções benéficas a capacidade de reduzir a produção de ROS na mitocôndria, eliminar radicais superóxido, incluindo ânion superóxido, radical hidroxila e radicais induzidos por metal, inibir peroxidação lipídica e regular a expressão de cofatores e enzimas antioxidantes (Pervaiz e Holme, 2009, Leonard et al, 2003).

Apesar do efeito positivo do resveratrol na proteção dos espermatozoides do estresse oxidativo, os mecanismos de ação ainda são objeto de debate. Em vários estudos, foi demonstrado que o resveratrol ativa a via AMPK de espermatozoides. A AMPK é uma quinase chave envolvida na regulação do estado redox celular, alterando a via metabólica sob condições estressantes (Takeo et al, 2014). Foi observado que o resveratrol ativou a AMPK de células somáticas *in vitro* (Hawley et al, 2010). Em espermatozoides humanos, foi demonstrado que proteínas quinases ativadas por AMP estão presentes principalmente por todo o flagelo e na região pós-equatorial da cabeça (Nashtaei et al, 2017). Relacionado a essas descobertas a suplementação de resveratrol aumentou a atividade da AMPK e foi benéfica para proteção contra estresse oxidativo induzido por criopreservação de espermatozoides humanos e melhorando a integridade do DNA (Nashtaei et al, 2017). Resultados semelhantes foram obtidos em espermatozoides suínos (Zhu et al, 2019) e caprino (Zhu et al, 2018). Em ambos os estudos, a adição de resveratrol ativou a fosforilação da AMPK, permitindo a redução da produção de ROS. Ao mesmo tempo, o resveratrol melhorou o sistema de defesa antioxidante do espermatozoide, regulando o nível de glutathiona (GSH), atividade de glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase. Consequentemente a redução do nível de ROS, a motilidade, integridade da membrana e do acrossoma, e atividade mitocondrial espermáticas foram restauradas, reduzindo a apoptose e danos ao DNA espermático (Zhu et al, 2019).

A proteína quinase ativada por AMP é considerada uma serina/treonina quinase que controla o metabolismo celular e atua como um sensor-chave do estado de energia celular. Essa proteína

age por meio da estimulação de processos catabólicos e inibição de processos anabólicos (Hardie et al, 2003). O que sugere que a AMPK pode atuar como uma molécula fundamental na adaptação dos espermatozoides à criopreservação. Recentemente, a AMPK foi identificada em espermatozoide humano e equino com papel regulador na motilidade espermática e manutenção da qualidade dos espermatozoides durante o armazenamento prolongado (Hurtado de Llera et al, 2012, Córdova et al, 2014). A ativação de AMPK foi responsável pela redução dos níveis de ROS na criopreservação do sêmen de galos, restaurando o nível de ATP e o sistema antioxidante, levando a uma melhor qualidade espermática (Nguyen et al., 2015).

Na espécie ovina a suplementação de 15 µg de resveratrol ao diluente de sêmen refrigerado apresentou inibição da peroxidação lipídica espermática por 24 horas (Sarlós et al., 2002).

Em bovino, foram relatados aumento da motilidade, atividade mitocondrial, redução da fragmentação do DNA (1 mM, Bucak et al., 2015), melhora da cinemática e integridade da MP espermática com adição de Resveratrol ao diluente de congelamento de sêmen (50 µM, Assunção, 2016). A capacidade antioxidante do resveratrol foi comprovada quando espermatozoides bovinos (Tvrda, et al, 2015) e humanos (Collodel et al, 2011) foram submetidos ao estresse oxidativo induzido *in vitro*.

Foram adicionados ao diluente de congelamento de sêmen humano 0,1; 1,0 e 10 mM de resveratrol e foi observada redução da fragmentação do DNA espermático após o descongelamento (Branco et al., 2010; Garcez et al., 2010).

Em equino, o diluente de sêmen refrigerado de Kenney foi suplementado com 10, 20, 40 e 80 µM de resveratrol (Giaretta et al., 2014). Não houve diferença no momento inicial, no entanto, após 24h de resfriamento foi observada redução do potencial mitocondrial de espermatozoides com 40 e 80 µM, e da cinemática espermática com 80 µM comparados ao controle e 20 µM. As concentrações de 40 e 80 µM causaram danos aos espermatozoides, atuando como fatores pró-oxidantes. A suplementação de 1 e 10 mM de resveratrol ao diluidor de congelamento equino minimizou a produção de ROS. No entanto, não preservou a motilidade e viabilidade espermática, indicando um possível efeito citotóxico devido à alta concentração (Matheny et al., 2015). Nouri et al. (2018) selecionaram garanhões da raça árabe com baixa qualidade espermática e adicionaram 5, 10 e 20 µM no diluente de congelamento. A dose mais baixa, não influenciou em nenhum dos parâmetros avaliados, enquanto a dose mais alta apresentou efeito deletério sobre a motilidade total. No entanto, 10 µM de resveratrol teve função positiva sobre

a motilidade, integridade de MP, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial, produção de ROS e fragmentação de DNA espermáticos (Nouri et al, 2018).

De acordo com a concentração, o resveratrol pode ter propriedade antioxidante a pró-oxidante no espermatozoide levando a resultados divergentes (Matheny et al., 2015). Além disso, sua função é influenciada pela espécie, raça, composição dos diluidores, protocolos de congelamento e variabilidade individual, o que tornam necessários mais estudos para otimizar seu uso na preservação do sêmen (Pervaiz e Holme, 2009).

2.7.2.2. Niacina

A niacina, também conhecida como ácido nicotínico (NA) e niacinamida é um composto orgânico, um vitâmero da vitamina B3 e um nutriente essencial. Pode ser produzida por plantas e animais a partir do aminoácido triptofano (Jacob et al, 2006). A niacina é obtida na dieta a partir de uma variedade de alimentos integrais e processados, com maiores teores em alimentos enriquecidos embalados, carnes vermelhas, aves, peixes como atum e salmão. A niacina como suplemento dietético é usada para tratar a pelagra, uma doença causada pela deficiência de niacina. (Jacob et al, 2006).

No sistema reprodutivo do macho, o ácido nicotínico (NA) está presente naturalmente no plasma seminal, sendo relatada a concentração fisiológica de cerca de 25 mM no sêmen de touro (White 1954; White e Lincoln, 1960).

A niacina é precursora da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e fosfato de NAD (NADP), coenzimas das reações de oxidação e redução do metabolismo celular (Ilkhani et al, 2016). O NADP é responsável principalmente por catalisar reações anabólicas (Alberts et al., 2011; Pollard et al., 2022). Já o NAD em reações de oxirredução, o NAD⁺ (forma reduzida) funciona como agente oxidante ao captar e transportar elétrons e prótons (H⁺) na forma de NADH (forma oxidada). O NADH está associado ao metabolismo mitocondrial para produção de energia em ATP (Pollard et al., 2022; Alberts et al., 2011). As mitocôndrias espermáticas desempenham um papel muito importante na manutenção da motilidade espermática, que precisa de energia e metabólitos como NAD (NADH) e NADP (NADPH) que participam da via de sinalização do ATP (Lee et al. 2014).

A suplementação de diluidores de sêmen com niacina é importante para favorecer a formação de ATP para gerar energia para os espermatozoides (Alberts et al., 2011). O NAD é gerado a partir da conversão catalítica da niacina ou a partir do aminoácido triptofano (Trp), porém esse último é 60 vezes menos eficiente para gerar o NAD quando comparada a vitamina B (Pollard et al., 2022; Alberts et al., 2011). A meia-vida de uma molécula de NAD varia em torno de 1 a 2 horas, assim fornecer o substrato para sua reposição é importante para gerar energia para a célula (Pollard et al., 2022).

O NA, além de suas funções metabólicas, tem uma potente capacidade antioxidante e proteção contra danos oxidativos (Ogata et al, 2002). Estudos confirmaram que os principais efeitos protetores do NA vêm de suas propriedades antioxidantes diretas e indiretas (Ilkhani et al, 2016). Ogata e colaboradores, em 2002, investigaram a atividade direta de eliminação de radicais dos compostos relacionados ao NA por métodos de ressonância de spin eletrônico. Os autores relataram que o NA tem efeito de eliminação direta de algumas ROS. Por outro lado, o NA, como parte do NAD e do NAD fosfato, desempenha um papel importante na regulação celular da glutathione peroxidase redox, que resulta na conversão do superóxido e do peróxido de hidrogênio em moléculas de água (Alvarez e Storey, 1989).

A adição de 5 e 10 mM de NA a diluidores de congelamento de sêmen suíno melhorou a qualidade espermática aumentando o percentual de acrossoma e mitocôndria intactos (Lee et al, 2015) e 10 mM reduziu a peroxidação lipídica e aumentou a integridade da MP de espermatozoides (Kim et al, 2010). Em concentração mais altas de 20 mM de NA houve um impacto negativo sobre a qualidade do espermatozoide suíno congelado- descongelado (Kim et al, 2015). Por outro lado, quando 15 e 30 mM de NA foram adicionados ao sêmen resfriado suíno, houve aumento da viabilidade espermática e com 30 mM da integridade acrossômica e mitocondrial (Lee et al, 2014).

A adição de 10 mM de NA a diluidores de criopreservação de sêmen humano reduziu a fragmentação do DNA dos espermatozoides após o descongelamento do sêmen (Rarani et al, 2019). Em combinação com o ácido fólico, o NA exibiu um efeito crioprotetor em espermatozoides humanos (Rarani et al, 2019).

Em garanhões, a adição de 40 mM de NA aumentou a motilidade total do espermatozoide com 6 e 42 h, o VAP e VSL com 18 e 42h e a integridade do acrossoma espermático com 42h de resfriamento. As concentrações de 20 e 40 mM de NA tiveram ação antioxidante tanto no sêmen resfriado quanto no congelado. A adição de principalmente 20 e 40 mM de NA ao diluidor de

congelamento de sêmen equino aumentou o percentual de espermatozoide com integridade acrossômica e de DNA pós-descongelamento (Bahrami et al, 2020).

2.8. Teste de ligação de espermatozoides a explantes de tuba uterina

Após a cópula, milhões de espermatozoides migram pelo trato reprodutivo feminino até a tuba uterina. Neste trajeto os espermatozoides sofrem fagocitose e sua resistência depende da sua força de propulsão. Espermatozoides com batimentos flagelares, motilidade progressiva e vigor altos apresentam uma maior capacidade de alcançar a tuba uterina. Dessa forma, ocorre um processo de seleção e apenas uma pequena porção alcança a tuba uterina. Após a ejaculação, os espermatozoides se movem no trato reprodutivo feminino até a região do istmo na tuba uterina formando o reservatório espermático (Hafez e Hafez, 2004). Este reservatório aumenta a vida útil e fértil e regula a capacitação dos espermatozoides, previne a polispermia e a reação acrossômica prematura, mantendo o reservatório com espermatozoides viáveis e capazes de fertilizar o oócito maduro (Hafez e Hafez 2004; Coy et al., 2008; Miller, 2018).

Estudos sobre a interação espermática com as células da tuba uterina são de fundamental importância para a melhor compreensão do processo de fertilização *in vivo* e *in vitro*. Por meio dessa interação ocorre aumento da vida útil e fértil dos espermatozoides no sistema reprodutivo da fêmea, regulação da capacitação espermática, prevenção da reação acrossômica prematura e da polispermia no oócito (Hafez e Hafez, 2004).

Em mamíferos, a fertilização e o desenvolvimento inicial dos embriões ocorrem na tuba uterina. A tuba uterina é um órgão dinâmico pertencente ao sistema reprodutivo da fêmea, seu microambiente é responsável pelo sucesso da fertilização (Hafez e Hafez, 2004; Suarez, 2016).

Ensaio de ligação espermatozoide-tuba uterina mostram a capacidade espermática de seleção morfológica e funcional de espermatozoides viáveis em muitas espécies (Coy et al. 2008, Miller 2018). O uso de uma técnica de cultivo celular *in vitro*, como explants da tuba uterina, pode mimetizar o ambiente tubário e avaliar a habilidade de fecundação *in vivo* por meio da interação espermatozoides-células epiteliais da tuba uterina (Budna-Tukan et al., 2019).

A cultura de explants é uma técnica de cultivo celular de órgãos, tecidos ou plantas amplamente utilizados, sendo a principal vantagem a mimetização da amostra em laboratório, uma vez que os agregados são formados de células epiteliais e estromais que se organizam para formar complexos celulares móveis com cílios ativos na superfície externa da célula. Usando esse

sistema de cultura, as células da tuba uterina mantêm sua organização semelhante ao do tecido *in vivo* (Nelis et al., 2014). Neste modelo de cultivo, diversas características celulares são mantidas, garantindo a manutenção da atividade ciliar (Gualtieri, et al., 2013), dos grânulos secretores (Ulbrich et al., 2010) e receptores celulares (Maillo et al., 2016)

2.9. Expressão gênica do espermatozoide

A expressão gênica do espermatozoide é um processo altamente regulado e especializado que envolve a transcrição e tradução de genes específicos para garantir a maturação, função e fertilidade dos espermatozoides (Kleene, 2005). Embora os espermatozoides sejam células altamente diferenciadas, eles ainda mantêm certos processos de expressão gênica que são cruciais para sua função (Rauber, 2013).

A maioria dos espermatozoides é considerada geneticamente inativa, o que significa que muitos dos seus genes estão silenciados ou transcritos em níveis muito baixos. Isso ocorre devido à compactação extrema do DNA durante a espermiogênese, processo pelo qual as células germinativas masculinas se diferenciam em espermatozoides maduros (Kleene, 2005). Durante a espermiogênese, o núcleo da célula espermática é condensado, e a maior parte do citoplasma é eliminada para formar uma célula altamente especializada e compacta, o espermatozoide. Esse processo de condensação do DNA resulta na diminuição da capacidade de transcrição gênica (Steger, 2001).

No entanto, mesmo com essa baixa atividade de transcrição, alguns genes são expressos em níveis relativamente altos nos espermatozoides e desempenham papéis importantes na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial. Estes genes estão associados à motilidade espermática, interação com o oócito, fusão de membranas durante a fertilização e início do desenvolvimento embrionário (Rauber, 2013). Dentre esses genes, podemos citar o nível de expressão gênica do espermatozoide de genes como BCL2, BAX, ROMO1 e SPACA3. Níveis aumentados do gene antiapoptótico BCL2 e níveis reduzidos do gene proapoptótico BAX indicam uma redução de apoptose (Bang et al., 2021). Por sua vez, ROMO1 é um gene chave para gerar produção de ROS mitocondriais (Shin et al., 2013) e um alto nível de ROS endógena criadas na cadeia respiratória mitocondrial podem causar alterações genéticas aleatórias, mutações e levam à apoptose (Turens, 2003). Entretanto, o gene acrossoma do esperma associado 3 (SPACA3) conserva locais de ligação de substrato para oligossacarídeos de N-acetilglicosamina presentes na matriz extracelular ao redor da membrana plasmática,

estando associado à capacidade de ligação do espermatozoide à zona pelúcida (Leung et al., 2023).

Além disso, os espermatozoides podem carregar microRNAs (miRNAs) e RNA mensageiro (mRNA) de seu estágio de desenvolvimento anterior (espermatogênese) ou adquiri-los do trato reprodutivo feminino após a ejaculação (Amanai et al., 2006). Esses RNAs podem ter funções regulatórias nos processos pós-fertilização, como o início da expressão gênica no embrião (Krawetz et al., 2011).

A expressão gênica nos espermatozoides pode ser influenciada por vários fatores ambientais e epigenéticos, como dieta, estilo de vida, exposição a toxinas e estresse (Amanai et al., 2006). Mudanças na expressão gênica dos espermatozoides podem ter consequências na saúde reprodutiva e no desenvolvimento do embrião, tanto em animais quanto em humanos (Krawetz et al., 2011).

Embora os espermatozoides sejam geneticamente inativos em comparação com outras células, eles ainda mantêm expressão gênica específica que é essencial para sua função reprodutiva e para o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial.

3. HIPÓTESES

- A adição de niacina ou resveratrol ao diluidor de congelamento de sêmen equino melhora a qualidade espermática após a criopreservação, promovendo maior motilidade, viabilidade e funcionalidade.
- A suplementação com niacina ou resveratrol no diluidor de congelamento reduz os danos oxidativos e aumenta a capacidade de ligação do espermatozoide aos explantes de tuba uterina bovina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da suplementação de resveratrol e niacina no diluidor de congelamento de sêmen equino sobre a qualidade espermática após a criopreservação, com foco em parâmetros estruturais, funcionais e moleculares dos espermatozoides.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração ideal de resveratrol e niacina no diluidor de congelamento para melhorar parâmetros de motilidade, viabilidade, funcionalidade e integridade da membrana plasmática de espermatozoides equinos.
- Avaliar os efeitos da niacina e do resveratrol sobre o potencial mitocondrial, a integridade acrossomal e a peroxidação lipídica em espermatozoides criopreservados.
- Investigar a influência de resveratrol e niacina na produção de espécies reativas de oxigênio e na expressão dos genes ROMO1 e BAX, associados ao estresse oxidativo e à apoptose.
- Analisar a expressão do gene SPACA3 e sua relação com a capacidade de ligação dos espermatozoides a explantes de tuba uterina bovina.
- Comparar a eficácia das diferentes concentrações de resveratrol e niacina em relação ao grupo controle, identificando os efeitos mais significativos na qualidade espermática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, N. B. Criopreservação de sêmen equino. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 2002, doi:10.1016/S0093-691X(02)00653-2.

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, v. 16, n. 4, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular [recurso eletrônico]. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. et al. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 583-595, 2004.

ALGHAMDI, S.; ATEF-SHEBL, N.; ASLANPOUR, Z.; BERROU, I. Barriers to implementing antimicrobial stewardship programmes in three Saudi hospitals: Evidence from a qualitative study. *J. Global Antimicrobial Resistance*, v. 18, p. 284-290, 2019.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; NETO, C. R. Técnicas para o incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 81-85, 2017.

ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.*, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*, 1989. doi:10.1002/mrd.1120230108.

Alvarez, J.G.; Storey, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*. 1989, doi:10.1002/mrd.1120230108.

AMANAI, M.; BRAHMAJOSYULA, M.; PERRY, A. C. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.*, v. 75, p. 877-884, 2006. doi: 10.1095/biolreprod.106.056499.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Prac.*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011: 1053-1084.

ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology*, v. 24, p. 324-331, 1987.

ANDERSEN, A.H.; THINNESEN, M.; FAILING, K.; GOERICKE-PESCH, S. Effect of reduced glutathione (GSH) supplementation to Tris-egg yolk extender on chilled semen variables of dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, 2018, doi:10.1016/j.anireprosci.2018.09.013.

ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O.; MARTINS, S.M.M.K. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability? *Reprod Domest Anim*, v.46, p. 682–686, 2011.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 79-85, 2010.

ASSUNÇÃO, C.M. Efeito do resveratrol na criopreservação do sêmen bovino. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, 1997, doi:10.1016/S0093-691X(97)84066-6.

BAHRAMI, A.; DIVAR, M.R.; AZARI, M.; KAFI, M. Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 94, 2020

BANG, S.; QAMAR, A.Y.; TANGA, B.M.; FANG, X.; CHO, J. Resveratrol supplementation into extender protects against cryodamage in dog post-thaw sperm. *J Vet Med Sci.*, 2021 Jul 10; 83(6):973-980. doi: 10.1292/jvms.21-0125. PMID: 33896876; PMCID: PMC8267189.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet. Med. Int.*, 2011.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 2011.

BELL, M.; WANG, R.; HELLSTROM, W.J.G.; SIKKA, S.C. Effect of Cryoprotective Additives and Cryopreservation Protocol on Sperm Membrane Lipid Peroxidation and Recovery of Motile Human Sperm. *J. Androl.* 1993, doi:10.1002/j.1939-4640.1993.tb03266.x.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Develop*, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.

BRANCO, C. S. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, v. 60, p. 235–237, 2010.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v. 54, n. 1, p. 129-136, 2000.

BRYAN, N. S.; CALVERT, J. W.; ELROD, S. et al. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 10448, p. 19144–19149, 2007.

BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BAŞPINAR, N.; UYSAL, O.; TAŞPINAR, M.; BILGILI, A.; ÖZTÜRK, C.; GÜNGÖR, S.; İNANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: Sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 2015. doi:10.1111/and.12301.

BUDNA-TUKAN, J.; SWIATLY-BLASZKIEWICZ, A.; CELICHOWSKI, P.; KALUZNA, S.; KONWERSKA A.; SUJKA-KORDOWSKA, P.; JANKOWSKI, M.; KULUS, M.; JESETA, M.; PIOTROWSKA-KEMPISTY H. “Biological Adhesion” is a Significantly Regulated Molecular Process during Long-Term Primary In Vitro Culture of

Oviductal Epithelial Cells (Oecs): a transcriptomic and proteomic study. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 20, n. 14, p. 3387, 10 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20143387>.

CANDEIAS, L. M. Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Machador. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2010. 105 p.

CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C.; CARVALHO, J.D.; LIMA, A.L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CARLSON, A. E.; HILLE, B.; BABCOCK, D. F. External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol*, v. 312, p. 183-192, 2007.

CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. *Theriogenology*, v. 107, p. 142-148, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.006>. PMid:29154161.

CASTRO, L.S.; ASSIS, P.M.; SIQUEIRA, A.F.P.; HAMILTON, T.R.S.; MENDES, C.M.; LOSANO, J.D.A. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. doi:10.1155/2016/8213071.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, doi:10.1002/mrd.1052.

CHEN, Y.; CANN, M. J.; LITVIN, T. N.; IOURGENKO, V.; SINCLAIR, M.L.; LEVIN, L.R.; BUCK, J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, v. 289, p. 625-628, 2000.

CHLOPIK, A.; WYSOKINSKA, A. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 55, p. 113-126, 2020

COELHO, R. W. de A.; DIAS, J. C. O. Freezing equine semen after 24 hours of cooling. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e1831019939, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.9939.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. CBRA, 2013.

COLLODEL, G.; FEDERICO, M.G.; GEMINIANI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; FIGURA, N.; MORETTI, E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod. Toxicol.*, 2011, doi:10.1016/j.reprotox.2010.11.010.

CONSUEGRA, C.; CRESPO, F.; BOTTREL, M.; ORTIZ, I.; DORADO, J.; DIAZ-JIMENEZ, M.; PEREIRA, B.; HIDALGO, M. Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, v. 191, p. 85–94, 2018.

CORDOVA, A.; STROBEL, P.; VALLEJO, A.; VALENZUELA, P.; ULLOA, O.; BURGOS, R. A. Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology*, v. 69, p. 473–481, 2014. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.10.008.

COY, P.; CÁNOVAS, S.; MONDEJAR, I.; SAAVEDRA, M.D.; ROMAR, R.; GRULLÓN, L.; MATÁS, C.; AVILÉS, M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *The National Academy of Sciences of the USA, USA*, v. 105, n. 41, out./2008.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, v. 242, p. 1-10, 1987.

CUNHA, I. C. N. Criopreservação do sêmen de cães. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 144 f, 2002.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, n. 5, p. 831-841, 1997.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; NISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews*, v. 79, n. 2, p. 481-510, 1999.

De Leeuw, F.E.; De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, p. 32-44, 1993.

DE VITA, B. Biotecnologia e inseminação artificial com sêmen congelado equino. Monografia (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

DI SANTO, M.; TAROZZI, N.; NADALINI, M.; BORINI, A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv. Urol.*, 2012.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G. A. Field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, v. 22, p. 291-303, 1984.

ESTRADA, E.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; ROCHA, L.G.; BALASCH, S.; BONET, S.; YESTE, M. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2014.

FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – new challenges. *Reprod Domest Anim*, v. 44, p. 336-341, 2009.

FERRER, M.S.; CANISSO, I.F.; ELLERBROCK, R.E.; PODICO, G.; LISTER, B.N.; HURLEY, D.J.; KLINE, K.; PALOMARES, R.A. Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 221, 2020.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FÜRST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M. Capacitation and acrossomereaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.*, 2015, doi: 10.1155/2015/837042. PMID: 26221416; PMCID: PMC4499410.

GARCEZ, M.E.; DOS SANTOS BRANCO, C.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil. Steril.*, 2010, doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.

GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation to male fertility. *Asian Journal of Andrology*, v. 6, n. 1, p. 59-65, 2004.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BAC, T.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmac*, v. 53, p. 169-180, 1999.

GHAVAMZADEH, A.; ALIMOGHADDAM, K.; ROSTAMI, S.; GHAFFARI, S.H.; JAHANI, M.; IRAVANI, M.; MOUSAVI, S.; BAHAR, B.; JALILI, M. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, v. 29, p. 2753-2757, 2011.

GIARETTA, E. Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, p. 1307–1312, 2014.

GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed. Cross Plains: Equiservices, 1992.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v. 58, p. 277-279, 2002.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; MORELLA, F.J.; PEÑA, B.; MACÍAS-GARCÍA, B. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. *Theriogenology*, v. 78, p. 415–422, 2012.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v. 12, p. 131-147, 1996.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BRAUN, S.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; TALEVI, R. Bovine oviductal monolayers cultured under three-dimension conditions secrete factors able to release spermatozoa adhering to the tubal reservoir in vitro. *Theriogenology*, v. 79, n. 3, p. 429-435, 2013.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri – SP: Manole Ltda., 2004. p. 13-29.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: Reprodução Animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 24, p. 513- 535.

HARDIE, D. G.; SCOTT, J. W.; PAN, D. A.; HUDSON, E. R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.*, v. 546, p. 113–120, 2013. doi:10.1016/S0014-5793(03)00560-X.

HAWLEY, S. A.; ROSS, F. A.; CHEVTZOFF, C.; GREEN, K. A.; EVANS, A.; FOGARTY, S.; TOWLER, M. C.; BROWN, L. J.; OGUNBAYO, O. A.; EVANS, A. M.; et al. Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.*, 2010. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.001.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C.; RAMÍREZ-AGÁMEZ, L.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C. The stallion sperm acrosome: Considerations from a research and clinical perspective. *Theriogenology*, v. 196, p. 121-149, 2023. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.012. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36413868.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online* 2018.

HÖFNER, L.; LUTHER, A. M.; WABERSKI, D. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 220, p. 106290, 2020.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p. 3-22, 2000.

HURTADO DE LLERA, A.; MARTIN-HIDALGO, D.; GIL, M. C.; GARCIA-MARIN, L. J.; BRAGADO, M. J. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS ONE*, v. 7, e38840, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038840.

IGNARRO, L. J.; GOLD, M. E.; BUGA, G. M.; BYRNS, R.E.; WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G.; FRANK, G. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res.*, v. 64, p. 315–329, 1989.

JACOB, R. A. In: Present knowledge in nutrition; BOWMAN, B. A.; RUSSELL, R. M., eds.; International Life Sciences Institute: Washington, cap. 20, 2006.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v. 8, p. 129-148, 1992.

JUAN, M.E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PLANAS, J.M. trans, Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J. Nutr.*, 2005, doi:10.1093/jn/135.4.757.

KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. 1998. 104 f. Tese (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins, 1998.

KIM, S.H.; YU, D.H.; KIM, Y.J. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology* 2010, doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.011.

KIM, Y.J.; LEE, S.H.; LEE, Y.J.; OH, H.I.; CHEONG, H.T.; YANG, B.K.; LEE, S.; PARK, C.K. Effect of nicotinic acid on sperm characteristic and oocyte development after in vitro fertilization using cryopreserved boar semen. *J Emb Trans*, v. 30, p. 7-15, 2015.

KLEENE, K.C. Sexual selection, genetic conflict, selfish genes, and the atypical patterns of gene expression in spermatogenic cells. *Dev Biol*, v.277, p.16-26, 2005.

KRAWETZ, S. A.; KRUGER, A.; LALANCETTE, C.; TAGETT, R.; ANTON, E.; DRAGHICI, S. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod.*, v. 26, p. 3401–3412, 2011. doi: 10.1093/humrep/der329.

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.147-153, 2010.

LECEWICZ, M.; STRZEZEK, R.; KORDAN, W.; MAJEWSKA, A. Effect of extender supplementation with low molecular weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Research*, v.62, n.2, p. 221-227, 2018.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Rad Biol Med.*, v. 22, p. 643–656, 1997.

LEE, Y. J.; LEE, S. H.; LEE, E.; LEE, S. T.; CHEONG, H. T.; YANG, B. K.; LEE, S.; PARK, C. K. Effect of nicotinic acid on fresh semen characteristics in miniature pigs. *J Emb Trans*, v. 29, p. 385e91, 2014.

LEONARD, S.S.; XIA, C.; JIANG, B.H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.105.

LEUNG, M. R.; ZENG, J.; WANG, X.; ROELOFS, M. C.; HUANG, W.; ZENEZINI CHIOZZI, R.; HEVLER, J. F.; HECK, A. J. R.; DUTCHER, S. K.; BROWN, A.; ZHANG, R.; ZEEV-BEN-MORDEHAI, T. Structural specializations of the sperm tail. *Cell*, v. 186, n. 13, p. 2880-2896.e17, 2023. doi: 10.1016/j.cell.2023.05.026. Epub 2023 Jun 15. PMID: 37327785; PMCID: PMC10948200.

LI, E.; GUO, Y.; WANG, G.; CHEN, F.; LI, Q. Effect of resveratrol on restoring spermatogenesis in experimental cryptorchid mice and analysis of related differentially expressed proteins. *Cell Biol. Int.*, 2015, doi:10.1002/cbin.10441.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A.; MENDES, C. Q. et al. Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira. Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. A produção animal no mundo em transformação. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012.

LKHANI, F.; HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A. Niacin and oxidative stress: a mini review. *J Nutr Med Diet Care*, v. 2, p. 2e014, 2016.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, v. 224, p. 164-175, 2014.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C.C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, v. 85, n. 2-3, p. 85-90, 2009.

MAILLO, V.; LOPERA-VASQUEZ, R.; HAMDI, M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 443-450, 2016.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C., *Male reproduction and semen*. New York: Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 2016.

MATHENY, K. Posters 140 Effects of resveratrol on post-thaw quality of stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 35, p. 437-445, 2015.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. In: *Proceedings of the Theriogenology*, 1999.

MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Vet*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.

MEDEIROS, C. M. O. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p. 327-344, 2002.

MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQUÍDEOCULTURA, 4, 1986, São Paulo, SP. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hipologia, p.33–34, 1986.

MEYERS, S.A. Sperm Physiology. In: SAMPER, J.C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2.ed. St. Louis: Saunders. Cap 5, p. 45-57, 2009.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 68, p. 204-212, 2007.

MILLER, C. D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, v. 70, p. 463-468, 2008.

MILLER, D. J. The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *Animal*, Illinois, v. 12, n. 1, p. 110-120, fev./2018. doi:10.1017/S1751731118000526.

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

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, p.403–439, 1997.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.S.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.13, n.8, p.2139–2146, 1998.

MOTTA, F.F. Diluentes INRA para criopreservação do sêmen eqüino. Trabalho de conclusão de curso (Graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2010.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 2002, doi:10.1016/S0093-691X(02)00682-9.

NAIJIAN, H.R.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z.; SHARAFI, M.; BUCAK, M.N. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat

semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*, 2013, doi:10.1016/j.cryobiol.2012.12.010.

NASCIMENTO, J. Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 2006.

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

NASHTAEI, M. S.; AMIDI, F.; SEDIGHI GILANI, M. A.; ALEYASIN, A.; BAKHSHALIZADEH, S.; NAJI, M.; NEKOONAM, S. Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 2017. doi:10.1111/andr.12306.

NELIS, H.; D'HERDE, K.; GOOSSENS, K.; VANDENBERGHE, L.; LEEMANS, B.; FORIER, K.; SMITS, K.; BRAECKMANS, K.; PEELMAN, L.; VAN SOOM, A. Equine oviduct explant culture: a basic model to decipher embryo– maternal communication. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 7, p. 954-966, 2014.

NGUYEN, T. M.; SEIGNEURIN, F.; FROMENT, P.; COMBARNOUS, Y.; BLESBOIS, E. The 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the augmentation of antioxidant defenses in cryopreserved chicken sperm. *PLoS ONE*, v. 10, e0134420, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0134420.

NIKITKINA, E.; MUSIDRAY, A.; KRUTIKOVA, A.; ANIPCHENKO, P.; PLEMYASHOV, K.; SHIRYAEV, G. Efficiency of tris-based extender Steridyl for semen cryopreservation in stallions. *Animals*, v. 10, n. 10, p. 1801, 2020.

NOGUEIRA, M. B. R. Uso de diluição seriada de sêmen criopreservado na inseminação artificial em tempo fixo em éguas Mangalarga Marchador. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOURI, H.; SHOJAEIAN, K.; SAMADIAN, F.; LEE, S.; KOHRAM, H.; LEE, J. I. Using resveratrol and epigallocatechin-3-gallate to improve cryopreservation of stallion spermatozoa with low quality. *J. Equine Vet. Sci.*, 2018. doi: 10.1016/j.jevs.2018.07.003.

OGATA, S.; TAKEUCHI, M.; TERADAIRA, S.; YAMAMOTO, N.; IWATA, K.; OKUMURA, K.; TAGUCHI, H. Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 66, p. 641e5, 2002.

OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; MARTINS-FILHO, A.O.; SILVA, M.X.; VARAGO, F.C.; LAGARES, M.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.194–200, 2013.

OLIVEIRA, L. L. N.; AGUIAR, Q. H. S. L.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, L. T.; SANTOS, F. C. Refrigeração de sêmen canino com diluente a base de leite e gema de ovo 2%. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 15, n. 3, p. 270–275, 2021.

OLSON, A.L.; REBOUCHE, C.J. Butyrobetaine hydroxylase activity is not rate limiting for carnitine biosynthesis in the human infant. *J. Nutr.*, v. 117, p. 1024–1031, 1987.

OLSON, S. D.; FAUCI, L. J.; SUAREZ, S. S. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod*, v. 17, p. 500-510, 2011.

OURIQUE, G.M.; FINAMOR, I.A.; SACCOL, E.M.H.; RIFFEL, A.P.K.; PÊS, T.S.; GUTIERREZ, K.; GONÇALVES, P.B.D.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A.; BARRETO, K.P. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod. Toxicol.*, 2013, doi:10.1016/j.reprotox.2013.01.006.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxidants Redox Signal.*, 2009.

- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, A. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*, v. 35, n. 2, p. 109-124, 2012.
- POLLARD, C. L.; GIBB, Z.; SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G. NAD⁺, Sirtuins and PARPs: enhancing oocyte developmental competence. *Journal of Reproduction and Development*, v. 68, n. 6, p. 345-354, 2022.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p. 215-225, 2006.
- RAMIRES NETO, C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Plasma membrane lipid profile from resistant and sensitive spermatozoa of mangalarga marchador stallions after cooling at 5°C. *J Equine Vet Sci.*, v.43, p.S76-S77, 2016.
- RARANI, F.Z.; GOLSHAN-IRANPOUR, F.; DASHTI, G.R. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normol zoospermic men. *Cell Tissue Banking*, v. 20, p. 367-378, 2019.
- RAUBER, L.P. RNA espermático, uma visão holística. *Rev Bras Reprod Anim*, v.37, n.4, p. 309-317, 2013.
- REVEL, A.; RAANANI, H.; YUGLAI, E.; XU, J.; ROGERS, I.; HAN, R.; SAVOURET, J.F.; CASPER, R.F. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J. Appl. Toxicol.*, 2003, doi:10.1002/jat.916.
- RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, v. 74, p. 359-365, 2006.
- ROCA, J.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 100, n. 3, p. 875-881, 2013.

SANCLER-SILVA, Y. F. R.; MONTEIRO, G. A. Tecnologias para criopreservação de sêmen em equinos. In: IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2019, Goiânia - GO. Anais da IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2019. v. 1. p. 85-108.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; ULUTAŞ, P.A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 2009, doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.006.

SARLÓS, P. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 50, n. 2, p. 235–245, 2002.

SHIN, J. A.; CHUNG, J. S.; CHO, S. H.; KIM, H. J.; YOO, Y. D. ROMO1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 439, p. 315–320, 2013.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl*, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SIMPSON, A. M.; WHITE, I. G. Interrelationship between motility, cAMP, respiration and calcium uptake of ram and boar sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 15, n. 2-3, p. 189-207, 1987.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, H.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 1, 2007. p. 19.

SONI, Y.; TALLURI, T. R.; KUMAR, A.; RAVI, S. K.; MEHTA, J. S.; TRIPATHI, B. N. Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds. *Cryobiology*, v. 86, p. 52-57, 2019. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.12.005.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.

STEGER, K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol*, v.203, p. 323-334, 2001.

SUAREZ, S. S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*, v. 363, p. 185-194, 2016. doi:10.1007/s00441-015-2244-2.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIKI, R.; IWATA, H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, v. 60, p. 92–99, 2014. doi:10.1262/jrd.2013-102.

TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; EKHLASIHUNDRIESER, M.; DOSTALOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, v. 30, p. 217-224, 1998.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, v. 552, n. Pt 2, p. 335-344, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478. PMID: 14561818; PMCID: PMC2343396.

TVRDÁ, E.; KOVÁČIK, A.; TUŠIMOVÁ, E.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N.; TVRDÁ, E.; KOVÁČIK, A.; TUŠIMOVÁ, E.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N. Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *J. Toxicol. Environ. Health A*, v. 4529, 2015. doi:10.1080/10934529.2015.1071153.

ULBRICH, S. E. et al. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal crosstalk in the bovine oviduct. *Theriogenology*, v. 73, n. 6, p. 802-816, 2010.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 907-919, 2000.

VIEIRA, N. M. G. Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. 2018. Tese (Doutorado em

Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

WARNER, F.D. Crossbridge mechanisms in ciliary motility. In: BOOK, C., GOLDMAN, R.D., POLLARD, T.D., ROSENBAUM, J.L. Cell Motility. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 891–914, 1976.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Develop*, v.7, n.4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 481–492, 2000.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Vol. 1. Ed CA Finn. Oxford, Clarendon Press, p. 283-350, 1979.

WEINBERG, J. B.; DOTY, E.; BONAVENTURA, J. et al. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril*, v. 64, n. 2, p. 408-413, 1995.

WHITE, I. The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa. *Aust J Biol Sci*, v. 7, p. 379e90, 1954.

WHITE, I.; LINCOLN, G. The yellow pigmentation of bull semen and its content of riboflavin, niacin, thiamine and related compounds. *Biochem J*, v. 76, p. 301, 1960.

ZHU, Z.; LI, R.; FAN, X.; LV, Y.; ZHENG, Y.; HOQUE, S. A. M.; WU, D.; ZENG, W. Resveratrol improves boar sperm quality via 5' AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. 2019, doi:10.1155/2019/5921503.

ZHU, Z.; LI, R.; MA, G.; FAN, X. 5' AMP-activated protein kinase regulates goat sperm functions via energy metabolism in vitro. 2018, v. 86, p. 2420–2431, doi:10.1159/000491616.

CAPÍTULO 2

Artigo 1 submetido à Animal Reproduction

Effects of resveratrol supplementation to equine sperm during semen cryopreservation

Natália de Castro Alves¹, Marina Morra Freitas¹, Jade Raquel Dias Faria¹, Camila Silva dos Santos², Cesar Lopes Horta¹, Olindo Assis Martins-Filho³, Márcio Sobreira Silva Araújo³, Ângela Quintão Lana¹, Isadora Martins Pinto Coelho¹, Ailton Junior Antunes da Costa¹, Guilherme Mattos Jardim Costa¹, Erica Azevedo Costa¹, Giovanna Sinigalia Leme Nogueira¹,
Monique de Albuquerque Lagares¹

¹ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil

² Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Belo Horizonte, UniBH, Belo Horizonte, Brasil

³ Centro de pesquisa René Rachou – Fiocruz, Laboratório de diagnóstico e monitoramento de biomarcadores, Belo Horizonte, Brasil

Autor correspondente: Natália de Castro Alves, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil.

Email: nataliacastro_93@hotmail.com

Abstract

During equine semen cryopreservation most of the seminal plasma is discarded after centrifugation leaving the sperm more vulnerable to oxidative stress. Thus, the aim of this study was to improve frozen sperm quality with resveratrol addition to an equine semen freezing extender. Semen of 10 stallions was collected and frozen with the INRA 96 freezing extender (control) and with 5-, 10-, 100-, and 150- μM resveratrol addition. After thawing, the semen samples were evaluated for motility, kinematics, morphology, plasma membrane viability and functionality, acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, sperm lipid peroxidation, nitrite (NO^{2-}), hydrogen peroxide (H_2O_2), and malondialdehyde concentrations, level of reactive oxygen species, deficiency of sperm chromatin protamine and condensation, number of equine sperm bound bovine oviduct explants, and gene expression of apoptosis-related genes such as B-cell lymphoma 2 (BCL2) and BCL2-associated X (BAX), mitochondrial ROS modulator 1 associated with mitochondrial ROS production (ROMO1), sperm acrosome-associated 3 related with sperm binding capacity to the zona pellucida (SPACA3), and DNA damage repair gene 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1). Means and standard errors were evaluated with analysis of variance and compared with Tukey test, with a significance level of $P < 0.05$. The addition of 10 μM resveratrol to equine semen freezing extender increased sperm motility (10 μM : $56.2 \pm 5.9\%$ vs. control: $41.3 \pm 5\%$), mitochondrial activity (10 μM : $22.4 \pm 1.2\%$ vs. control: $14.9 \pm 0.8\%$), expression of the SPACA3 gene (10 μM : 3.74 ± 0.4 vs. control: 1 ± 0.2 $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$), and the number of sperm bound to bovine oviduct cells (10 μM : 68.3 ± 9.5 vs. control: 48.6 ± 5.3 sperm bound/nm of explants) compared to the control. In contrast, the same resveratrol concentration reduced the production of total reactive oxygen species (10 μM : 1887 ± 203 vs. control: 3735 ± 380 AU), expression of the ROMO1 gene (10 μM : 0.35 ± 0.03 vs. control: 1 ± 0.15 $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$), and expression of the BAX gene (10 μM : 0.17 ± 0.03 vs. control: 1 ± 0.09 $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$) in comparison to the control. In conclusion, the addition of 10 μM resveratrol to equine freezing extender increased sperm metabolism, enhanced binding of sperm to the oviduct cells, and exhibited antioxidant and antiapoptotic effects on sperm. Thus, incorporating resveratrol into freezing extenders could be a promising strategy to improve the fertilizing capacity of equine sperm in artificial insemination programs.

Keywords: antioxidant, reproduction, cryopreservation, semen, stallion

1. Introduction

Cryopreservation is commonly used for long-term preservation of sperm from domestic animals (Hezavehei et al., 2018). However, the semen cryopreservation process causes various damages to sperm due to temperature changes and oxidative damage (Tash and Mann, 1973), compromising cell viability, motility, and longevity (Roca et al., 2013). Semen has a limited antioxidant defense system, including glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase. Additionally, the high concentration of polyunsaturated fatty acids in sperm membranes let them more susceptible to oxidative stress inducing damage during freezing and thawing (Asadi et al., 2017).

Antioxidants, such as resveratrol, have been added to semen extenders to minimize oxidative stress during the cryopreservation process (Naijian et al., 2013). It has improved post-thaw semen quality in bulls (Bucak et al., 2015), stallions (Nouri et al., 2018), dogs (Bang et al., 2021), and boars (Estrada et al., 2014). However, to date the gene expression and the number of equine sperm bound to bovine oviduct explants of frozen equine sperm with resveratrol has not been evaluated.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol that belongs to dietary stilbenes, a class of compounds exhibiting significant biological activities of medicinal interest. This compound is one of the most well-known and investigated polyphenols found in nature, produced by more than 70 different types of plants, and is present in red wine and various botanical extracts (Gambini et al., 2015). In somatic cells, resveratrol has been considered an antioxidant due to its ability to reduce mitochondrial ROS production, scavenge superoxide radicals, inhibit lipid peroxidation, and regulate the expression of antioxidant enzymes and cofactors in human sperm (Pervaiz and Holme, 2009). The addition of resveratrol to semen freezing extender improved sperm motility and mitochondrial activity in bulls (Bucak et al., 2015) and reduce DNA damage in human sperm (Garcez et al., 2010).

Equine exhibit variable fertility rate with artificial insemination, particularly with cryopreserved semen. Thus, strategies to maximize the fertilizing capacity of frozen/thawed equine sperm is crucial to the reproductive success. Therefore, the aim of the present study was to add resveratrol to semen freezing extenders to improve equine frozen-thawed sperm quality.

2. Materials and Methods

All experimental procedures were conducted in accordance with the ethical principles and animal welfare standards of Brazil for the use and care of animals in research. These procedures were approved by the Animal Ethics Committee "Comissão de Ética no Uso de Animais" (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), protocol number 394/2017.

2.1. Semen Collection and Evaluation

Two ejaculates were collected from 10 clinically healthy Mangalarga Marchador stallions ($n=10$), aged between 4 and 9 years, located in Minas Gerais, Brazil, during the months march, october, november, and december. The stallions were selected based on andrological examination and reproductive history. After collection, semen was evaluated for sperm motility and vigor using a bright-field microscope (100x magnification). Only ejaculates with progressive motility equal to or greater than 50% and vigor equal to or greater than 3 were used. Sperm concentration per milliliter was calculated using a hemocytometer. Sperm morphology was evaluated using the wet preparation technique (Mies Filho, 1975). Semen was preserved in a buffered formalin saline solution, and 200 sperm per sample were analyzed using a phase-contrast microscopy (x 1000). Only ejaculates with at least 70% or greater of normal morphologically sperm were used (CBRA, 2013).

2.2. Semen Freezing

The selected ejaculates were diluted in a 1:1 ratio with Kenney's extender (Kenney et al., 1975) and centrifuged (450 x g, 10 min). The supernatant was discarded, leaving 10% of the total volume. After homogenization, the semen was resuspended in INRA 96 freezing medium containing 2.5% glycerol and 2% supernatant of the centrifuged egg yolk (600 x g, 20 min, Pillet et al., 2008) to achieve a concentration of 100×10^6 sperm/ml. Five treatments were performed: 0 (Control), 5, 10, 100, and 150 μM resveratrol. The semen was packaged in 0.5 ml straws and cooled for 1.5 hours in a Styrofoam container ($0.27^\circ\text{C}/\text{min}$) to 5°C . The straws were then placed 2.5 cm above liquid nitrogen, and after 20 minutes, they were immersed in it and stored in liquid nitrogen tanks (-196°C).

2.3. Post-Thaw Sperm Evaluation

The straws were thawed at 37°C and semen samples were analyzed including motility and kinematics, morphology, membrane functionality and integrity, rate of spontaneous acrosome reaction, lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential, DNA fragmentation, nitrite, hydrogen peroxide, total reactive oxygen species, malondialdehyde concentrations, number of sperm bound to oviduct explants, and gene expression, as described following.

2.3.1. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

Sperm motility evaluation was performed thawing one straw of each treatment (37°C, 30 sec). A 10 µL aliquot of semen samples was placed on a Makler chamber (10 µm depth) and evaluated using a computer-assisted sperm analysis system (CASA, Sperm Class Analyzer, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Spain). Samples were assessed for total motility (TM%), progressive motility (PM%), curvilinear velocity (VCL-µm/s), average path velocity (VAP-µm/s), straight-line velocity (VSL-µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH-µm), beat-cross frequency (BCF-Hz), straightness (STR-%), linearity (LIN-%), and wobble (WOB-%). Five fields per sample were analyzed. CASA settings were capture rate of 25 images per second; optics: Ph-; chamber: Makler; scale: obj10x, particle area (in µm²) 4 < area < 75; curvilinear velocity (VCL): 10 < slow 45 < medium < 90 < fast µm/s; progressive motility > 75% straightness (STR), circular < 50% linearity (LIN).

2.3.2. Sperm Morphology

Sperm morphology was evaluated using a wet preparation technique (Mies Filho, 1975), where the semen samples were preserved in buffered formalin saline solution, and 100 sperm were assessed using a phase-contrast microscopy (x 1000).

2.3.3. Plasma membrane functionality evaluation

The percentage of sperm with functional plasma membrane (PM) was evaluated using the hypoosmotic swelling test (HOST) with distilled water (Lomeo and Giambersio, 1991), modified by Lagares et al. (2000) at a 1:2 dilution (semen: distilled water). After semen samples thawing, a 100 µL aliquot was added to 200 µL of distilled water at 37°C. After 5 min

incubation, 200 sperm were analyzed using a phase-contrast microscopy (x 400). Tail curling sperm was considered positively react to the HOST. The final percentage of HOST+ sperm was obtained after subtracting the percentage of curled tail sperm observed in the morphological examination.

2.3.4. Plasma and acrosomal membrane integrity evaluation

The integrity of plasma (PM) and acrosomal membranes (AM) was evaluated using a flow cytometry with Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and Fluorescein Isothiocyanate-Peanut Agglutinin (FITC-PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) fluorescent probes. The thawed semen samples were diluted 1:20 in a phosphate-buffered saline (PBS, 250 μ L semen: 5 mL PBS). A 200 μ L aliquot of this suspension was stained with FITC-PNA (1.125 μ g/mL) and incubated (10 min, 37°C). Samples were then diluted by adding 1 mL PBS, stained with PI (1.5 mM), and incubated for 10 min at room temperature. The samples were analysed using a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample, at a rate of 500 cells per second, were analyzed. The following sperm categories were observed: PI+/PNA+: sperm with non-intact PM and AM, PI+/PNA-: sperm with non-intact PM and intact AM, PI-/PNA-: sperm with intact PM and AM, PI-/PNA+: sperm with intact PM and non-intact AM. Sperm with spontaneous acrosome reaction were considered those with PI-/PNA+, and sperm with intact PM without spontaneous acrosome reaction were those with PI-/PNA-.

2.3.5. Mitochondrial membrane potential assessment

Mitochondrial membrane potential was assessed using flow cytometry with the fluorescent probes Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and MitoTracker Green FM (Invitrogen M7514, Massachusetts, USA). A 10 million sperm aliquot was diluted in 2 mL of PBS and centrifuged (12 min, 500 x g). The supernatant was discarded, and the samples were resuspended in 200 μ L of PBS. A volume of 0.5 μ L of the pre-warmed (37°C) stock solution of MitoTracker Green FM (final concentration 20 nM) was added to the samples and incubated in the dark (37°C, 15 min). Subsequently, the samples were diluted with 1 mL PBS, stained with PI (1.5 mM), and incubated (37°C, 5 min). After that, the sperm samples were washed twice with 2 mL PBS in the tubes and centrifuged (12 min, 500 x g). The

supernatant was discarded and the sperm were resuspended in 1 mL PBS. The samples were analyzed using a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample were analyzed at a rate of 500 cells per second.

2.3.6. Sperm lipid peroxidation assessment

Sperm lipid peroxidation was evaluated using the fluorescent probe C11-BODIPY581/591 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA) and assessed by flow cytometry according to Partyka et al. (2011). A volume of 20 μ L semen was washed by centrifugation (500 x g, 5 min) and resuspended in 160 μ L PBS. Then, 20 μ L of C11-BODIPY581/591 (5 μ M) was added and incubated in the dark (37°C, 30 min). The samples were then washed by centrifugation (500 x g, 5 min) and the pellet was resuspended in 500 μ L PBS. The samples were analyzed with a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample were analyzed at a rate of 500 cells per second (Fig. 1). The positive control was performed by incubating a sperm sample in hydrogen peroxide (500 μ M) at 37°C for 60 min.

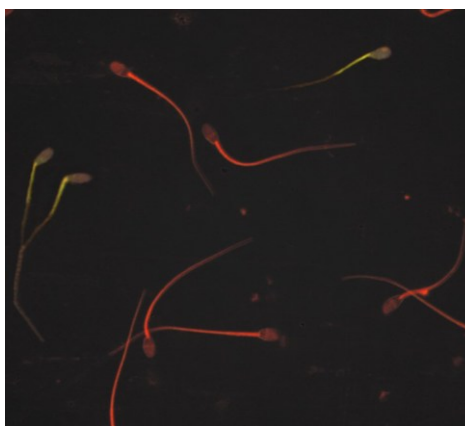


Figure 1: Sperm that underwent lipid peroxidation stained green/orange, and sperm that did not undergo lipid peroxidation are stained red using the fluorescent lipid probe C11-BODIPY581/591.

2.3.7. Measurement of Nitrite (NO_2^-) Concentration

The measurement of nitrogen reactive species concentration was performed by measuring the levels of nitrite (NO_2^-) in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein. Nitrite is one of the two primary, stable, and non-volatile products of NO decomposition, and its measurement using spectrophotometry with the

Griess reagent (Green et al., 1982) is a way to investigate nitric oxide formation. The Griess Reagent System is based on the chemical diazotization reaction that uses 2% (w/v) sulfanilamide and 0.2% (w/v) N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEED) under acidic conditions (5% (v/v) phosphoric acid). The detection limit is nitrite of 2.5 μM (125 pmol) (in ultrapure, deionized distilled water). The absorbance of the samples was determined at 560 nm. Griess reagent was prepared at the time of analysis and kept protected from light throughout the experiment. In a 96-well microplate, 50 μL of thawed semen sample (37°C, 30 sec) from each treatment and 50 μL of Griess reagent were added, and for the blank treatment, 50 μL of distilled water and 50 μL of Griess reagent were added in triplicate. The microplate was read in a spectrophotometer at 560nm.

2.3.8. Measurement of Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Concentration

The measurement of hydrogen reactive species concentration (H_2O_2) was performed by measuring hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein using spectrophotometry. H_2O_2 concentration was measured by the method modified by FOX-2 (Nourooz-Zadeh et al., 1994). This technique is possible by the oxidation of ferrous ions (Fe^{2+}) to ferric ions (Fe^{3+}) under acidic conditions by lipid hydroperoxides. The indicator used is xylene orange, which reacts with Fe^{3+} ions producing a blue-purple chromophore with an extinction coefficient of $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, detected in the spectrophotometer reading at 560 nm. H_2O_2 concentration was determined in the samples according to the molar extinction coefficient of H_2O_2 . Therefore: $A\lambda = \epsilon\lambda \cdot C$, where $A\lambda$ =absorbance at 560nm; $\epsilon\lambda$ =molar extinction coefficient of the chromophore; C =concentration of hydroperoxides (mol/mL).

2.3.9. Measurement of Malondialdehyde Concentration

To determine the rate of lipid peroxidation of post-thawed sperm, another technique was used to measure the concentration of malondialdehyde (MDA), using thiobarbituric acid (TBA) based on the method described by Buege and Aust (1978). Malondialdehyde levels were measured after adding 250 μL of semen to 500 μL of TBA reagent (15% trichloroacetic acid, 0.25N hydrochloric acid, and 0.375% thiobarbituric acid) and 1% (v/v) BHT 50mM, and this solution was boiled (100°C) for 15 min. Subsequently, the samples were cooled on ice flakes and centrifuged (1,200 x g, 15 min). The supernatant was removed and measured in the

spectrophotometer with absorbance at 532 nm. TBARS quantification in the samples was performed using a standard curve of 1 to 20 nMol of MDA/ml. The results were expressed in nMol of TBARS/ml.

2.3.10. Measurement of Total Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)

The cellular level of ROS was evaluated using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) kit (ab113851, Abcam, Cambridge, England). The reactive oxygen species (ROS) assay kit uses the permeable DCFDA reagent (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), a fluorogenic dye that measures the activity of hydroxyl, peroxyl, and other ROS within the cell. After diffusion into the cell, DCFDA is deacetylated by cellular esterases into a non-fluorescent compound, which is subsequently oxidized by ROS into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF is a highly fluorescent compound that can be detected by fluorescence spectroscopy. For analysis, samples containing 1.5×10^6 sperm were washed in PBS and incubated at 37°C for 30 minutes with 1 mL of buffer solution containing 20 μ M DCFDA. Subsequently, the sperm samples were washed with 1 mL of 1X buffer solution and resuspended in 500 μ L of 1X supplemented buffer solution. Finally, 50 μ L of the sperm suspension from each treatment was plated in triplicate in wells of a dark-bottom microplate. Fluorescence intensity was detected using the Cytation 5 microplate reader (Biotek, Santa Clara, CA, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm. The intensity of their fluorescence was measured, the sperm with elevated ROS levels were stained green (Figure 2), while those with lower ROS levels exhibited reduced fluorescence. For the positive control, sperm were treated with 50 μ M tert-butyl hydroperoxide (tbHP) for 3 hours at 37°C.

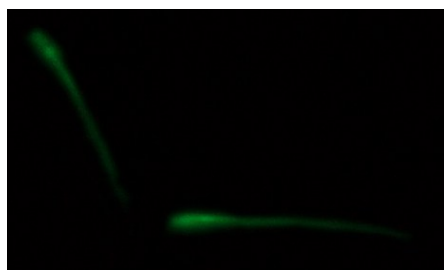


Figure 2: Bright green fluorescent sperm showing ROS activity using the DCFDA fluorescent probe. The intensity of their fluorescence was measured with the Cytation 5 microplate reader (Biotek, Santa Clara, CA, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm.

2.3.11. Evaluation of chromatin protamination deficiency in sperm using Chromomycin A3 (CMA3).

To assess sperm chromatin protamination, the fluorescent dye CMA3 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used (Simões et al., 2009). Thawed semen samples (37°C, 30 secs.) were diluted to 2×10^6 sperm in 200 μ L of McIlvaine's buffer (17 mM citric acid, 164 mM Na₂HPO₄, and 10mM MgCl₂·6H₂O; pH 7.0) and centrifuged (500 x g, 5 min.). After discarding the supernatant, the sample was suspended in 200 μ L of Carnoy's solution (3 parts methanol and 1 part acetic acid) and kept at 4°C for 5 minutes. After two washes with PBS, the samples were incubated for 60 min at room temperature with CMA3 staining solution (0.25mg/mL of CMA3 in McIlvaine's buffer). Subsequently, the samples were washed and resuspended in 1mL PBS. Then, the samples were analyzed in a flow cytometer (FAC Scalibur 6 BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events at a rate of 500 cells per sec, were analyzed per sample. For the positive control, 2×10^6 sperm were fixed in 7.5mL of chlorine-free Carnoy's solution (3 methanol: and 1 acetic acid), incubated for 10 min at room temperature, and centrifuged at 4°C (3.074 x g, 15 min). After discarding the supernatant, the sample was washed with 2 mL of PBS, and the pellet was resuspended and incubated with 0.6 mL of PBS and 0.1% Triton (15 min/37°C). The permeabilized sample was centrifuged at 4°C (3.074 x g, 15 min), the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended and incubated in 0.6 mL of 1mM NaCl and 5mM dithiothreitol (DTT) for 1 hour at room temperature. The DTT-treated sample was centrifuged at 4°C (3.074g, 15 min), the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 90 μ L of PBS. The positive control was incubated for 60 minutes at room temperature with the CMA3 staining solution (0.25mg/mL of CMA3 in McIlvaine's buffer). After 60 min, the sample was washed and resuspended in 1mL of PBS. Then, the sample was analyzed in a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.3.12. Chromatin condensation with Toluidine Blue

The sperm chromatin condensation was prepared with smears of thawed semen. The smears were fixed in a ethanol solution and acetic acid (3:1) for one minute and then in 70% ethanol for 3 min. The smears were air-dried and hydrolyzed for 15 minutes in 4N hydrochloric acid. They were then washed in distilled water and air-dried at room temperature. A 10 μ L drop of 0.025% toluidine blue in McIlvaine's buffer was added, covered with a coverslip, and left to

stain for 3 min. After that 500 sperm per slide were evaluated under microscope (x1000) and classified as with compact chromatin (lightly stained head) or decondensed chromatin (dark blue or violet-stained head, Fig. 3).

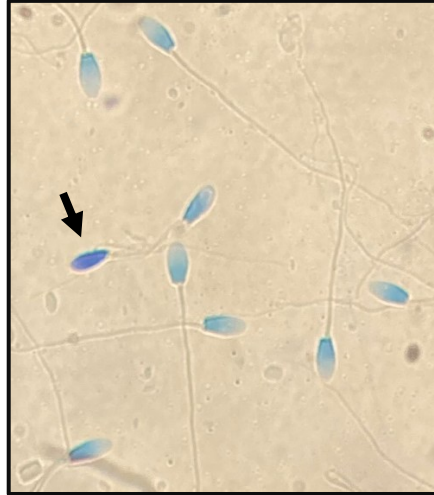


Figure 3: Sperm chromatin condensation level with Toluidine Blue. The figure shows sperm with compact chromatin (head lightly stained in light blue) and decondensed chromatin (head stained in dark blue or violet) indicated by the black arrow.

2.3.13. Number of equine sperm bound to bovine oviduct explants

Dissected oviducts from ovaries without a corpus luteum of cows slaughtered in an Abatoir were used. The isthmus region was pressed on a Petri dish containing TCM 199 culture medium + 10% FBS + 0.1 mg/ml streptomycin + 100 IU/ml penicillin. The oviduct cells were aspirated with a 30 x 0.8 mm needle attached to a 5ml syringe and transferred to a 14 ml Falcon tube for sedimentation. This procedure was repeated three times to disaggregate the oviduct cells, and then they were transferred to drops with TCM 199 medium with Hepes, 10% FBS, 0.1 mg/ml streptomycin, and 100 IU/ml penicillin for reaggregation and explant formation for 24 hours of incubation at 38.5°C with 5% CO₂. An aliquot of semen from each treatment with 1×10^6 sperm/ml was distributed in 80 μ l drops containing 25 explants/treatment/stallion, and the sperm-explant incubation was carried out for 30 min. Three washes with TCM 99 medium were performed to remove sperm not bound to the explants. The explants were placed between a slide and a coverslip, and the number of sperm bound to the perimeter of the explants was calculated using Image J software (Version 1.52a).

2.3.14. Gene Expression Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Gene Expression RT-qPCR was used to analyze the expression of genes related to apoptosis, such as B-cell lymphoma 2 (BCL2) and BCL2-associated X (BAX), mitochondrial ROS modulator 1 (ROMO1), sperm-associated antigen 3 (SPACA3), and oxidative damage repair DNA glycosylase 1 (OGG1). For RNA extraction, semen samples cryopreserved with different concentrations of resveratrol were thawed and incubated (10 min) at room temperature with viral lysis buffer (AVL) to inactivate nucleases and preserve RNA. Then, ethanol was added to precipitate RNA, which was separated by centrifugation. After successive washes with wash buffer 1 (AW1) and wash buffer 2 (AW2) to remove different types of contaminants, RNA was resuspended in ultrapure water and quantified using NanoDrop Lite Plus (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using Oligo dT primer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Transcript expression levels were analyzed by RT-qPCR using the qPCR Green Master kit (Cellco Biotech, São Paulo, BR), and the primers were listed in Table 1. The expression of each target gene was quantified relative to the internal β -actin gene using the equation $R=2 - [\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]$.

Table 1. Primer sequence used for gene expression analysis of post-thaw equine sperm

Gene	Primer sequence (5' –3')	Product size (bp)	NCBI Accession Number
β -actin	F: CCAGCACGATGAAGATCAAG	88	AF035774 (Pérez Rico et al., 2014)
	R: GTGGACAATGAGGCCAGAAT		
BAX	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	162	XM_001489207.1 (Leon et al., 2011)
	R: ATCCTCTGCAGCTCCATGTT		
BCL2	F: GAGACCCCCAGTGCCATCAA	146	XM_001499714.1 (Leon et al., 2011)
	R: GGGATGTCAGGTCGCTGAAT		
OGG1	F: AACAAACAACATTGCCCGCAT	100	XM_023620020

Gene	Primer sequence (5' –3')	Product size (bp)	NCBI Accession Number
	R: GGAAGCCATGGTAGGTGAC		
ROMO1	F: TTCAGTCCTCCGCTACGGG	98	XM_005604601.3
	R: GTCTCACACAGAACGCAAGG		
SPACA3	F: AACACAGCTGCCGTGGAC	76	XM_023653031
	R: ACCACTTCCGGCTGTTGA		

BAX, BCL2-associated X; BCL2, B-cell lymphoma 2; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ROMO1, Reactive Oxygen Species Modulator 1; SPACA3, Sperm Acrosome Associated 3.

2.3.15. Statistical Analysis

The experimental design used was randomized complete blocks, considering the stallion as the block. Statistical analysis of motility characteristics, measurement of oxidants, DNA fragmentation, membrane integrity and functionality, spermatic lipid peroxidation, and binding rate of equine sperm to bovine oviduct explants was performed through analysis of variance (ANOVA) and compared with Tukey's test. Comparison of gene expression was performed using independent samples t-test. Data were analyzed using the R program, with a probability of $P < 0.05$ considered significant.

3. Results

The mean sperm characteristics of two semen collections from 10 stallions were calculated (Table 2). The ejaculates showed total motility (TM) ranging from 70 to 90%, progressive motility (PM) between 60 and 80%, and sperm vigor of 3 and 4. All characteristics were within the desirable range for semen cryopreservation according to the Manual for Andrological Examination and Animal Semen Evaluation of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). Sperm concentration ranged from 180×10^6 to 522×10^6 sperm/mL and the total number of sperm in the ejaculate from 5.2×10^9 to 18.7×10^9 . The percentage of morphologically normal sperm in the ejaculate ranged from 75% to 85% (Table 2).

Table 2: Sperm characteristics of fresh semen (n=10)

Stallion	TM (%)	PM (%)	Vigor (0-5)	Volume (ml)	N° total esp. x 10 ⁹	Conc./ml x 10 ⁶	Normal morphology (%)
1	80	70	4	75	18.7	250	80
2	70	60	4	35	6.6	190	76
3	70	65	3	33	9.6	290	85
4	80	70	3	50	11.5	230	84
5	75	60	4	55	9.9	180	75
6	90	80	4	36	11.8	330	75
7	80	70	3	40	18.6	464	70
8	70	60	3	20	10.4	522	80
9	80	70	3	20	5.2	260	85
10	85	75	3	30	9.1	302	75
Mean	78	68	3.4	39.4	11.1	301.8	78.5

TM = Total motility, PM = Progressive motility, N° total esp. = Total number of sperm in the ejaculate, Conc./ml = Sperm concentration per milliliter. Normal morphology: Sperm with normal morphology.

The addition of 10 μ M resveratrol significantly increased the percentage of sperm with TM compared to the control when evaluated by the CASA system (Table 3, $P < 0.05$). The treatments with 5-, 10- and 100- μ M Resveratrol showed similar TM ($P > 0.05$). The other sperm motility and kinematics variables did not differ among treatments (Table 3, $P > 0.05$).

Table 3: Post-thawed sperm motility and kinematic parameters evaluated by CASA system in different treatments with different concentrations of Resveratrol ($X \pm SE$).

Treat.	TM (%)	PM (%)	RAP (%)	VAP (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VCL (μ m/s)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	WOB (%)	ALH (μ m)
0	41.3 $\pm$ 10.6	$\pm$ 10.7	$\pm$ 18.9 $\pm$	13.4 $\pm$	28.5 $\pm$	9.0 $\pm$	70.5 $\pm$	46.8 $\pm$	66.2 $\pm$	2.2 $\pm$	
	5.0 ^b	1.4	0.2	1.4	1.2	1.7	0.7	1.9	2.6	2.2	0.1

5	51.3± 5.9 ^{ab}	10.7± 1.7	10.9± 0.3	19.2± 1.3	13.6± 1.1	28.5± 1.7	8.4± 0.6	70.2± 1.7	47.4± 2.4	67.1± 2.1	2.2± 0.1
10	56.2± 5.8 ^a	10.9± 1.7	11.3± 0.3	19.8± 1.1	14.3± 0.9	29.1± 1.7	8.4± 0.5	72.9± 1.7	49.5± 2.5	68.4± 2.1	2.2± 0.1
100	51.2± 5.8 ^{ab}	10.9± 1.7	11.4± 0.3	18.8± 1.3	13.4± 1.3	28.8± 1.7	8.7± 0.6	70.9± 1.7	46.9± 2.5	65.7± 2.1	2.3± 0.1
150	44.5± 5.9 ^b	9.8± 1.7	11.2± 0.3	18.5± 1.2	13.3± 1.1	27.9± 1.9	8.2± 0.6	71.2± 1.7	47.5± 2.4	66.4± 2.1	2.2± 0.1

^{ab} Values with different superscripts between lines differ statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol; TM: % total motility; PM: % progressive motility; VAP: average path velocity; VSL: straight-line velocity; VCL: curvilinear velocity; BCF: beat-cross frequency; STR: straightness; LIN: linearity; WOB: wobble index.

The percentage of normal morphologically sperm and sperm defect did not differ statistically among the treatments (Table 4, $P > 0.05$).

Table 4: Percentage of sperm morphology with resveratrol addition ($X \pm SE$)

Treat.	Normal	Bent tail	Proximal CD	Distal CD	Head	Midpiece
0	76.6 $\pm$ 1.8	10.6 $\pm$ 1.8	3.8 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.4
5	76.7 $\pm$ 1.8	10.7 $\pm$ 1.7	4.2 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.4
10	76.5 $\pm$ 1.8	10.4 $\pm$ 1.8	4.0 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.4
100	76.7 $\pm$ 1.8	11.1 $\pm$ 1.7	3.9 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.4
150	75.9 $\pm$ 1.8	10.6 $\pm$ 1.8	4.3 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.4

Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol, Midpiece = Midpiece

defects, Head = Head defects, Proximal CD = Proximal cytoplasmic droplets, and Distal CD = Distal cytoplasmic droplets. There was no statistical difference between the values within rows and columns ($P > 0.05$).

No difference regarding the percentage of sperm with functional plasma membrane (HOST+) and intact (PI-) and spontaneous acrosome reaction (PI-/PNA+) were observed between the treatments (Table 5, $P > 0.05$).

Table 5: Percentage of sperm with functional membrane (HOST+), and intact plasma membrane (PM) and spontaneous acrosome reaction (RA) with resveratrol addition ($X \pm SE$).

Trat.	% HOST +	% intact PM	% RA
0	42.4 ± 3.5	29.7 ± 2.5	0.20 ± 0.1
5	44.9 ± 4.5	30.9 ± 2.5	0.29 ± 0.1
10	50.2 ± 4.6	28.3 ± 2.4	0.19 ± 0.1
100	52.3 ± 4.5	27.3 ± 2.5	0.21 ± 0.1
150	45.2 ± 5.6	29.7 ± 2.4	0.24 ± 0.1

Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol. There was no statistical difference between the values within rows and columns ($P > 0.05$).

The addition of 10 μ M resveratrol significantly increased the percentage of sperm showing mitochondrial membrane potential (Mitotracker+) and intact plasma membrane (PI-, Fig. 4, $P < 0.05$).

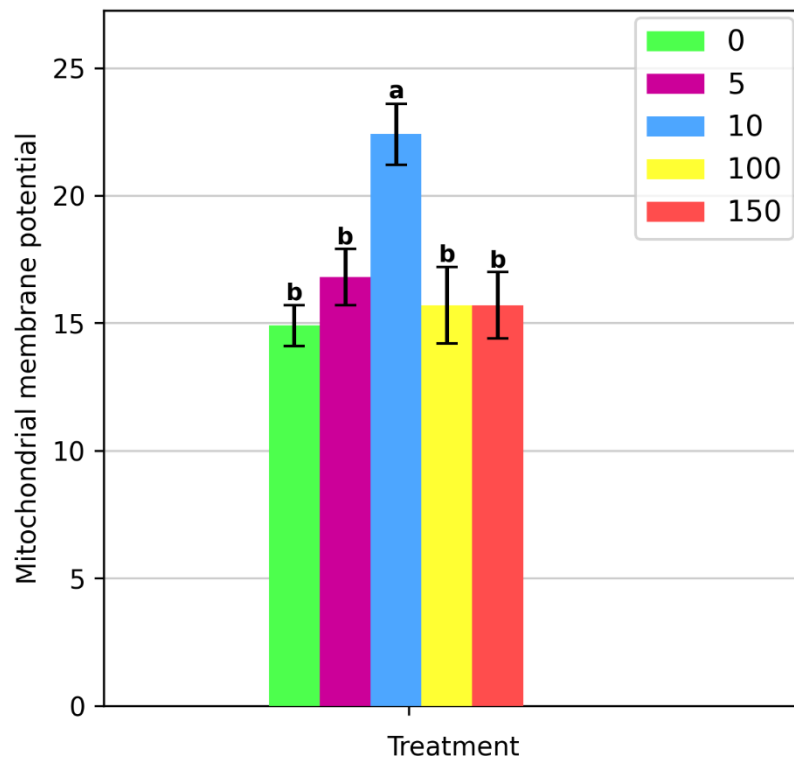


Figure 4: Percentage of sperm with mitochondrial membrane potential (Mitotracker+) and intact plasma membrane (PI-) with the addition of different concentrations of resveratrol ($X \pm SE$). ^{ab} Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). Trat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μM Resveratrol.

The addition of different concentrations of resveratrol to the freezing extender did not affect the sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+), and the concentrations of NO^{2-} , H_2O_2 , and malondialdehyde produced by the sperm among the treatments (Table 6, $P > 0.05$). However, the addition of 10 μM resveratrol significantly decreased the sperm fluorescence intensity of total reactive oxygen species (Table 6, $P < 0.05$), which means that resveratrol decreases the total reactive oxygen/nitrogen species in the cryopreserved sperm.

Table 6: Sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+), H_2O_2 and NO^{2-} ($\mu M/\mu g$ protein), and malondialdehyde (nM/ml of TBARS/mL) concentration and fluorescence intensity (AU) of total ROS ($X \pm SE$).

Treat.	Lipid peroxidation %	H ₂ O ₂ μM/ug protein	NO ²⁻ nM/ml	Malondialdehyde TBARS/mL	Total ROS UA
0	19.3 ± 0.8	26.5 ± 1.4	9.6 ± 0.8	7.9 ± 0.7	3735 ± 380 ^a
5	18.9 ± 0.2	26.2 ± 1.2	9.8 ± 0.9	6.6 ± 0.8	3160 ± 371 ^a
10	16.8 ± 0.3	24.1 ± 1.1	9.9 ± 0.8	5.2 ± 0.7	1887 ± 203 ^b
100	19.3 ± 0.2	24.3 ± 1.2	9.5 ± 0.9	5.4 ± 0.8	3437 ± 440 ^a
150	18.7 ± 0.2	24.9 ± 1.3	9.4 ± 0.8	6.6 ± 0.8	3433 ± 407 ^a

^{ab} Values with different superscripts between lines differ statistically (P<0.05). Trat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μM Resveratrol.

There were no statistical differences on the percentage of sperm DNA protamination deficiency and decondensation with different resveratrol concentrations using CMA3 and Toluidine Blue (Table 7, P > 0.05).

Table 7: Percentage of sperm DNA protamination deficiency and decondensation with different resveratrol concentrations (X ± SE).

Treatments	% Sperm	
	DNA protamination deficiency	Chromatin decondensation
0	5.0 ± 0.9	3.4 ± 0.1
5	3.8 ± 0.5	2.4 ± 0.1
10	4.3 ± 0.5	3.3 ± 0.1
100	5.1 ± 0.7	4.1 ± 0.1
150	4.7 ± 0.6	3.0 ± 0.1

0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μM Resveratrol. There was no statistical difference among treatments (P > 0.05).

The addition of 5 and 10 μM resveratrol to the semen freezing extender significantly increased the number of sperm bound to bovine oviduct explants compared to the control and 150 μM (Fig. 5, $P < 0.05$). The 100 μM resveratrol showed similar number of sperm bound to bovine oviduct explants in comparison to 10 and 150 μM .

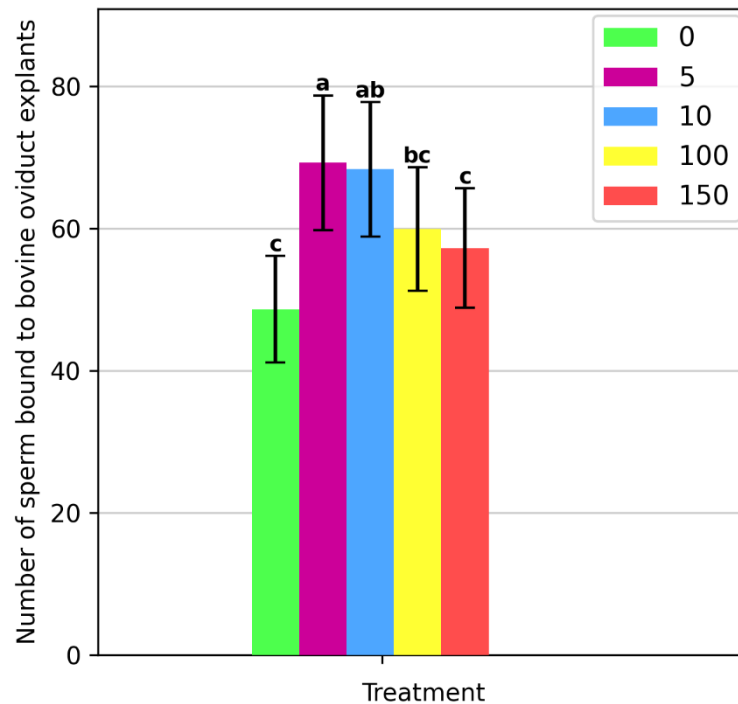


Figure 5: Number of sperm bound to bovine oviduct explants with the addition of different concentrations of resveratrol ($X \pm \text{SE}$). ^{abc} Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). Trat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μM Resveratrol.

The semen samples supplemented with 10 μM resveratrol showed a significantly increased gene expression level of BCL2 and a reduced expression of BAX compared to the control group ($P < 0.05$, Fig. 6). The expression level of the ROMO1 gene was significantly reduced in semen samples supplemented with 10 μM resveratrol compared to the control ($P < 0.05$, Fig. 6). On the other hand, expression levels of OGG1 gene did not show statistical differences among the treatments (Fig. 6, $P > 0.05$). Additionally, the expression levels of SPACA3 gene in post-thaw sperm were significantly higher in semen samples supplemented with 5 and 10 μM resveratrol compared to the control group ($P < 0.05$, Fig. 6).

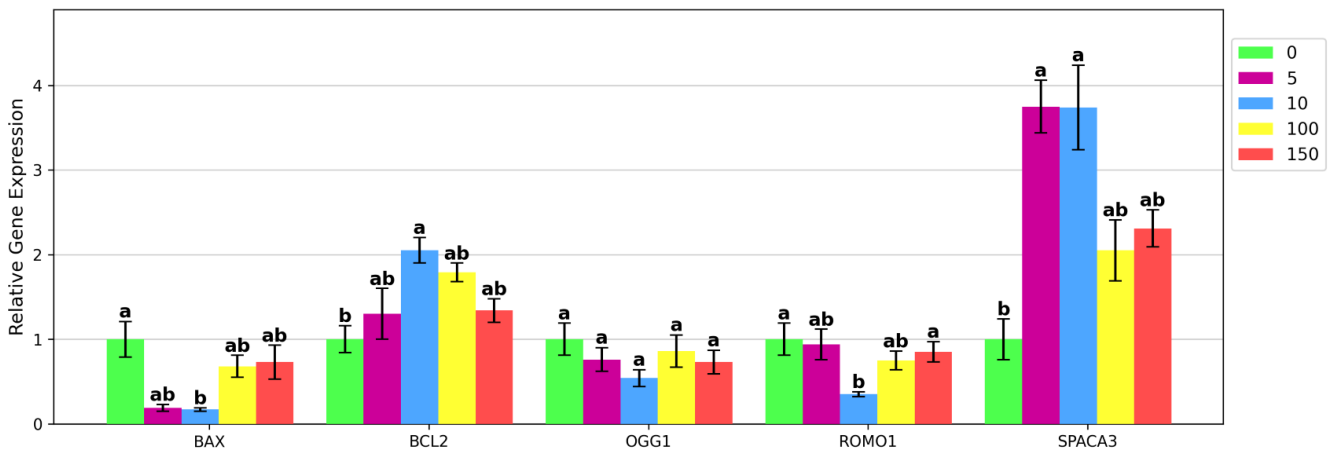


Figure 6: BAX: BCL2-associated X protein, BCL2: B-cell lymphoma 2, OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, ROMO1: reactive oxygen species modulator 1, SPACA3: sperm acrosome associated 3. ^{ab} Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$). 0 = INRA 96 (control), 5, 10, 100, 150 = 5, 10, 100, 150 μ M Resveratrol.

4. Discussion

In the present study, the addition of 10 μ M resveratrol to the equine semen freezing extender increased motility, mitochondrial activity, BCL2 gene expression, and decreased total ROS and ROMO1 and BAX gene expression. These results indicated that resveratrol protects sperm metabolism, has antioxidant and antiapoptotic actions during the cryopreservation process. Additionally, 5 and 10 μ M resveratrol increased SPACA3 gene expression and the number of sperm bound to bovine oviduct explant cells.

In our study, increased levels of the anti-apoptotic gene BCL2 and reduced levels of the pro-apoptotic gene BAX indicated that resveratrol reduced apoptosis during cryopreservation. Beneficial effects of resveratrol on sperm were also reported in other species and with other concentrations. Resveratrol treatment reduced apoptosis in cryopreserved dog semen with 200 μ M resveratrol (Bang et al., 2021) and post-thaw boar semen supplemented with 1 mM resveratrol (He et al., 2020).

ROMO1 is a key gene for generating mitochondrial ROS production (Shin et al., 2013), and high levels of endogenous ROS created in the mitochondrial respiratory chain can cause random genetic alterations, mutations, and lead to apoptosis (Turrens, 2003). In our study, after resveratrol supplementation, the gene expression level of ROMO1 was significantly reduced

compared to the control. Our results suggested that resveratrol can protect mitochondria during sperm freezing- thawing process resulting in ROS reduction.

The sperm acrosome-associated gene 3 (SPACA3) conserves substrate binding sites for N-acetylglucosamine oligosaccharides present in the extracellular matrix around the plasma membrane. Leung et al. (2023) reported that SPACA3 gene is associated with sperm binding capacity to the zona pellucida. In the present study, increased SPACA3 expression with 5 and 10 μ M resveratrol might be related to an increase of sperm binding capacity to the zona pellucida. In cryopreserved dog semen supplemented with 200 μ M resveratrol reduced ROMO1 gene expression and increase SPACA3 expression (Bang et al., 2021)

Additionally, in the present work, 5 and 10 μ M resveratrol increased the number of sperm bound to bovine oviduct explant cells. The sperm reservoir is known to regulate the timing of sperm capacitation (Fazeli et al., 1999, Tienthai et al., 2004), helping to maintain their viability in the female reproductive tract and synchronizing their release with ovulation (Pollard et al., 1991). Using an oviduct explant model, it was demonstrated that stallion sperm binding to the epithelium could induce capacitation in vitro (Leemans et al., 2014). The number of sperm bound to the explant in co-culture showed a positive correlation with fertility rates. Additionally, sperm from the higher fertility stallion group remained bound to the explant for a longer period compared to the average group, indicating that factors related to binding capacity are directly linked to fertility (Ellington et al., 1999). In the present study, the addition of 5 and 10 μ M resveratrol increased the number of sperm bound to bovine oviduct explant cells.

Resveratrol addition to semen extenders has been carried out in various species. In ovine species, supplementation of 15 μ g resveratrol in the extender inhibited lipid peroxidation of semen refrigerated for 24 hours (Sarlós et al., 2002). Adding 10 mM resveratrol to human semen freezing extenders reduced DNA fragmentation (Branco et al., 2010) and concentrations of 0.1, 1, and 10 mM reduced lipid peroxidation of frozen human sperm (Garcez et al., 2010). Corroborating with the present study, the supplementation of 1 mM resveratrol to semen extenders increased motility, mitochondrial activity, and DNA integrity of post-thaw bull semen (Bucak et al., 2015). In bovine, when the extender was supplemented with 50 μ M resveratrol, an improvement in some sperm kinetics parameters (progressive motility and linear trajectory) and the percentage of sperm with intact plasma membranes were observed (Assunção, 2016).

A study with cooled equine semen tested 10, 20, 40, and 80 μM resveratrol addition to Kenney's extender (Giaretta et al., 2014). After 24 hours of cooling, a reduction in the percentage of viable sperm with high mitochondrial potential (40 and 80 μM) compared to the control was observed, as well as reduced sperm kinetics (80 μM) compared to the control and 20 μM . The authors reported that high concentrations (40 and 80 μM) may act as pro-oxidants causing sperm damage (Giaretta et al., 2014). In contrast to our results, 1- and 10-mM resveratrol addition to the equine semen freezing extender reduced ROS concentration, however, exhibited cytotoxic effects, did not preserve sperm motility and viability (Matheny et al., 2015).

Nouri et al. (2018) selected Arab stallions with low sperm quality and added 5, 10, and 20 μM resveratrol in a milk-based freezing extender, supplemented with 4% egg yolk and 5% N-dimethylformamide. The concentration of 5 μM resveratrol did not influence the evaluated parameters, however, 20 μM had deleterious effects on total motility. Corroborating to the present study, positive results were obtained with 10 μM , on total and progressive motility, plasma membrane integrity, viability, mitochondrial membrane potential, ROS production, and DNA fragmentation (Nouri et al., 2018).

The sperm freezing and thawing process increases ROS production, which negatively affects sperm viability, motility, and fertilization capacity (Thomson et al., 2009). Sperm motility, viability, and mitochondrial activity are the functions most affected by ROS activity, which can lead to reduced fertility at the time of artificial insemination (Lecewicz, 2018). Extender supplementation with antioxidants can neutralize oxidative stress and protect sperm against the adverse effects of ROS (Alvarenga et al., 2017). This study indicated that resveratrol protected mitochondrial function and reduced total ROS production during the freezing process. Similar semen freezing results were reported in humans, where 0.1, 1, and 10 mM of resveratrol reduced post-thaw lipoperoxidation in both fertile and infertile men (Garcez et al., 2010).

Studies have shown that resveratrol activates the AMPK pathway in sperm. AMPK is a key kinase involved in regulating cellular redox state, altering metabolic pathways under stress conditions (Takeo et al., 2014). In human sperm, it has been demonstrated that AMP-activated protein kinases are present mainly throughout the flagellum and the post-equatorial region of the head (Nashtaei et al., 2017). Related to these findings, resveratrol supplementation increased AMPK activity and was beneficial to protect cryopreserved human sperm against oxidative stress improving its DNA integrity (Nashtaei et al., 2017). Similar results were reported in pigs (Zhu et al., 2019) and goats (Zhu et al., 2018). In both studies, resveratrol addition activated AMPK phosphorylation, reduced ROS production, increased GSH levels and activities of

glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase. AMPK has been identified in human and stallion sperm with a regulatory role in sperm motility and maintaining sperm quality during prolonged storage (Hurtado de Llera et al., 2012; Córdova et al., 2014). AMPK activation was responsible for reducing ROS levels in chicken sperm cryopreservation, restoring ATP levels and the antioxidant system, leading to better quality of cryopreserved sperm (Nguyen et al., 2015).

5. Conclusion

Supplementation of 10 μ M resveratrol to semen freezing extender improved equine sperm metabolism, has antioxidant action, reduced apoptosis and increased the number of sperm bound bovine oviduct explants. Thus, 10 μ M resveratrol addition to freezing extender might be beneficial to increase the fertility of cryopreserved semen in equine artificial insemination programs.

6. References

- ASADI N.; BAHMANI M.; KHERADMAND A.. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. *J. Clin. Diagn*, 1-5, 2017.
- ASSUNÇÃO, C.M. Efeito do resveratrol na criopreservação do sêmen bovino. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.
- BANG, S.; QAMAR, A.Y.; TANGA, B.M.; FANG, X.; CHO, J. Resveratrol supplementation into extender protects against cryodamage in dog post-thaw sperm. *J Vet Med Sci.*, 2021 Jul 10; 83(6):973-980. doi: 10.1292/jvms.21-0125. PMID: 33896876; PMCID: PMC8267189.
- BRANCO, C. S. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, v. 60, p. 235–237, 2010.
- BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BAŞPINAR, N.; UYSAL, O.; TAŞPINAR, M.; BILGILI, A.; ÖZTÜRK, C.; GÜNGÖR, S.; İNANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: Sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 2015. doi:10.1111/and.12301.

Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-10, 1978. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. CBRA, 2013.

CORDOVA, A.; STROBEL, P.; VALLEJO, A.; VALENZUELA, P.; ULLOA, O.; BURGOS, R. A. Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology*, v. 69, p. 473–481, 2014. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.10.008.

ELLINGTON, J. E.; SAMPER, J. C.; JONES, A. E.; OLIVER, S. A.; BURNETT, K. M.; WRIGHT, R. W. In vitro interactions of cryopreserved stallion sperm and oviduct oviduct/epithelial cells or their secretory products. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 51-65, 1999.

ESTRADA, E.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; ROCHA, L.G.; BALASCH, S.; BONET, S.; YESTE, M. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2014.

FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated sperm to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction*. 60:879-86, 1999.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.*, 2015, doi: 10.1155/2015/837042. PMID: 26221416; PMCID: PMC4499410.

GARCEZ, M.E.; DOS SANTOS BRANCO, C.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil. Steril.*, 2010, doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.

GIARETTA, E. Is resveratrol effective in protecting stallion cooled semen? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, p. 1307–1312, 2014.

GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*, v. 2, p. 147–156, 1997.

HARDIE, D. G.; SCOTT, J. W.; PAN, D. A.; HUDSON, E. R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.*, v. 546, p. 113–120, 2013. doi:10.1016/S0014-5793(03)00560-X.

HE, W. H.; ZHAI, X. H.; DUAN, X. J.; DI, H. S. Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 21: 485–494, 2020. doi: 10.1631/jzus.B1900520

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online* 2018.

HURTADO DE LLERA, A.; MARTIN-HIDALGO, D.; GIL, M. C.; GARCIA-MARIN, L. J.; BRAGADO, M. J. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar sperm and regulates motility. *PLoS ONE*, v. 7, e38840, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038840.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proc. 21st Am. Ass. Eq. Pract.*, p.327-349. 1975.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Androl.*, v. 32, n.3, p. 163-167, 2000.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; SOSTARIC, E.; NELIS, H.; STOUT, T. A.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biology of Reproduction*, v. 91, p. 1-13, 2014.

LEON, P.M.; CAMPOS, V.F.; KAEFER, C.; BEGNINI, K.R.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A.; SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. *Zygote*, 21(3):279-85, 2011. doi: 10.1017/S0967199411000554.

LEUNG, M. R.; ZENG, J.; WANG, X.; ROELOFS, M. C.; HUANG, W.; ZENEZINI CHIOZZI, R.; HEVLER, J. F.; HECK, A. J. R.; DUTCHER, S. K.; BROWN, A.; ZHANG, R.; ZEEV-BEN-MORDEHAI, T. Structural specializations of the sperm tail.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl*, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.

MATHENY, K. Posters 140 Effects of resveratrol on post-thaw quality of stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 35, p. 437-445, 2015.

MIES FILHO, A. Tecnologia do semen I – Exame e classificação. In: Reprodução dos animais e inseminação artificial. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, v. 2. p. 423-458, 1975

NAIJIAN, H.R.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z.; SHARAFI, M.; BUCAK, M.N. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*, 2013, doi:10.1016/j.cryobiol.2012.12.010.

NASHTAEI, M. S.; AMIDI, F.; SEDIGHI GILANI, M. A.; ALEYASIN, A.; BAKHSHALIZADEH, S.; NAJI, M.; NEKOONAM, S. Protective features of resveratrol on human sperm cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 2017. doi:10.1111/andr.12306.

NGUYEN, T. M.; SEIGNEURIN, F.; FROMENT, P.; COMBARNOUS, Y.; BLESBOIS, E. The 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the augmentation of antioxidant defenses in cryopreserved chicken sperm. *PLoS ONE*, v. 10, e0134420, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0134420.

NOURI, H.; SHOJAEIAN, K.; SAMADIAN, F.; LEE, S.; KOHRAM, H.; LEE, J. I. Using resveratrol and epigallocatechin-3-gallate to improve cryopreservation of stallion sperm with low quality. *J. Equine Vet. Sci.*, 2018. doi: 10.1016/j.jevs.2018.07.003.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, v.220, p. 403-409, 1994.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZAŃSKI, W.; TWARDOŃ, J. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian sperm using C₍₁₁₎-BODIPY_(581/591) *Theriogenology*. 75(9):1623–1629, 2011. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.002.

PÉREZ-RICO, A.; CRESPO, F.; SANMARTÍN, M.L.; DE SANTIAGO, A.; VEGA-PLA, J.L. Determining ACTB, ATP5B and RPL32 as optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of cryopreserved stallion semen, *Animal Reproduction Science*, 149: 3–4, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.007>.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxidants Redox Signal.*, 2009.

PILLET, E.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci. Technol.* 88, 257–265, 2008. <https://doi.org/10.1051/dst:2008002>

POLLARD, J.W.; PLANTE, C.; KING, W.A.; HANSEN, P.J.; BETTERIDGE, K.J.; SUAREZ, S.S. Fertilizing Capacity of Bovine Sperm May to Oviductal Epithelial Be Maintained by Binding. *Biology of Reproduction*. 44:102-7, 1991.

POLLARD, C. L.; GIBB, Z.; SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G. NAD⁺, Sirtuins and PARPs: enhancing oocyte developmental competence. *Journal of Reproduction and Development*, v. 68, n. 6, p. 345-354, 2022.

ROCA, J.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. Dead sperm in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed sperm. *Fertil. Steril.*, v. 100, n. 3, p. 875-881, 2013.

SARLÓS, P. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 50, n. 2, p. 235–245, 2002.

SHIN, J. A.; CHUNG, J. S.; CHO, S. H.; KIM, H. J.; YOO, Y. D. ROMO1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 439, p. 315–320, 2013.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.; MENDES, C.; MARQUES, M.; NICACIO, A.; DE BARROS, F.; ASSUMPÇÃO, M. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(3), 79–83, 2009. <https://doi.org/10.1080/10520290902843595>

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIKI, R.; IWATA, H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, v. 60, p. 92–99, 2014. doi:10.1262/jrd.2013-102.

TASH J.S.; MANN F.R.S. Adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of sperm. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 184, 109-114, 1973.

THOMSON, L.K.; FLEMING, S.D.; AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; ZIESCHANG, J.A.; CLARK, A.M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 24, 2061–2070, 2009.

TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science*. 80:131-46, 2004.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, v. 552, n. Pt 2, p. 335-344, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

ZHU, Z.; LI, R.; FAN, X.; LV, Y.; ZHENG, Y.; HOQUE, S. A. M.; WU, D.; ZENG, W. Resveratrol improves boar sperm quality via 5' AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. 2019, doi:10.1155/2019/5921503.

ZHU, Z.; LI, R.; MA, G.; FAN, X. 5' AMP-activated protein kinase regulates goat sperm functions via energy metabolism in vitro. 2018, v. 86, p. 2420–2431, doi:10.1159/000491616.

CAPÍTULO 3

Artigo 2 submetido à *Reproduction in Domestic Animals*

Niacin supplementation in the equine semen freezing extender

Artigo 2 a ser submetido à *Revista Reproduction*

Natália de Castro Alves¹, Marina Morra Freitas¹, Jade Raquel Dias Faria¹, Cesar Lopes Horta¹, Olindo Assis Martins-Filho², Márcio Sobreira Silva Araújo², Guilherme Mattos Jardim Costa³, Erica Azevedo Costa¹, Fernanda Radicchi Lobato de Almeida³, Paulo Henrique Ribeiro Amaral⁴, Juan Carlos González Pérez⁴, Ângela Quintão Lana¹, Isadora Martins Pinto Coelho¹, Ailton Junior Antunes da Costa¹, Monique de Albuquerque Lagares¹

¹ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil

² Centro de pesquisa René Rachou, Fiocruz, Laboratório de diagnóstico e monitoramento de biomarcadores, Belo Horizonte, Brasil

³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁴ Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Autor correspondente: Monique de Albuquerque Lagares, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil.

Email: mdalagares@hotmail.com

Abstract

Antioxidants addition to equine sperm may reduce the damage during semen cryopreservation. This study aimed to evaluate the effects of niacin addition at various concentrations to an equine semen cryopreservation extender. Ejaculates from ten stallions were frozen using the INRA 96 freezing extender (control) and extenders containing 10 and 20 mM niacin, resulting in three treatments. After thawing, the semen samples were assessed for motility, kinematic parameters, sperm morphology, viability, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial potential, lipid peroxidation, nitrite, hydrogen peroxide and malondialdehyde levels, reactive oxygen species, sperm DNA integrity (protamine deficiency and chromatin condensation), sperm binding to bovine oviduct explants, and gene expression of apoptosis-related genes (BCL2, BAX), the mitochondrial ROS modulator (ROMO1), the sperm binding capacity gene (SPACA3), and the DNA repair gene (OGG1). Data were analyzed using analysis of variance and Tukey test, with a significance of $P < 0.05$. The inclusion of 10 mM niacin improved sperm motility, mitochondrial activity, and the expression of BCL2 and SPACA3 genes and sperm binding to oviduct cells while reduced levels of reactive oxygen species (ROS), ROMO1 and BAX genes expression. Machine learning techniques were employed to classify the samples based on semen parameters, highlighting the significance of niacin effects on sperm quality. As a result, the most relevant variables were SPACA3, ROMO1, sperm binding, BCL2, BAX, mitochondrial activity, and ROS production.

In conclusion, addition of 10 mM niacin to semen freezing extender enhanced equine sperm metabolism, exerted antioxidant effects, reduced apoptosis and increased the number of sperm bound to bovine oviduct explants, according to ANOVA analysis. Further, machine learning technique indicated greatest importance of the parameters sperm bound to bovine oviduct explants and SPACA3 gene expression. These findings suggest that 10 mM niacin might be an alternative to improve cryopreserved semen quality in equine artificial insemination programs.

Keywords: antioxidant, reproduction, cryopreservation, semen, stallion, artificial intelligence.

1. Introduction

During semen cryopreservation, there is an increase of reactive oxygen species (ROS), production which compromise sperm viability, motility, and longevity (Roca et al., 2013). Adding antioxidants to semen extenders can be a strategy to reduce oxidative stress and improve sperm quality during cryopreservation. Niacin (NA), or vitamin B3 or nicotinic acid, is an organic compound found in foods such as fish, mushrooms, peanuts, and chicken breast (Jacob et al., 2006). It is a precursor to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and NAD phosphate (NADP). Its function is essential in energy metabolism, apoptosis control, and DNA repair, and it plays antioxidant and anti-inflammatory roles (Ilkhani et al., 2016).

Sperm mitochondria play a crucial role in maintaining sperm motility, requiring energy and metabolites such as NAD (NADH) and NADP (NADPH) for the ATP signaling pathway (Lee et al., 2014). NADP primarily facilitates anabolic reactions (Alberts et al., 2011; Pollard et al., 2022). NAD participates in redox reactions by acting as an oxidizing agent that captures and transports electrons and protons (H^+). NADH is essential for mitochondrial metabolism, which produces ATP (Alberts et al., 2011; Pollard et al., 2022). When semen extenders are supplemented with niacin, they promote ATP formation, providing energy for sperm (Alberts et al., 2011). The half-life of an NAD molecule is approximately 1 to 2 hours, making it important to supply substrates for its replenishment to maintain cellular energy production (Pollard et al., 2022).

In addition to its metabolic functions, niacin has demonstrated strong antioxidant properties that protect against oxidative damage in human sperm (Ogata et al., 2002). Kim et al. (2015) found that adding 5 and 10 mM niacin to pig semen freezing extenders reduced lipid peroxidation and improved the integrity of the plasma membrane in frozen-thawed boar sperm. In an equine study, before freezing with 20 mM niacin, the semen was cooled for six hours and then stored at 5°C for up to 42 hours (Bahrami et al., 2020) As a result, 20 mM niacin decreased sperm lipid peroxidation and total reactive oxygen/nitrogen species in cryopreserved semen.

In the context of new sperm analysis techniques, the integration of advanced methods is revolutionizing the field of assisted reproduction. The use of oviductal cell explants allows for the replication of the oviductal environment, which is crucial for assessing the fertilization potential of sperm through their interactions with oviductal epithelial cells (Budna-Tukan et al., 2019). This approach not only facilitates the functional and morphological selection of viable

sperm (Coy et al., 2008; Miller, 2018) but also contributes to a deeper understanding of both in vivo and in vitro processes (Hafez & Hafez, 2004). Additionally, gene expression analysis emerges as an essential tool for investigating the molecular effects of semen freezing and thawing, practices that often compromise mRNA stability, protein expression, and the genetic integrity of sperm (Hezavehei et al., 2018). Within this context, artificial intelligence (AI) stands out as a powerful ally, enhancing sperm selection, fertility prediction, and the assessment of viral disease impacts on sperm modifications (Hicks et al., 2019; Wnuk et al., 2024; Amaral et al., 2024). With the support of eXplainable AI (XAI) techniques, it becomes possible to identify which substances are most influential in improving the quality of cryopreserved semen. This integrated approach promises significant advancements in optimizing cryopreservation and fertilization practices, maximizing reproductive success rates.

Niacin's potent antioxidant properties in reducing lipid peroxidation and total reactive oxygen/nitrogen species have been indicated in equine sperm (Bahrami et al., 2020). However, its impact in cryopreserved stallion semen, specifically on the number of equine sperm bound to bovine oviduct explants and gene expression, has yet to be investigated. In addition to these analyses, we employed artificial intelligence (AI) examinations to understand niacin role in cryopreserved semen, determining the key elements that were positively modified with this antioxidant supplementation.

2. Materials and Methods

All experimental procedures were conducted following Brazilian ethical and animal welfare principles for the use and care of animals in research and were approved by the Ethics Committee "Committee on the Use of Animals" (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Protocol: 394/2017 (Appendix 1).

2.1. Semen Collection and Evaluation

Two ejaculates were collected from 10 clinically healthy Mangalarga Marchador stallions (n=10), aged between 4 and 9 years, located in Minas Gerais, Brazil, during the months of March, October, November, and December. The stallions were selected based on andrological examination and reproductive history. After collection, semen was evaluated for sperm motility using a bright-field microscope (x 100). Only ejaculates with progressive motility $\geq 50\%$ were

used. Sperm concentration per milliliter was calculated using a hemocytometer. Sperm morphology was evaluated using the wet preparation technique (Mies Filho, 1975). Semen was preserved in a buffered formalin saline solution, and 200 sperm per sample were analyzed using phase-contrast microscopy (x 1000). Only ejaculates with at least 70% of morphologically normal sperm were used (CBRA, 2013).

2.2. Semen Freezing

The selected ejaculates were diluted in a 1:1 ratio with Kenney's extender (Kenney et al., 1975) and centrifuged (450 x g, 10 min). The supernatant was discarded, leaving 10% of the total volume. After homogenization, the semen was resuspended in INRA 96 freezing medium containing 2.5% glycerol and 2% supernatant of the centrifuged egg yolk (600 x g, 20 min, Pillet et al., 2008) to achieve a concentration of 100×10^6 sperm/ml. Three treatments were performed according to the niacin concentration 0 (Control), 10 and 20 mM niacin. The semen was packaged in 0.5 ml straws and cooled for 1.5 hours in a Styrofoam container (0.27 °C/min) to 5 °C. The straws were then placed 2.5 cm above liquid nitrogen, and after 20 minutes, they were immersed in it and stored in liquid nitrogen tanks (-196 °C).

2.3. Post-Thaw Sperm Evaluation

The straws were thawed at 37 °C and semen samples were analyzed including motility and kinematics, morphology, membrane functionality and integrity, rate of spontaneous acrosome reaction, lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential, DNA fragmentation, nitrite, hydrogen peroxide, total reactive oxygen species, malondialdehyde concentrations, number of sperm bound to oviduct explants, and gene expression, as described following.

2.3.1. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

Sperm motility evaluation was performed thawing one straw of each treatment (37 °C, 30 sec). A 10 µL aliquot of semen samples was placed on a Makler chamber (10 µm depth) and evaluated using a computer-assisted sperm analysis system (CASA, Sperm Class Analyzer, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Spain). Samples were assessed for total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat-cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN), and wobble (WOB). Five fields per sample were analyzed. CASA settings were: capture rate of 25 images per second; optics: Ph-; chamber: Makler; scale: obj10x, particle area (in µm²) $4 < \text{area} < 75$; curvilinear velocity (VCL):

10 < slow 45 < medium < 90 < fast $\mu\text{m/s}$; progressive motility > 75% straightness (STR), circular < 50% linearity (LIN).

2.3.2. Sperm Morphology

Sperm morphology was evaluated using a wet preparation technique (Mies Filho, 1975), where the semen samples were preserved in buffered formalin saline solution, and 100 sperm were assessed using a phase-contrast microscopy (1000x).

2.3.3. Plasma membrane functionality evaluation

The percentage of sperm with functional plasma membrane (PM) was evaluated using the hypoosmotic swelling test (HOST) with distilled water (Lomeo and Giambersio, 1991), modified by Lagares et al. (2000) at a 1:2 dilution (semen: distilled water). After semen samples thawing, a 100 μL aliquot was added to 200 μL of distilled water at 37 °C. After 5 min incubation, 200 sperm were analyzed using a phase-contrast microscopy (x 400). Tail curling sperm was considered positively react to the HOST. The final percentage of HOST+ sperm was obtained after subtracting the percentage of curled tail sperm observed in the morphological examination.

2.3.4. Plasma and acrosomal membrane integrity evaluation

The integrity of plasma and acrosomal membranes (AM) was evaluated using a flow cytometry with Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and Fluorescein Isothiocyanate-Peanut Agglutinin (FITC-PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) fluorescent probes. The thawed semen samples were diluted 1:20 in a phosphate-buffered saline (PBS, 250 μL semen: 5 mL PBS). A 200 μL aliquot of this suspension was stained with FITC-PNA (1.125 $\mu\text{g/ml}$) and incubated (10 min, 37 °C). Samples were then diluted by adding 1 mL PBS, stained with PI (1.5 mM), and incubated for 10 min at room temperature. The samples were analysed using a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample, at a rate of 500 cells per second, were analyzed. The following sperm categories were observed: PI+/PNA+: sperm with non-intact PM and AM, PI+/PNA-: sperm with non-intact PM and intact AM, PI-/PNA-: sperm with intact PM and AM, PI-/PNA+: sperm with intact PM and non-intact AM. Sperm with

spontaneous acrosome reaction were considered those with PI-/PNA+, and sperm with intact PM without spontaneous acrosome reaction were those with PI-/PNA-.

2.3.5. Mitochondrial membrane potential assessment

Mitochondrial membrane potential was assessed using flow cytometry with the fluorescent probes Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and MitoTracker Green FM (Invitrogen M7514, Massachusetts, USA). A 10 million sperm aliquot was diluted in 2 mL of PBS and centrifuged (12 min, 500 x g). The supernatant was discarded, and the samples were resuspended in 200 μ L of PBS. A volume of 0.5 μ L of the pre-warmed (37 °C) stock solution of MitoTracker Green FM (final concentration 20 nM) was added to the samples and incubated in the dark (37 °C, 15 min). Subsequently, the samples were diluted with 1 mL PBS, stained with PI (1.5 mM), and incubated (37 °C, 5 min). After that, the sperm samples were washed twice with 2 mL PBS in the tubes and centrifuged (500 x g, 12 min). The supernatant was discarded and the sperm were resuspended in 1 mL PBS. The samples were analyzed using a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample were analyzed at a rate of 500 cells per second. The results were expressed as the percentage of green stained MitoTracker Green FM, indicating active mitochondrial membrane potential, and not red stained Propidium Iodide (PI), which identifies the non-viable cells.

2.3.6. Sperm lipid peroxidation assessment

Sperm lipid peroxidation was evaluated using the fluorescent probe C11-BODIPY581/591 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA) and assessed by flow cytometry according to Partyka et al. (2011). A volume of 20 μ L semen was washed by centrifugation (500 x g, 5 min) and resuspended in 160 μ L PBS. Then, 20 μ L of C11-BODIPY581/591 (5 μ M) was added and incubated in the dark (37 °C, 30 min). The samples were then washed by centrifugation (500 x g, 5 min) and the pellet was resuspended in 500 μ L PBS. The samples were analyzed with a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events per sample were analyzed at a rate of 500 cells per second. The positive control was performed by incubating a sperm sample in hydrogen peroxide (500 μ M) at 37 °C for 60 min. The results were expressed as the percentage of green fluorescence (C11-BODIPY591) stained sperm, indicating the occurrence of lipid peroxidation.

2.3.7. Measurement of nitrite concentration

The measurement of nitrogen reactive species concentration was performed by measuring the levels of nitrite (NO^{2-}) in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein. Nitrite is one of the two primary, stable, and non-volatile products of NO decomposition, and its measurement using spectrophotometry with the Griess reagent (Green et al., 1982) is a way to investigate nitric oxide formation. The Griess Reagent System is based on the chemical diazotization reaction that uses 2% (w/v) sulfanilamide and 0.2% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED) under acidic conditions (5% (v/v) phosphoric acid). The detection limit is nitrite of $2.5 \mu\text{M}$ (125 pmol) (in ultrapure, deionized distilled water). The absorbance of the samples was determined at 560 nm. Griess reagent was prepared at the time of analysis and kept protected from light throughout the experiment. In a 96-well microplate, 50 μL of thawed semen sample (37 °C, 30 sec) from each treatment and 50 μL of Griess reagent were added, and for the blank treatment, 50 μL of distilled water and 50 μL of Griess reagent were added in triplicate. The microplate was read in a spectrophotometer at 560 nm.

2.3.8. Measurement of hydrogen peroxide concentration

The measurement of hydrogen reactive species concentration (H_2O_2) was performed by measuring hydrogen peroxide (H_2O_2) levels in $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein using spectrophotometry. H_2O_2 concentration was measured by the method modified by FOX-2 (Nourooz-Zadeh et al., 1994). This technique is possible by the oxidation of ferrous ions (Fe^{2+}) to ferric ions (Fe^{3+}) under acidic conditions by lipid hydroperoxides. The indicator used is xylene orange, which reacts with Fe^{3+} ions producing a blue-purple chromophore with an extinction coefficient of $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, detected in the spectrophotometer reading at 560 nm. H_2O_2 concentration was determined in the samples according to the molar extinction coefficient of H_2O_2 . Therefore: $A_\lambda = \epsilon \lambda \cdot C$, where A_λ =absorbance at 560 nm; $\epsilon \lambda$ =molar extinction coefficient of the chromophore; C=concentration of hydroperoxides (mol/mL).

2.3.9. Measurement of Malondialdehyde Concentration

To determine the rate of lipid peroxidation of post-thawed sperm, another technique was used to measure the concentration of malondialdehyde (MDA), using thiobarbituric acid (TBA) based on the method described by Buege and Aust (1978). Malondialdehyde levels were measured after adding 250 μL of semen to 500 μL of TBA reagent (15% trichloroacetic acid, 0.25N hydrochloric acid, and 0.375% thiobarbituric acid) and 1% (v/v) BHT 50 mM, and this solution was boiled (100 °C) for 15 min. Subsequently, the samples were cooled on ice flakes and centrifuged (1,200 x g, 15 min). The supernatant was removed and measured in the

spectrophotometer with absorbance at 532 nm. TBARS quantification in the samples was performed using a standard curve of 1 to 20 nMol of MDA/ml. The results were expressed in nMol of TBARS/ml.

2.3.10. Measurement of Total Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)

The cellular level of ROS was evaluated using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) kit (ab113851, Abcam, Cambridge, England). The reactive oxygen species (ROS) assay kit uses the permeable DCFDA reagent (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), a fluorogenic dye that measures the activity of hydroxyl, peroxy, and other ROS within the cell. After diffusion into the cell, DCFDA is deacetylated by cellular esterases into a non-fluorescent compound, which is subsequently oxidized by ROS into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF is a highly fluorescent compound that can be detected by fluorescence spectroscopy. For analysis, samples containing 1.5×10^6 sperm were washed in PBS and incubated at 37 °C for 30 minutes with 1 mL of buffer solution containing 20 μ M DCFDA. Subsequently, the sperm samples were washed with 1 mL of 1X buffer solution and resuspended in 500 μ L of 1X supplemented buffer solution. Finally, 50 μ L of the sperm suspension from each treatment was plated in triplicate in wells of a dark-bottom microplate. Fluorescence intensity was detected using the Cytation 5 microplate reader (Biotek, Santa Clara, CA, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm. The intensity of their fluorescence was measured, the sperm with elevated ROS levels were stained green, while those with lower ROS levels exhibited reduced fluorescence. For the positive control, sperm were treated with 50 μ M tert-butyl hydroperoxide (tbHP) for 3 hours at 37 °C.

2.3.11. Sperm evaluation of chromatin protamination deficiency using Chromomycin A3

To assess sperm chromatin protamination, the fluorescent dye Chromomycin A3 (CMA3, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used (Simões et al., 2009). Thawed semen samples (37 °C, 30 secs.) were diluted to 2×10^6 sperm in 200 μ L of McIlvaine's buffer (17 mM citric acid, 164 mM Na_2HPO_4 , and 10mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; pH 7.0) and centrifuged (500 x g, 5 min). After discarding the supernatant, the sample was suspended in 200 μ L of Carnoy's solution (3 parts of methanol and 1 part of acetic acid) and kept at 4 °C for 5 minutes. After two washes with PBS, the samples were incubated for 60 min at room temperature with CMA3 staining solution (0.25 mg/mL of CMA3 in McIlvaine's buffer). Subsequently, the samples were washed and resuspended in 1mL PBS. Then, the samples were analyzed in a flow cytometer (FAC Scalibur 6 BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events at a rate of 500 cells per sec were

analyzed per sample. For the positive control, 2×10^6 sperm were fixed in 7.5 mL of chlorine-free Carnoy's solution (3: 1, methanol:acetic: acid), incubated for 10 min at room temperature, and centrifuged at 4°C (3.074 x g, 15 min). After discarding the supernatant, the sample was washed with 2 mL of PBS, and the pellet was resuspended with 0.6 mL PBS and 0.1% Triton and incubated (15 min, 37 °C). The permeabilized sample was centrifuged at 4°C (3.074 x g, 15 min), the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended and incubated in 0.6 mL of 1mM NaCl and 5mM dithiothreitol (DTT) for 1 hour at room temperature. The DTT-treated sample was centrifuged at 4 °C (3.074 x g, 15 min), the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 90 µL of PBS. The positive control was incubated for 60 min at room temperature with the CMA3 staining solution (0.25 mg/mL of CMA3 in McIlvaine's buffer). After 60 min, the sample was washed and resuspended in 1mL of PBS. Then, the sample was analyzed in a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.3.12. Sperm evaluation of chromatin condensation with Toluidine Blue

The sperm chromatin condensation was prepared with smears of thawed semen. The smears were fixed in a solution of ethanol and acetic acid (3:1) for one minute and then in 70% ethanol for 3 min. The smears were air-dried and hydrolyzed for 15 min in 4N hydrochloric acid. They were then washed in distilled water and air-dried at room temperature. A 10 µl drop of 0.025% toluidine blue in McIlvaine's buffer was added, covered with a coverslip, and left to stain for 3 min. After that 500 sperm per slide were evaluated under microscope (1000x) and classified as with compact chromatin (lightly stained head) or decondensed chromatin (dark blue or violet-stained head).

2.3.13. Number of equine sperm bound to bovine oviduct explants

Dissected oviducts from ovaries without a corpus luteum of cows slaughtered in an Abatoir were used. The isthmus region was pressed on a Petri dish containing TCM 199 culture medium + 10% FBS + 0.1 mg/ml streptomycin + 100 IU/ml penicillin. The oviduct cells were aspirated with a 30 mm x 0.8 mm needle attached to a 5 ml syringe and transferred to a 14 ml Falcon tube for sedimentation. This procedure was repeated three times to disaggregate the oviduct cells, and then they were transferred to drops with TCM 199 medium with Hepes, 10% FBS, 0.1 mg/ml streptomycin, and 100 IU/ml penicillin for reaggregation and explant formation for 24 hours of incubation at 38.5 °C with 5% CO₂. An aliquot of semen from each treatment with

1×10^6 sperm/ml was distributed in 80 μ l drops containing 25 explants/treatment/stallion, and the sperm-explant incubation was carried out for 30 min. Three washes were performed with TCM 199 medium to remove sperm not bound to the explants. The number of sperm bound to the perimeter of the explants was calculated using Image J software (Version 1.52a) after the explants were placed between a slide and a coverslip (Fig. 1).

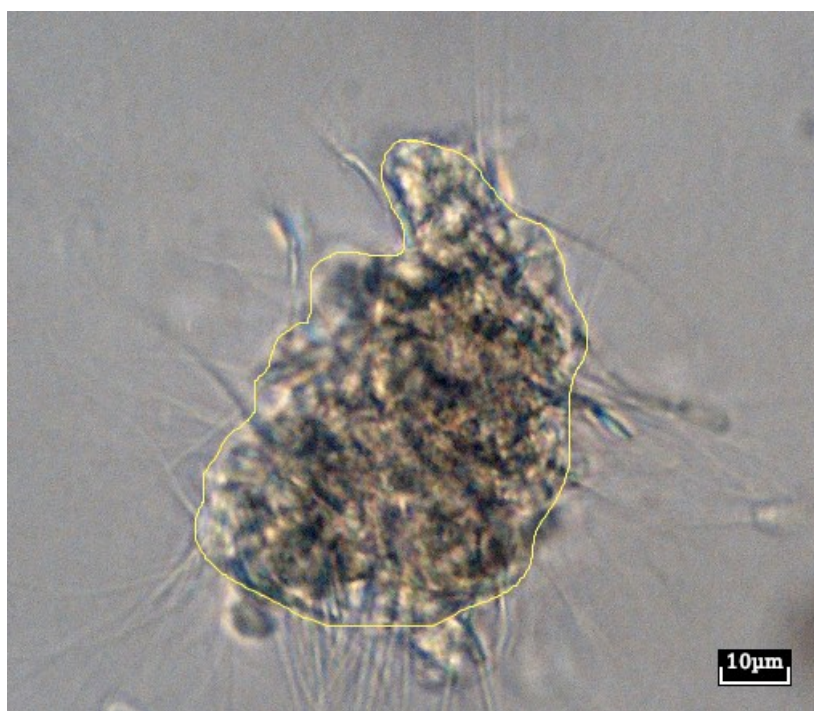


Figure 1: Microscopic image ($\times 40$) of equine sperm bound to a bovine oviduct cell explant after 30 min co-incubation.

2.3.14. Gene expression real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Gene Expression RT-qPCR was used to analyze the expression of genes related to apoptosis, such as B-cell lymphoma 2 (BCL2) and BCL2-associated X (BAX), mitochondrial ROS modulator 1 (ROMO1), sperm-associated antigen 3 (SPACA3), and oxidative damage repair DNA glycosylase 1 (OGG1).

Total RNA was extracted from post-thawed semen samples cryopreserved with varying niacin concentrations or without niacin (control) using the QIAamp Viral RNA Mini Kit, following the manufacturer's instructions. RNA quantification was performed with the NanoDrop Lite Plus (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and standardized to a concentration of 160 ng/reaction. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using the Oligo dT₁₈ Primer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) as per the manufacturer's protocol.

Transcript expression levels were evaluated by RT-qPCR using the qPCR Green Master Kit (Cellco Biotech, São Paulo, Brazil), with primers listed in Table 1. The qRT-PCR primer pairs for the OGG1, ROMO1, and SPACA3 genes were designed in this study using Primer-BLAST from NCBI, based on the reference sequences listed in Table 1. Gene expression was quantified relative to the internal β -actin gene using the equation $R=2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$.

Table 1. Primer sequence used for gene expression analysis of post-thaw equine sperm

Gene	Primer sequence (5'–3')	Product size (bp)	NCBI Accession Number (Reference)
β -actin	F: CCAGCACGATGAAGATCAAG	88	AF035774 (Pérez Rico et al., 2014)
	R: GTGGACAATGAGGCCAGAAT		
BAX	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	162	XM_001489207.1 (Leon et al., 2011)
	R: ATCCTCTGCAGCTCCATGTT		
BCL2	F: GAGACCCCCAGTGCCATCAA	146	XM_001499714.1 (Leon et al., 2011)
	R: GGGATGTCAGGTCGCTGAAT		
OGG1	F: AACAAACAACATTGCCCGCAT	100	XM_023620020 (This study)
	R: GGAAGCCATGGTAGGTGAC		
ROMO1	F: TTCAGTCCTCCGCTACGGG	98	XM_005604601.3 (This study)
	R: GTCTCACACAGAACGCAAGG		
SPACA3	F: AACACAGCTGCCGTGGAC	76	XM_023653031 (This study)
	R: ACCACTTCCGGCTGTTGA		

BAX, BCL2-associated X; BCL2, B-cell lymphoma 2; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ROMO1, Reactive Oxygen Species Modulator 1; SPACA3, Sperm Acrosome Associated 3.

2.3.15. Statistical Analysis

The experimental design used was randomized complete blocks, considering the stallion as the block. Statistical analysis of motility characteristics, measurement of oxidants, DNA integrity, plasma membrane integrity and functionality, sperm lipid peroxidation, and binding rate of equine sperm to bovine oviduct explants was performed through analysis of variance (ANOVA) and compared with Tukey's test. Comparison of gene expression was performed using independent samples t-test. Data were present as mean and standard error of the mean (SE) and analyzed using the R program, and a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

2.4. Machine Learning modeling

To carry out the parameter importance, a machine learning modeling have been successfully used for classification of Covid-19 patients by using measured parameters of corporeal fluids like blood serum (Lourenço et al., 2024) and semen (Furtado et al., 2024). In the present study, the methodology developed for the analysis of semen samples of Covid-19 patients (Furtado et al., 2024) was adapted to classify the equine semen samples treated with 0, 10 and 20 mM niacin and to carry out the sperm parameters importance. The methodology was developed to understand the niacin induced changes in the sperm and semen evaluated parameters (sperm motility characteristics, measurement of oxidants, DNA integrity, plasma membrane integrity and functionality, sperm lipid peroxidation and binding rate of equine sperm to bovine oviduct explants) and the differentiation among the treatments. These parameters were used for binary classification of the semen samples in two comparison scenarios: A (Treatment 0 vs. Treatment 10), and B (Treatment 0 vs. Treatment 20). After classification, SHapley Additive exPlanations (SHAP) analysis (Lundberg et al., 2017) of parameter importance was carried out.

Five different classification algorithms were trained to predict semen sample classification: Multilayer Perceptron (MLP) (Haykin, 1994), eXtreme Gradient Boosting (XGBoost) (Chen et al., 2016), K-Nearest Neighbors (KNN) (Fix et al., 1989), Logistic Regression (LR) (Cox, 1958), and Support Vector Machine (SVM) (Pedregosa et al., 2011). The classification algorithms were optimized by adopting the Optuna library (Akiba et al., 2019), using 200 trials to search for optimal parameters and hyperparameter values to enhance model performance.

The optimization was carried out by maximizing the Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve (AUC), following a 5-fold stratified cross-validation. The classification probability of each sample in the 5 test folds was determined during the cross-validation process. At the end of the cycles, AUC was calculated considering the classification probabilities of all samples.

After the optimization stage, the algorithms were trained and validated. In the validation stage, 30 cross-validation (CV) experiments with five folds each were conducted, generating scores for six different performance metrics: AUC, Accuracy (Acc), F1 score (F1), Matthews Correlation Coefficient (MCC), Specificity (Spe), and Sensitivity (Sen). In each of the 30 cross-validations, the samples were randomly distributed (with different random seeds) along the five folds. A mobile classification threshold was implemented from the ROC curves of the training database, using the closest to (0,1) criteria (Unal et al., 2017), to segregate both classes better. The average optimum classification threshold (Th) was used to calculate F1, MCC, Acc, Spe,

and Sen metrics. An outer loop in the validation stage was implemented to evaluate the variance of the performance metrics.

The SHAP method was used to understand the importance of different parameters in the classification process of the best performing (highest AUC) ML model. SHAP assign values to each parameter of each sample, creating a way to interpret ML models. It uses a game theoretic approach that measures the importance of each parameter to the ML model's output. In this sense, the SHAP values of all parameters of a specific sample and the base SHAP value of the model (considering all samples) sums to the classification probability assigned by the ML model to that sample.

3. Results

The mean values of the evaluated sperm motility from the stallions ranged from 70 % to 90% TM, 60 % to 80% PM and 3 to 4 sperm vigor (Table 2), which were within the desirable range for cryopreserved semen according to the Manual for Andrological Examination and Semen Evaluation of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). Sperm concentration ranged from 180×10^6 sperm/ml to 522×10^6 sperm/ml, and the total number of sperm in the ejaculate ranged from 5.2×10^9 to 18.7×10^9 . The percentage of morphologically normal sperm in the ejaculate varied from 75% to 85%.

The addition 10 mM niacin significantly increased the percentage of sperm TM compared to the control (Table 2, $P < 0.05$), while sperm PM and kinematic variables did not differ among treatments (Table 2, $P > 0.05$).

Table 2: Post-thaw sperm motility and kinematics parameters evaluated by the CASA system in different treatments with varying concentrations of niacin ($X \pm SE$).

Treat.	TM (%)	PM (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	WOB (%)	ALH (μm)
0	41.3 ± 10.6 5.0 ^b	± 10.7 1.4	± 10.7 1.2	$\pm 18.9 \pm$ 1.4	$13.4 \pm$ 1.2	$28.5 \pm$ 1.7	$9.0 \pm$ 0.7	$70.5 \pm$ 1.9	$46.8 \pm$ 2.6	$66.2 \pm$ 2.2	$2.2 \pm$ 0.1
10	$63.1 \pm$ 5.1 ^a	$15.6 \pm$ 1.5	$11.1 \pm$ 0.2	$20.1 \pm$ 1.4	$14.5 \pm$ 0.8	$29.5 \pm$ 1.8	$8.3 \pm$ 0.6	$71.4 \pm$ 1.1	$48.9 \pm$ 1.4	$68.1 \pm$ 1.1	$2.2 \pm$ 0.1

20	44.3±	11.3±	10.7±	16.4±	11.6±	25.6±	8.1±	69.9±	44.9±	63.8±	2.2±
	5.0 ^b	1.4	0.1	1.4	1.2	1.7	0.7	1.9	2.5	1.1	0.1

^{ab} Values with different superscripts between lines differ statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin; TM: total motility; PM: progressive motility; VAP: average path velocity; VSL: straight-line velocity; VCL: curvilinear velocity; BCF: beat cross frequency; STR: straightness; LIN: linearity; WOB: wobble index.

There was no statistical difference in the percentage of sperm with normal morphology and defects among the treatments (Table 3, $P > 0.05$).

Table 3: Percentage of normal sperm morphology and defects with addition of different niacin concentrations ($X \pm SE$).

Treat.	Normal	Bent tail	PCD	DCD	Head	Midpiece
0	76,6 ± 1,8	10,3 ± 1,8	3,6 ± 0,6	4,2± 0,4	2,2± 0,5	3,1± 0,4
10	77,2 ± 1,8	10,3± 1,7	3,7 ± 0,6	3,8± 0,4	2,4± 0,5	2,6± 0,4
20	75,9 ± 1,8	11,5± 1,8	4,0 ± 0,6	4,0± 0,3	2,1± 0,4	2,5± 0,4

Values did not differ statistically ($P > 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin, PCD: % proximal cytoplasmic droplet, DCD: % distal cytoplasmic droplet, Head: % Head defect, Midpiece: % midpiece defect.

The percentage of sperm with functional (HOST+) and intact plasma membrane (PMembrane), and spontaneous acrosomal reaction (AR) assessed by flow cytometry did not differ among treatments (Table 4, $P > 0.05$). The addition 10 mM niacin significantly increased the percentage of sperm with the highest mitochondrial membrane potential (Mitotracker +, Table 4, $P < 0.05$)

Table 4: Percentage of sperm with functional sperm membrane (HOST+), intact plasma membrane (intact PMembrane), spontaneous acrosomal reaction (AR) and sperm with the highest mitochondrial membrane potential (Mitotracker +), with the addition of different concentrations of niacin ($X \pm SE$).

Treatments	% HOST +	% intact PMembrane	% AR	% MitoTracker +
0	42.4 ± 3.2	29.7 ± 2.5	0.20 ± 0.1	14.9 ± 3.2 ^b
10	54.9 ± 3.5	34.9 ± 2.6	0.21 ± 0.1	24.8 ± 2.9 ^a
20	44.5 ± 3.6	29.3 ± 2.4	0.19 ± 0.1	17.6 ± 2.4 ^b

0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin. ^{ab} Different letters indicate statistical differences ($P < 0.05$).

Niacin addition did not influence the sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+), NO^{2-} , H_2O_2 , and malondialdehyde concentrations among treatments (Tab. 5, $P > 0.05$). However, the addition of 10 mM niacin significantly decreased the fluorescence intensity of total reactive oxygen species in post-thaw semen (Tab. 5, $P < 0.05$), which means that nicotinic acid decreased the total reactive oxygen species in the cryopreserved sperm.

Table 5: Sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY +), concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2 , $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein), nitrite (NO^{2-} , $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein), and malondialdehyde (nM/ml TBARS/mL), and fluorescence intensity (UA) of total reactive oxygen species (ROS) in post-thaw semen ($X \pm \text{SE}$).

Treat.	BODIPY+ (%)	H_2O_2 ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein)	NO^{2-}	Malondialdehyde (nM/ml TBARS/mL)	Total ROS (UA)
0	1.9 ± 0.2	26.5 ± 1.4	9.6 ± 0.8	7.9 ± 0.7	3735 ± 380 ^a
10	1.7 ± 0.2	23.4 ± 1.4	9.3 ± 0.9	5.8 ± 0.6	1700 ± 483 ^b
20	1.8 ± 0.2	24.6 ± 1.4	9.2 ± 0.8	6.7 ± 0.7	2927 ± 705 ^a

^{ab} Values with different superscripts between lines differed statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin

The sperm DNA integrity (DNA protamination and chromatin condensation) evaluated with Chromomycin A3 (CMA3) and Toluidine Blue with different concentrations of niacin did not differ among treatments (Tab.6, $P > 0.05$).

Table 6: Sperm percentage with DNA protamination deficiency (CMA3) and chromatin decondensation (Toluidine Blue) with the addition of different niacin concentrations ($X \pm \text{SE}$).

Treat.	Sperm DNA protamination deficiency	Sperm chromatin decondensation
0	$5.0 \pm 0.9 \%$	$3.04 \pm 0.09 \%$
10	$3.6 \pm 0.6 \%$	$2.04 \pm 0.08 \%$
20	$3.5 \pm 0.5 \%$	$3.03 \pm 0.09 \%$

Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin, there was no statistical difference between values across rows and columns ($P > 0.05$)

The addition of 10- and 20-mM niacin to semen freezing extender significantly increased the number of sperm bound bovine oviduct explants compared to the control. However, 10 mM niacin showed the highest number of sperm bound to oviduct explants (Fig. 2, $P < 0.05$).

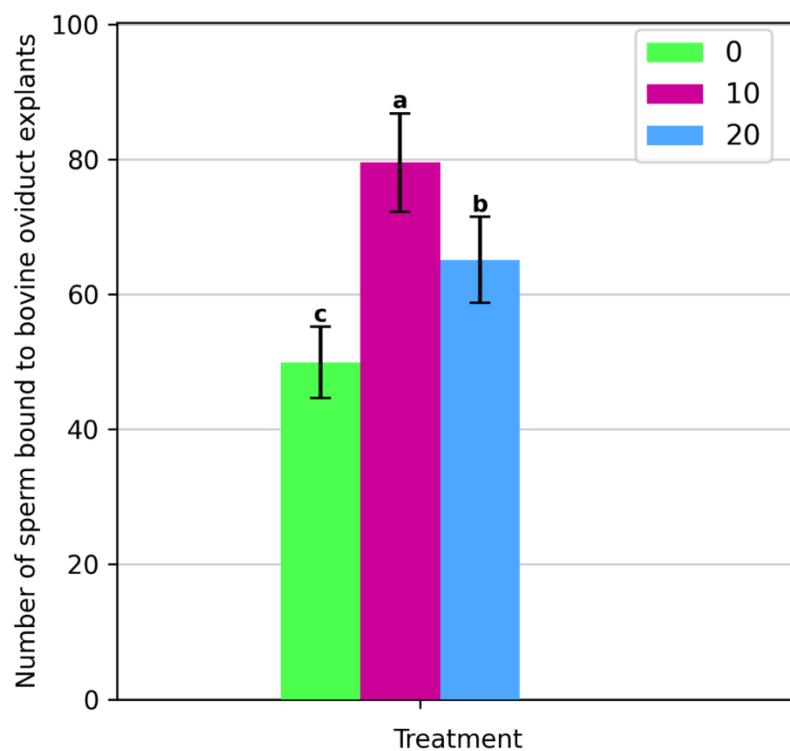


Figure 2: Number of sperm bound to oviduct explants with addition of different Niacin concentrations ($X \pm SE$). Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM Niacin.

^{abc} Different letters differ statistically ($P < 0.05$).

Sperm supplemented with 10 mM niacin showed a significantly increased expression level of BCL2 and reduced expression of BAX and ROMO1 gene compared to the control group ($P < 0.05$; Figure 3). On the other hand, the gene expression levels of OGG1 showed no statistical differences among treatments (Figure 3, $P > 0.05$). Additionally, the expression levels of SPACA3 in post-thaw sperm were significantly higher in semen samples supplemented with 10 and 20 mM of niacin compared to the control group ($P < 0.05$; Figure 3).

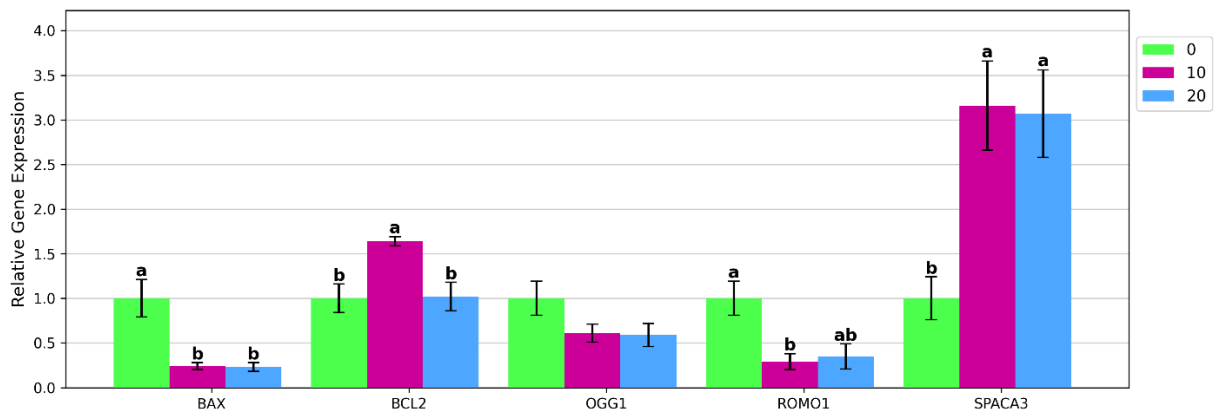


Figure 3: Expression of the genes BAX, BCL2-associated X; BCL2, B-cell lymphoma 2; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ROMO1, Reactive Oxygen Species Modulator 1; SPACA3, Sperm Acrosome Associated 3. ^{ab} Values with different letters between columns differ statistically ($P < 0.05$), Treat: treatments, 0 = INRA 96 (control), 10, 20 = 10, 20 mM niacin.

The performance metrics of five classification algorithms, machine learning (ML models), 1) Multilayer Perceptron (MLP), 2) eXtreme Gradient Boosting (XGBoost), 3) K-Nearest Neighbors (KNN), 4) Logistic Regression (LR), and 5) Support Vector Machine (SVM) was used to predict semen sample classification. The five classification algorithms are summarized in Table 7 for scenarios A (0 mM vs. 10 mM niacin) and B (0 mM vs. 20 mM niacin). These algorithms were optimized using the Optuna library with 200 trials to search for optimal parameters and hyperparameters to enhance model performance. Each five-classification algorithm was tested in the two scenarios with the average value of the performance metrics (accuracy, precision, recall, and AUC, Table 7).

Table 7: Performance metrics of the five ML models used to classify the samples in scenarios A and B ($X \pm SD$).

Comp.	Model	AUC	F1	MCC	Acc %	Spe %	sem %	Th %
A	KNN	0.96 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.85 ± 0.06	92 ± 3	95 ± 5	89 ± 6	52 ± 3
	LR	1.00 ± 0.00	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.04	99 ± 2	100 ± 0	98 ± 4	60 ± 11
	MLP	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.02	0.96 ± 0.05	98 ± 2	97 ± 5	99 ± 3	65 ± 12
	SVM	1.00 ± 0.00	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.03	99 ± 2	100 ± 0	99 ± 3	58 ± 12
	XGB	0.98 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.94 ± 0.04	94 ± 4	97 ± 6	92 ± 8	67 ± 6
B	KNN	0.96 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.85 ± 0.06	92 ± 3	95 ± 5	89 ± 6	52 ± 3
	LR	0.96 ± 0.02	0.91 ± 0.04	0.84 ± 0.07	91 ± 4	95 ± 8	88 ± 9	54 ± 20
	MLP	0.89 ± 0.06	0.85 ± 0.05	0.72 ± 0.09	85 ± 5	86 ± 14	85 ± 11	49 ± 45
	SVM	0.92 ± 0.04	0.87 ± 0.04	0.76 ± 0.09	87 ± 5	86 ± 13	88 ± 9	55 ± 10
	XGB	0.95 ± 0.05	0.91 ± 0.07	0.84 ± 0.12	92 ± 6	93 ± 7	90 ± 12	61 ± 10

KNM = K-Nearest Neighbors, LR = Logistic Regression, MPL= Multilayer Perceptron, SVM = Support Vector Machine, XGB =eXtreme Gradient Boosting), AUC = Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve (AUC), F1= F1 score, MCC = Matthews Correlation Coefficient, Acc = Accuracy, Spe = Specificity, Sen = Sensitivity, Th = threshold

All ML models exhibited excellent performance. The performance of the models applied to the data in scenario A is slightly better than that in scenario B. However, LR could be selected as the overall best model considering both comparisons.

The ROC curves and the classification probability distribution obtained from the LR model for comparisons A and B are shown in Figure 4. The solid lines over the histogram correspond to the probability density function calculated by kernel density estimation (KDE). To evaluate the performance of the classification algorithms, we used the ROC curve and AUC as key metrics. The ROC curve illustrates the model's ability to discriminate between the two classes, with higher AUC values indicating better classification performance. The histograms provide insights into the distribution of classification probabilities for each comparison, while the Kernel Density Estimation (KDE) solid lines represent the probability density for each group of samples.

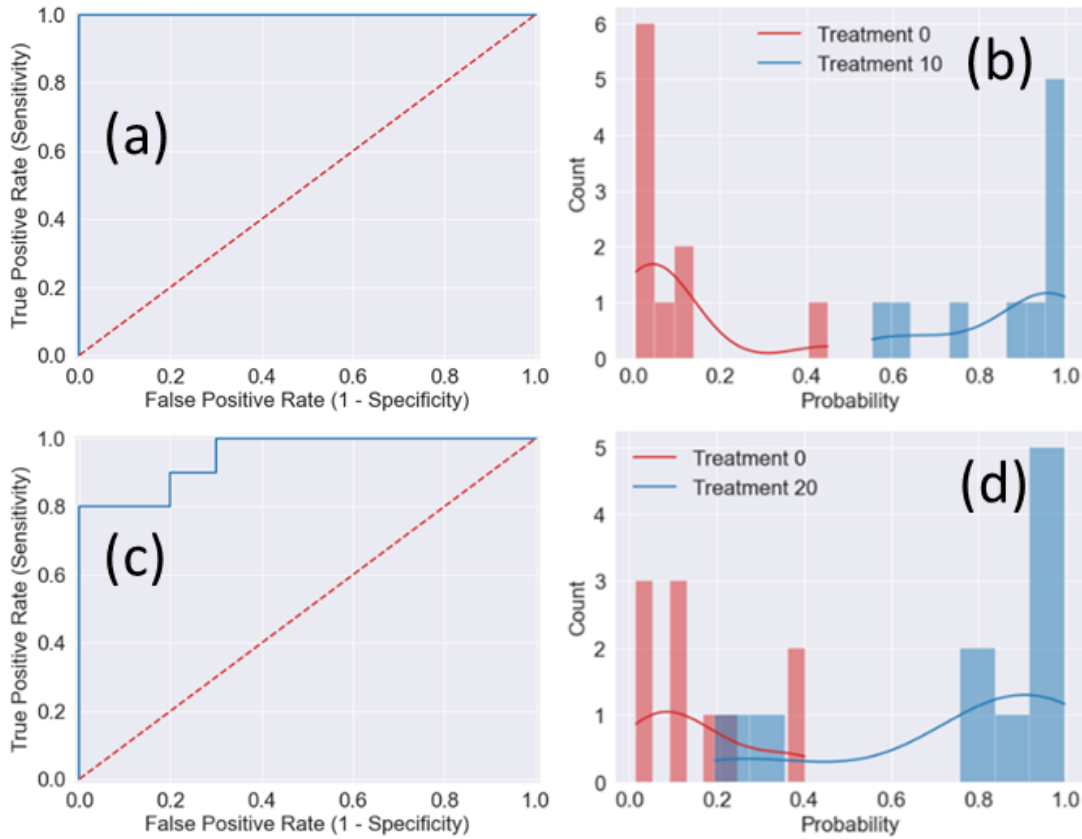


Figure 4: The ROC curve (solid blue line) for comparison scenarios A (a) and B (c) is shown, with the dashed red line representing the performance of a random classifier. The histograms (b and d) display the distribution of classification probabilities for the samples in scenarios A and B, respectively. The solid lines in the histograms represent the KDE (Kernel Density Estimation) probability density for each group of samples, providing a smooth estimate of the distribution of classification probabilities.

The SHAP method was applied to the LR model results for comparisons A and B to interpret the ML model and find the importance of the different parameters in the classification process. Figure 5 and Figure 6 show the summary plots for comparisons A and B. In these plots, each symbol represents the SHAP value of a particular parameter of each sample. The parameters are organized by order of importance, starting from the top of the Y-axes. Each open circle represents samples from treatment 0, and each triangle represents samples from treatments 10 and 20. The color bar at the right side of the plots is used to code the value of the parameters from low (blue) to high (red). The farther the triangles are from the circles, the greater the difference between the samples across treatments, indicating the greater importance of the studied parameter. The SHAP values quantify the contribution of each parameter to the model's predictions.

For scenario A, sperm bound to explants, factors related to preventing apoptosis (BAX and BCL2), and factors related to antioxidant activity (ROMO1, total ROS, Mitotracker, H₂O₂, Malondialdehyde) also presented significant values (Fig.5). These data indicated that niacin has a functional and protective (anti-apoptotic and anti-oxidative) effect on cryopreserved sperm.

In scenario B, the importance ranking of the parameters is very different. In this case, sperm bound to explants, BCF, ROMO1, and BAX were considered of great significance (Fig. 6). The other parameters were close to 0, indicating that adding 20 mM of niacin did not influence evaluated parameters.

SPACA3 stands out as the most important parameter in both scenarios as its SHAP value is higher compared to the other parameters (Fig 5 and 6). The increase in the SPACA3 value for both groups (10- and 20-mM niacin) suggests that adding niacin positively affects SPACA3 expression.

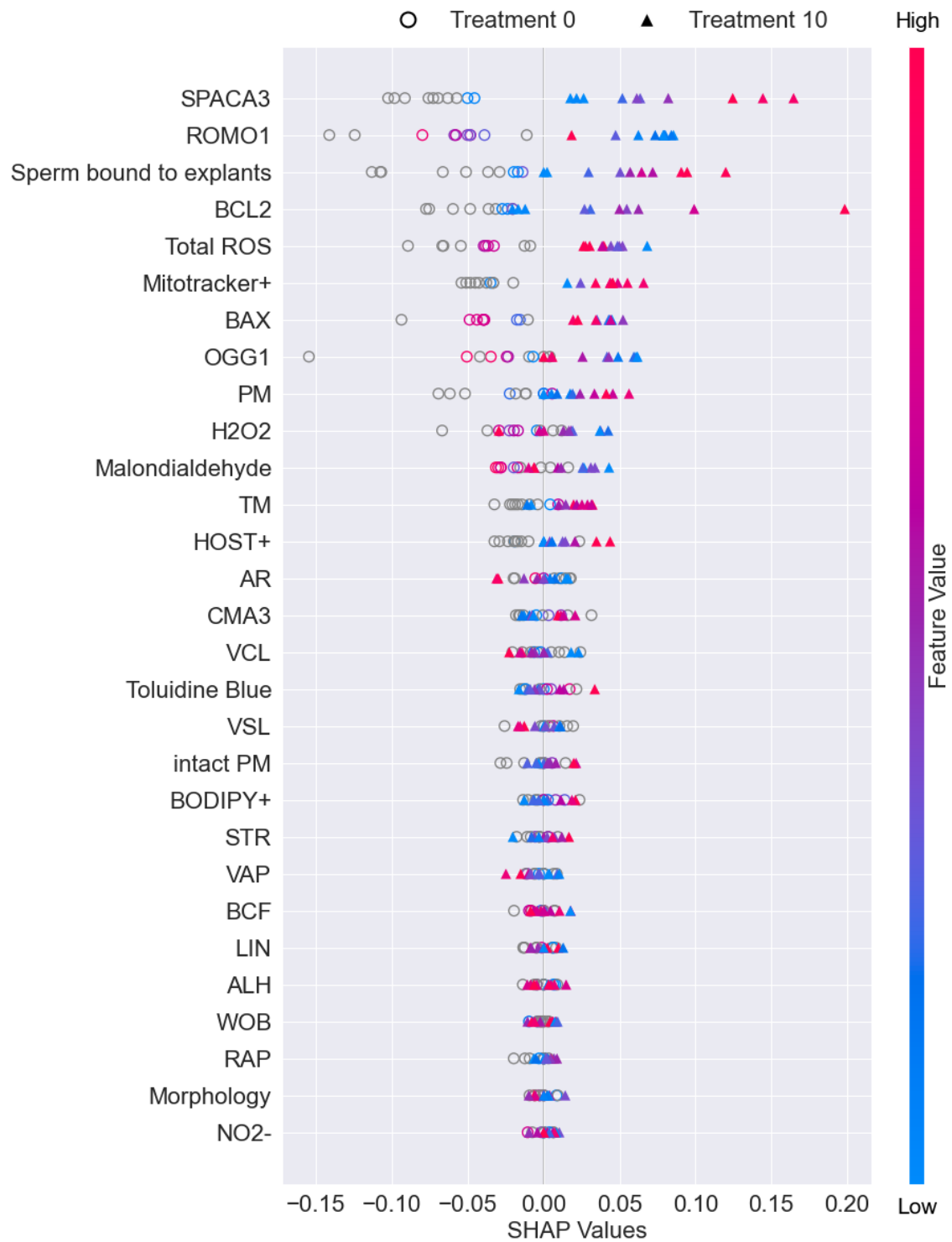


Figure 5: SHAP summary plots for comparison between control and addition of 10 mM of niacin (scenario A). The parameters SPACA3, sperm bound to explants, factors related to preventing apoptosis (BAX and BCL2) and factors related to antioxidant activity (ROMO1, total ROS, OGG1, Mitotracker+, H₂O₂, Malondialdehyde) were considered of great significance.

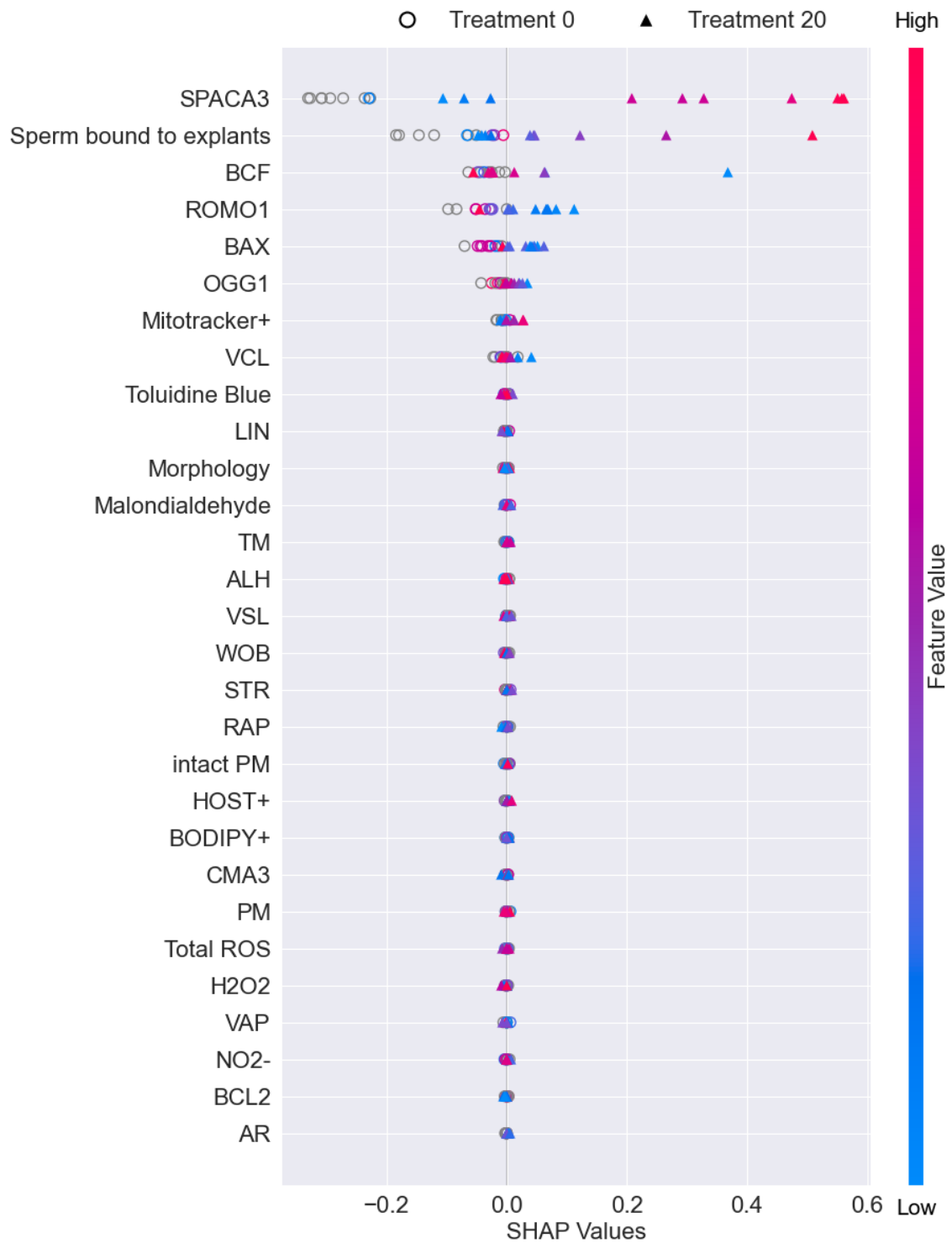


Figure 6: SHAP summary plots for comparison between control and addition of 20 mM of niacin (scenario B). The parameters SPACA 3, sperm bound to explants, BCF, ROMO1 and BAX were considered of great significance.

The importance found by SHAP is indeed related to the interpretability of the machine learning model. SHAP values help us understand how each parameter contributes to the model's predictions, making it easier to interpret the influence of each feature. However, the most important parameters are those that show a significant difference in value when compared to Treatment 0 (control). In other words, these parameters are the ones most affected by the addition of niacin.

To confirm this hypothesis, we plotted histograms of the values of all parameters for Treatment 0, 10, and 20 in Supplemental Figure 1. This allows us to visualize which parameters change the most in response to the different niacin treatments and verify their importance in relation to the control group.

The data illustrates a significant increase in the values of SPACA3, BCL2 gene expression and the number of sperm bound to explants with the addition of niacin, while the values of ROMO1 and BAX expression show a decrease. This hypothesis is further supported by the analysis of p-values from ANOVA, showing that 10 mM niacin enhances mitochondrial activity, increases the number of sperm bound to bovine oviduct cells, and boosts BCL2 gene expression, while decrease total ROS, ROMO1, and BAX expression. These data indicated an anti-apoptotic and anti-oxidative effect of niacin addition to cryopreserved sperm.

4. Discussion

In the present study, the addition of 10 mM niacin to the equine semen freezing extender showed that niacin had a positive effect on sperm metabolism. This was evident through increased sperm motility, enhanced mitochondrial activity, and upregulated BCL2 gene expression, indicating improved sperm viability and resistance to apoptosis (Leon et al., 2011). Furthermore, a reduction in total ROS, ROMO1, and BAX gene expression was observed, suggesting that niacin helps mitigate oxidative stress and reduces pro-apoptotic signaling, thus enhancing the survival and functionality of sperm post-thaw (Turrens, 2003). Additionally, 10- and 20-mM niacin concentrations led to increased SPACA3 gene expression and a higher number of sperm bound to bovine oviduct explants, which can indicate improved sperm-oviduct binding capacity (Leung et al., 2023). This is crucial for fertilization, as it suggests enhanced sperm ability to interact with the oviductal environment, potentially improving the chances of successful fertilization in vivo. Interestingly, the data analyzed by AI highlighted the functional, anti-apoptotic, and anti-oxidative effect of adding niacin to cryopreserved sperm cells.

For the first time, we examined the effects of niacin addition to stallion semen freezing extender on gene expression and the number of sperm bound to bovine oviduct explants. Since 10 mM niacin concentration increased the anti- apoptotic BCL2 and reduced the pro- apoptotic BAX gene levels, it suggested an anti- apoptotic action of niacin on cryopreserved equine sperm. Further, niacin reduced ROMO1 gene expression compared to the control, signifying greater mitochondrial protection and reduced ROS production during semen freezing. Since the ROMO1 gene plays a crucial role in generating mitochondrial reactive oxygen species (ROS, Shin et al., 2013), high endogenous ROS production in the mitochondrial respiratory chain can cause genetic damage and apoptosis (Turrens, 2003). By lowering ROMO1 expression, niacin likely helps to protect the mitochondria from excessive ROS generation preserving sperm quality post-thaw.

Moreover, the SPACA3 gene is associated with substrate binding sites for N-acetylglucosamine oligosaccharides present in the plasma membrane (Leung et al. 2023). Niacin supplementation to equine semen freezing extender seemed to preserve protein integrity such as SPACA3 during the freezing and thawing processes (Turrens, 2003). This enables sperm to retain their ability to bind effectively to the zona pellucida, thereby enhancing the chances of successful fertilization (Leung et al. 2023). The SPACA3 data was considered the most critical data that positively changed according to the AI analyses, independent of the dosage used.

Additionally, niacin supplementation increased the number of sperm bound to bovine oviduct explants. The process of freezing and thawing sperm increases ROS production, which negatively affects sperm viability, motility, mitochondrial activity, and fertilization capacity (Thomson et al., 2009). The sperm oviduct reservoir regulates sperm capacitation time, keeping them viable in the female reproductive tract and synchronizing their release during ovulation (Fazeli et al., 1999; Tienthai et al., 2004). In our study, adding niacin (10 e 20 mM) to cryopreserved sperm led to a significant increase in sperm binding to oviduct explants. This improvement could be due to niacin's effect on mitochondrial function, enhanced SPACA3 expression and decrease of reactive oxygen species (ROS) contributing to higher number of sperm bound oviduct explants. The number of sperm bound to oviduct explants was correlated positively with fertility rates, as observed by Leemans et al. (2014).

In sheep, the supplementation of 10 mM niacin to cooled semen has been shown to decrease reactive oxygen species (ROS) levels while simultaneously enhancing sperm motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial potential compared to the control group (Xiuyuan et al.,

2023). This indicates that niacin plays a significant role in improving the overall quality of sperm during storage, likely through its antioxidant properties. In boar, the addition of 5- and 10-mM niacin to semen freezing extender improved sperm viability, mitochondrial integrity and reduced lipid peroxidation of thawed sperm (Kim et al 2015). Similarly, the addition of 15- and 30-mM niacin to cooled semen of miniature pigs preserved acrosomal and mitochondrial integrity during cold storage (Lee et al, 2014). The 10 mM niacin concentration addition to human sperm freezing extenders significantly reduced sperm DNA fragmentation of frozen-thawed semen (Rarani et al, 2019). Thus, in agreement to our results, it seems that niacin (10 mM) has also antioxidant function to equine frozen sperm.

According to our AI data, the antioxidant effects were more prominent when adding 10 mM of niacin to the equine cryopreserved sperm. In a different study, 20 mM niacin decreased lipid peroxidation levels and reduced total reactive oxygen and nitrogen species in cryopreserved sperm (Bahrami et al., 2020). It should be mentioned that the sperm was previously cooled with a different semen extender than used in our investigation. Thus, it can be suggested that variances in semen handling, preservation protocols, and composition of the freezing extender might require different niacin supplementation.

For the supplementation of 10 mM of niacin, SHAP analysis identified SPACA3, ROMO1, the number of sperm bound to bovine oviduct cells, BCL2, BAX, mitochondrial activity, and total ROS production as the most critical factors for classification. These findings align with the ANOVA results, where adding 10 mM niacin improved mitochondrial activity, the number of sperm bound to bovine oviduct cells, and BCL2 gene expression while reducing total ROS, ROMO1, and BAX expression. This data confirms niacin's protective role in promoting metabolic activity, mitigating oxidative stress and apoptosis, and enhancing sperm viability and functionality post-thaw.

5. Conclusion

In conclusion, addition of 10 mM niacin to semen freezing extender enhanced equine sperm metabolism, exerted antioxidant effects, reduced apoptosis and increased the number of sperm bound to bovine oviduct explants, according to ANOVA analysis. Further, the SHAP analysis indicated greatest importance of the parameters sperm bound to bovine oviduct explants and SPACA3 gene expression. These findings suggest that 10 mM niacin might be an alternative to improve cryopreserved semen quality in equine artificial insemination programs.

6. References

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular [recurso eletrônico]. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Akiba T, Sano S, Yanase T, Ohta T, Koyama M. Optuna: A next-generation hyperparameter optimization framework. In Proceedings of the 25th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery & Data Mining (KDD '19). Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, 2019:2623–2631. DOI: 10.1145/3292500.3330701.

Amaral, P. H. R. ;Wnuk, N. T.; Camargos, V. N.; Andrade, L. M.; da Silva, M. I. N.; Teixeira, M. M.; Souza, D. da G.; Costa, V. V.; Lacerda, S. M. dos S. N.; Costa, G. M. J.; González, J.C. Machine learning ellipsometry as a sensitive diagnostic tool to study reproductive biology in Zika virus infected murine models. *Microchemical Journal*, v. 207, 111973, 2024.DOI: 10.1016/j.microc.2024.111973.

BAHRAMI, A.; DIVAR, M.R.; AZARI, M.; KAFI, M. Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 94, 2020

BUDNA-TUKAN, J.; SWIATLY-BLASZKIEWICZ, A.; CELICHOWSKI, P.; KALUZNA, S.; KONWERSKA A.; SUJKA-KORDOWSKA, P.; JANKOWSKI, M.; KULUS, M.; JESETA, M.; PIOTROWSKA-KEMPISTY H. “Biological Adhesion” is a Significantly Regulated Molecular Process during Long-Term Primary In Vitro Culture of Oviductal Epithelial Cells (Oecs): a transcriptomic and proteomic study. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 20, n. 14, p. 3387, 10 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20143387>.

Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-10, 1978. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.

Chen T, Guestrin C. Xgboost: A scalable tree boosting system. In: Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD

'16). Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, 2016:785-794. DOI: 10.1145/2939672.2939785.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. CBRA, 2013.

Cox DR. The regression analysis of binary sequences. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol 1958;20:215–232. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1958.tb00292.x.

COY, P.; CÁNOVAS, S.; MONDÉJAR, I.; SAAVEDRA, M.D.; ROMAR, R.; GRULLÓN, L.; MATÁS, C.; AVILÉS, M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. The National Academy of Sciences of the USA, USA, v. 105, n. 41, out./2008.

FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Sperm-oviduct interaction: Induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated sperm to oviductal epithelial cells in porcine species. Biology of Reproduction. 60:879-86, 1999.

Fix E, Hodges JL. Discriminatory analysis. Nonparametric discrimination: Consistency properties. International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique 1989;57: 238–247. DOI: 10.2307/1403797.

Furtado, M.H.; Farias, T.O.; Amaral, P.H.R.; Baliza, V.C.G.; Sepulveda, J.C.B.; De Paiva, V.H.S.; Da Silva, M.I.N.; Andrade, L.M.; Lacerda, S.M.S.N; Costa, G. M.J; González, J.C. Artificial Intelligence effectively classifies semen from COVID-19-Recovered and Controls patients using sperm parameters and spectroscopy data. Submitted, 2024.

GILMORE, A.; OBERHAUS, E.; RATHBUN, T.; GRADY, J.; BUIST, S.; KOUBA, J. Preliminary investigation of kisspeptin gene expression and concentration in stallion semen, Journal of Equine Veterinary Science, Volume 124, 2023.

GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. Rev Reprod, v. 2, p. 147–156, 1997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri – SP: Manole Ltda., 2004. p. 13-29.

HAYKIN S. Neural networks: a comprehensive foundation. 2nd ed. USA: Prentice Hall PTR, 1994.

HICKS, S.A.; ANDERSEN, J.M.; WITCZAK, O.; THAMBAWITA, V.; HALVORSEN, P.; HAMMER, H.L., HAUGEN, T.B.; RIEGLER, M.A. Machine Learning-Based Analysis of Sperm Videos and Participant Data for Male Fertility Prediction. *Sci Rep* 9, 16770, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53217-y>

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.; AGARWAL, A.; ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online* 2018.

ILKHANI, F.; HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A. Niacin and Oxidative Stress: A Mini-Review. *J Nutri Med Diet Care* 2:014, 2016.

JACOB, R. A. In: Present knowledge in nutrition; BOWMAN, B. A.; RUSSELL, R. M., eds.; International Life Sciences Institute: Washington, cap. 20, 2006.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proc. 21st Am. Ass. Eq. Pract*, p.327-349. 1975

KIM, Y.J.; LEE, S.H.; LEE, Y.J.; OH, H.I.; CHEONG, H.T.; YANG, B.K.; LEE, S.; PARK, C.K. Effect of nicotinic acid on sperm characteristic and oocyte development after in vitro fertilization using cryopreserved boar semen. *J Emb Trans*, v. 30, p. 7-15, 2015.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Androl.*, v. 32, n.3, p. 163-167, 2000.

LEE, Y. J.; LEE, S. H.; LEE, E.; LEE, S. T.; CHEONG, H. T.; YANG, B. K.; LEE, S.; PARK, C. K. Effect of nicotinic acid on fresh semen characteristics in miniature pigs. *J Emb Trans*, v. 29, p. 385e91, 2014.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; SOSTARIC, E.; NELIS, H.; STOUT, T. A.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biology of Reproduction*, v. 91, p. 1-13, 2014.

LEON, P.M.; CAMPOS, V.F.; KAEFER, C.; BEGNINI, K.R.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A.; SEIXAS, F.K.; DESCHAMPS, J.C.; COLLARES, T. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. *Zygote*, 21(3):279-85, 2011. doi: 10.1017/S0967199411000554.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int J Androl*, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.

Lourenço AA, Amaral PHR, Paim AAO, et al. Algorithms for predicting COVID outcome using ready-to-use laboratorial and clinical data. *Front Public Health* 2024;12:1347334. DOI: 10.3389/fpubh.2024.1347334.

Lundberg SM, Lee S. A unified approach to interpreting model predictions. In *Proceedings of the 31st International Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS'17)*. Curran Associates Inc., Red Hook, NY, USA, 2017:4768–4777.

MIES FILHO, A. Tecnologia do semen I – Exame e classificação. In: *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, v. 2. p. 423-458, 1975

MILLER, D. J. The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *Animal*,

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, v.220, p. 403-409, 1994.

OGATA, S.; TAKEUCHI, M.; TERADAIRA, S.; YAMAMOTO, N.; IWATA, K.; OKUMURA, K.; TAGUCHI, H. Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 66, p. 641e5, 2002.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZAŃSKI, W.; TWARDOŃ, J. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian sperm using C₍₁₁₎-

BODIPY_(581/591) *Theriogenology*. 75(9):1623–1629, 2011.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.002.

Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, et al. Scikit-learn: Machine learning in python. *J Mach Learn Res* 2011; 12:2825–2830. DOI: 10.48550/arXiv.1201.0490.

PÉREZ-RICO, A.; CRESPO, F.; SANMARTÍN, M.L.; DE SANTIAGO, A.; VEGA-PLA, J.L. Determining ACTB, ATP5B and RPL32 as optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of cryopreserved stallion semen, *Animal Reproduction Science*, 149: 3–4, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.007>.

PILLET, E.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci. Technol.* 88, 257–265, 2008. <https://doi.org/10.1051/dst:2008002>

POLLARD, C. L.; GIBB, Z.; SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G. NAD⁺, Sirtuins and PARPs: enhancing oocyte developmental competence. *Journal of Reproduction and Development*, v. 68, n. 6, p. 345-354, 2022.

RARANI, F.Z.; GOLSHAN-IRANPOUR, F.; DASHTI, G.R. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normol zoospermic men. *Cell Tissue Banking*, v. 20, p. 367-378, 2019.

ROCA, J.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. Dead sperm in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed sperm. *Fertil. Steril.*, v. 100, n. 3, p. 875-881, 2013.

SHIN, J. A.; CHUNG, J. S.; CHO, S. H.; KIM, H. J.; YOO, Y. D. ROMO1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 439, p. 315–320, 2013.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W.; MENDES, C.; MARQUES, M.; NICACIO, A.; DE BARROS, F.; ASSUMPÇÃO, M. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(3), 79–83, 2009. <https://doi.org/10.1080/10520290902843595>

THOMSON, L.K.; FLEMING, S.D.; AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; ZIESCHANG, J.A.; CLARK, A.M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 24, 2061–2070, 2009.

TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Animal Reproduction Science*. 80:131-46, 2004.

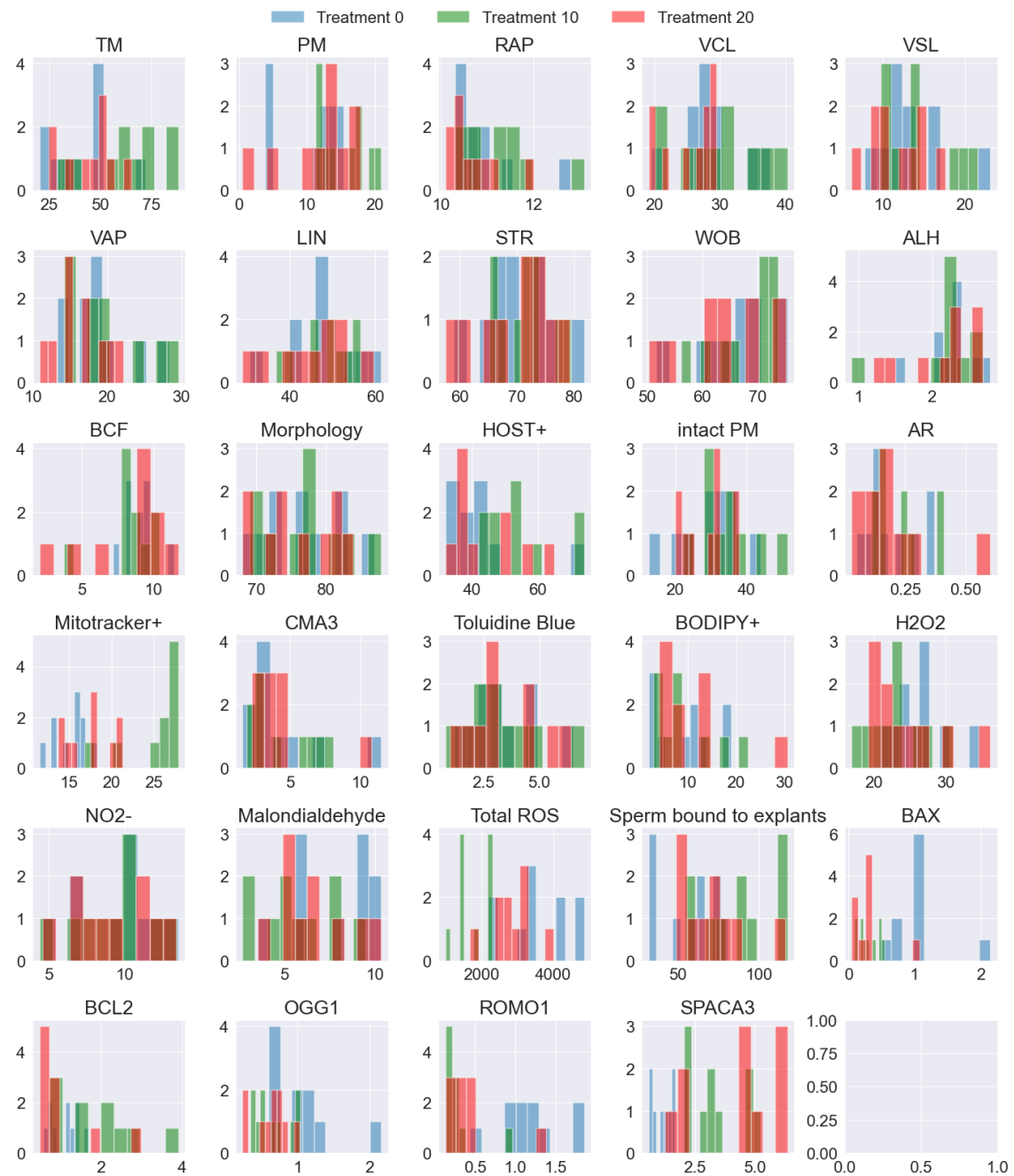
TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, v. 552, n. Pt 2, p. 335-344, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478. PMID: 14561818; PMCID: PMC2343396.

Unal I. Defining an Optimal Cut-Point Value in Roc Analysis: An Alternative Approach. *Comput Math Methods Med* 2017; 2017:3762651. DOI: 10.1155/2017/3762651.

Wnuk, N. T.; Figueiredo, A. F. A.; de Oliveira Farias, T.; Brener, M. R. G.; Lacerda, S. M. d. S. N.; Camargos, V. N.; Amaral, P. H.; Andrade, L. M.; Silva, M. I. N.; Lopes, R. A.; Szawka, R. E.; González, J. C.; Teixeira, M. M.; de Souza, D. d. G.; Costa, V. V.; Costa, G. M. J. (2024). Congenital Zika virus infection impacts on male mouse offspring's reproductive biology. *Reproduction*, 167(5), e230343, 2024. DOI:10.1530/REP-23-0343.

XIUYUAN, H.A.N.; LIANG, Z.H.A.O.; CHUANG, W.A.N.G.; MEIYU, Q.I.; YUCHANG, Y.A.O. Nicotinic Acid Enhances Low Temperature Preservation of Sheep Sperm by Reducing Oxidative Stress Levels. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*. 54(5): 1979-1989, 2023.

Supplemental Figure.



Supplemental Figure 1: Histograms for all the parameters of all samples in Treatment 0 (blue), Treatment 10 (green) and Treatment 20 (red).

1. ANEXO I – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 396/2017

Título do projeto: Avaliação in vivo da fertilidade do espermatozoide criopreservado de equinos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Monique de Albuquerque Lagares

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 18/06/2018. Validade: 18/06/2018 à 17/06/2023
Belo Horizonte, 18/06/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br