

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO

“Efeito *in vitro* e *in vivo* da adição de cafeína sobre as características do espermatozoide equino pós-descongelamento”

Natália de Castro Alves

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária da UFMG
2019**

NATÁLIA DE CASTRO ALVES

“Efeito *in vitro* e *in vivo* da adição de cafeína sobre as características do espermatozoide equino pós-descongelamento”

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal.
Orientadora: Prof^ª Monique de Albuquerque Lagares

**Belo Horizonte – MG
EV-UFMG
2019**

A474e Alves, Natália de Castro, 1993-
Efeito in vitro e in vivo de cafeína sobre as características do
espermatozoide equino pós -descongelamento/ Natália de Castro Alves. – 2019.
63 p.: il.

Orientadora: Monique de Albuquerque Lagares

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal
de Minas Gerais.

1. Equino - Criopreservação - Teses. 2. Sêmen congelado - Teses. 3. Metabolismo -
Teses - I. Lagares, Monique de Albuquerque - II. Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 619:636 048

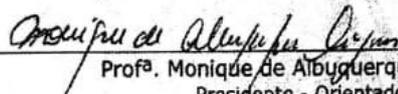
Bibliotecária responsável Cristiane Patricia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

FOLHA DE APROVAÇÃO

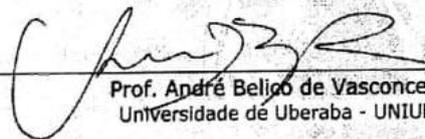
NATÁLIA DE CASTRO ALVES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL .

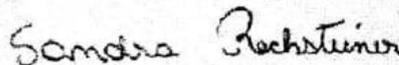
Aprovada em 12 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof.ª. Monique de Albuquerque Lagares
Presidente - Orientador



Prof. André Beligo de Vasconcelos
Universidade de Uberaba - UNIUBE



Prof.ª. Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner
Universidade Federal de Pelotas - UFPel



AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado, Felipe, 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, Marina, Ana Luiza, Rodrigo, Joilson, Ana Carolina, Bruno, Laís e Dara, do setor de reprodução pela ajuda e cumplicidade em todos os momentos de nossos árduos projetos.

À banca examinadora, Professor André Belico de Vasconcelos e Professora Sandra da Encarnação Fiala Rechsteiner pelas sugestões na dissertação.

Às professoras Soraia Araújo Diniz e Ângela Maria Quintão Lana da Escola de Veterinária pelo delineamento experimental, pelas sugestões e execução das análises estatísticas.

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.

Ao Prof. Marc R. J. M. Henry do DCCV/ EV/ UFMG pela disponibilidade do CASA e ensinamentos valiosos.

Ao Prof. Rogério Carvalho e Prof. Guilherme Vale pela disponibilidade dos animais da Fazenda Experimental da PUC Minas para fazerem parte deste experimento e ao Fabrício Rezende pela cooperação.

A todos os proprietários de ganhos e haras, aos médicos veterinários e colaboradores dos haras, em especial ao Haras Luxor, 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.

*“Você ganha força, coragem e confiança
através de cada experiência em que você
realmente para e encara o medo de frente”*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

A criopreservação do sêmen equino é um importante instrumento no melhoramento genético pela maximização do uso de bons reprodutores da espécie. No entanto, este processo reduz a motilidade e longevidade do espermatozoide. Portanto, substâncias ativadoras da motilidade espermática podem ser de suma importância para o sucesso da inseminação artificial com sêmen criopreservado equino. A cafeína é um estimulante da motilidade e capacitação espermática, as quais são características necessárias para a fecundação do oócito. Deste modo, sua adição previa a inseminação artificial com sêmen congelado-descongelado pode ser uma alternativa para aumentar a taxa de fertilidade do sêmen congelado equino. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade espermática *in vitro* e a fertilidade *in vivo* do sêmen congelado equino com a adição de diferentes concentrações de cafeína. Para isso, um ejaculado de 9 garanhões foi congelado com diluidor INRA82 e após o descongelamento às amostras foram adicionadas três diferentes concentrações de cafeína perfazendo quatro tratamentos: T1) controle INRA82 (sem adição de cafeína), T2) T1+3mM de cafeína, T3) T1+5mM de cafeína, e T4) T1+7,5mM de cafeína. A motilidade e cinética espermática foram avaliadas com um sistema de análise espermática computadorizada (CASA), a funcionalidade de membrana espermática com um teste hiposmótico e integridade e taxa de reação acrossômica espontânea com citometria de fluxo. As amostras foram avaliadas em quatro tempos: t0) imediatamente após o descongelamento do sêmen, t20) 20 minutos, t30) 30 minutos, t40) 40 minutos e t50) 50 minutos após o descongelamento do sêmen. Após o descongelamento do sêmen, as amostras foram submetidas ao método de seleção espermática *swim-up* para avaliação do número de espermatozoides recuperados e morfologicamente normais. Estes foram avaliados em quatro tempos: t20) 20 minutos, t40) 40 minutos, t60) 60 minutos e t80) 80 minutos após o *swim-up* e comparados com o sêmen pós-descongelamento (controle). As concentrações espermáticas de nitrito e peróxido de hidrogênio ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína) do controle e com 5mM de cafeína foram mensuradas com espectrofotometria. A taxa de fertilidade *in vivo* foi avaliada por meio de inseminação artificial (IA) de 8 éguas/tratamento, sendo testados o tratamento controle e com 5mM de cafeína. A adição de cafeína não diferiu em relação as taxas de espermatozoides com funcionalidade e integridade de membrana espermática, e taxa de reação acrossômica espontânea entre os grupos ($P>0,05$). Entretanto, na concentração de 5mM de cafeína houve aumento da motilidade total dos espermatozoides pós-descongelamento ($38,9\pm 2,8$), diminuição da concentração de nitrito ($11,4\pm 2,1$), e aumento da taxa de recuperação ($7,9\times 10^6/\text{ml}$), e de espermatozoides com morfologia normal ($79,9\pm 1,0$), após *swim-up* comparada ao controle ($32,6\pm 3,4$; $12,8\pm 2,9$; $3,4\times 10^6/\text{ml}\pm 0,7$; $70,0\pm 2,0$, respectivamente, $P<0,05$). A taxa de fertilidade das éguas inseminadas com a adição de 5mM de cafeína foi superior (62,5%) à do grupo controle (12,5%, $P<0,05$). Em conclusão, a concentração de 5mM de cafeína adicionada ao sêmen equino pós descongelamento exerceu efeito antioxidante e ativador da motilidade espermática equina. Provavelmente, estes foram os responsáveis pelo aumento da taxa de fertilidade das éguas inseminadas com adição de cafeína comparadas ao grupo controle. Portanto, a adição de 5mM de cafeína ao sêmen congelado e descongelado aumentou a taxa de fertilidade equina, podendo ser uma alternativa para o uso na IA de éguas com sêmen de garanhões de baixa qualidade seminal pós-descongelamento.

Palavras-chave: garanhão- metabolismo- criopreservação- congelamento.

ABSTRACT

The cryopreservation of equine semen is a crucial tool in genetic improvement by maximizing the use of sires with high genetic merit. However, the cryopreservation process reduces sperm motility and longevity. Thus, sperm motility activating substances may play an important role for the success of equine artificial insemination (AI) with frozen semen. Caffeine is a stimulant of sperm motility and capacitation, which are important attributes to oocyte fertilization. Consequently, the addition of caffeine prior to the AI with frozen-thawed semen can be an alternative to increase the fertility rate of frozen equine semen. The aim of the present work was to evaluate the *in vitro* sperm quality and *in vivo* fertility of frozen-thawed equine semen after addition of different caffeine concentrations. Thus, one ejaculate of 9 stallions (n=9) was frozen with INRA82 frozen extender and after thawing three different concentrations of caffeine were added to the samples performing four treatments: T1) control INRA82 (no caffeine addition), T2) T1+3mM caffeine, T3) T1+5mM caffeine, and T4) T1+7.5mM caffeine. The sperm kinetics and motility were evaluated with a computer assisted sperm analysis (CASA), sperm membrane functionality with a hypoosmotic swelling test, and sperm integrity and spontaneous acrosome reaction rate with flow cytometry. The samples were evaluated in four periods: t0) immediately after thawing, t20) 20 min, t30) 30 min, t40) 40 min, and t50) 50 min after semen thawing. The post-thawed samples were subjected to the *swim-up* sperm selection method and the number of recovered and morphologically normal sperm were recorded. Such samples were evaluated at four period: t20) 20 min, t40) 40 min, t60) 60 min and t80) 80 min after *swim-up* and compared to the post-thawing sperm (control). Nitrite and hydrogen peroxide concentrations (μM / μg protein) from the control and treatment with 5mM caffeine addition were measured with spectrophotometry. The *in vivo* fertility rate was assessed with artificial insemination (AI) of 8 mares/ treatments, control and 5mM caffeine. There was no difference between the rate of sperm with functional and intact membrane, and spontaneous acrosome reaction between the control and 5mM caffeine group ($P>0,05$). However, the concentration of 5mM of caffeine induced an increase of the total sperm motility (38.9 ± 2.8), reduced the nitrite concentration (11.4 ± 2.1), and also increased the sperm recovery rate ($7.9\times 10^6/\text{ml}$) and sperm with normal morphology (79.9 ± 1.0) after swim-up compared to control (32.6 ± 3.4 ; 12.8 ± 2.9 ; $3.4\times 10^6/\text{ml}\pm 0.7$; 70.0 ± 2.0 , $P<0.05$), respectively. Moreover, the AI rate of the 5mM caffeine group was significantly higher (62.5%) than the control group (12.5%, $P<0.05$). In conclusion, 5mM of caffeine play a significant role as antioxidant and motility activator of post-thawed equine sperm. Possibly, these factors were responsible for the higher fertility rate of the inseminated mares with thawed semen with 5mM caffeine compared to the control. Thus, the addition of 5mM of caffeine to the frozen-thawed stallion sperm increased the equine fertility rate, so that it may be an alternative to the use in the mares AI with stallion semen with low post-thawed quality.

Keywords: stallion- metabolism- cryopreservation- freezing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do espermatozoide equino.....	15
Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização da motilidade associada ao AMPc	17
Figura 3. Representação esquemática das mudanças físicas do espermatozoide equino durante o congelamento.....	20
Figura 4. Representação das causas e consequências do estresse oxidativo na célula espermática	24
Figura 5. Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).....	26
Figura 6. Mecanismo de ação da cafeína para aumento da concentração de AMPc na membrana plasmática.....	26
Figura 7. Número de espermatozoides pós-descongelamento e recuperados com adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	40
Figura 8. Porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	41
Figura 9. Porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática com <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	41
Figura 10. Porcentagem de espermatozoides com defeito de peça intermediária pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	42
Figura 11. Porcentagem de espermatozoides com defeito de cabeça pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	43
Figura 12. Porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática proximal pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	43
Figura 13. Porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática distal pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de <i>swim-up</i> após 20 a 80 min de incubação.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características espermáticas de avaliação do sêmen fresco (n=9).....	36
Tabela 2: Percentual de espermatozoides com motilidade total avaliado pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).....	36
Tabela 3: Percentual de espermatozoides com motilidade progressiva avaliado pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).....	37
Tabela 4: Parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) pós-descongelamento (média± erro padrão)	37
Tabela 5. Percentual de espermatozoides com membrana espermática funcional (teste hiposmótico, HOST+) após a adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).....	38
Tabela 6. Percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegras (PI-) com citometria de fluxo após a adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).....	38
Tabela 7. Percentual de espermatozoides com reação acrossômica com citometria de fluxo após a adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).....	39
Tabela 8. Concentração pos- descongelamento de Peróxido de Hidrogênio e Nitrito ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína) e após a adição de 5mM de cafeína (média±erro padrão).....	39
Tabela 9. Taxa de fertilidade de éguas inseminadas (n=16) com semen congelado e descongelado (I82) e após adição de 5mM de cafeína	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. A célula espermática	14
3.2. Metabolismo espermático.....	16
3.3. Princípios da criopreservação do sêmen	19
3.4. Processo de criopreservação do sêmen.....	21
3.5. Estresse oxidativo.....	23
3.6. Cafeína.....	25
3.7. Métodos de avaliação espermática <i>in vitro</i>.....	27
3.8. Fertilidade <i>in vivo</i> do sêmen congelado.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Coleta e avaliação do sêmen.....	31
Congelamento do sêmen.....	31
Experimento 1: Avaliação <i>in vitro</i> da qualidade espermática com adição de diferentes concentrações de cafeína pós-descongelamento	
Avaliação espermática pós-descongelamento.....	32
<i>Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA).....</i>	<i>32</i>
<i>Avaliação da funcionalidade espermática.....</i>	<i>32</i>
<i>Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrosômica.....</i>	<i>33</i>
<i>Mensuração da concentração de espécies reativas ao oxigênio.....</i>	<i>33</i>
Experimento 2: Efeito da adição de diferentes concentrações de cafeína sobre a seleção espermática com a técnica de <i>swim-up</i>	
<i>Seleção espermática com a técnica de swim-up.....</i>	<i>34</i>
Experimento 3: Avaliação da taxa de fertilidade <i>in vivo</i> do sêmen congelado-descongelado com adição de cafeína	

<i>Taxa de fertilidade in vivo</i>	34
Análises estatísticas.....	35
5. RESULTADOS	35
Experimento 1: Avaliação <i>in vitro</i> da qualidade espermática com adição de diferentes concentrações de cafeína pós-descongelamento	35
Experimento 2: Efeito da adição de diferentes concentrações de cafeína sobre a seleção espermática com a técnica de <i>swim-up</i>	39
Experimento 3 : Avaliação da taxa de fertilidade <i>in vivo</i> do sêmen congelado-descongelado com adição de cafeína	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. ANEXOS	60
9.1. Anexo 1	60
9.2. Anexo 2	61
9.3. Anexo 3	62
9.4. Anexo 4	63

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, o número de cavalos no Brasil está entre 4.541.833 e 5.312.076, reforçando a importância dos equídeos no agronegócio nacional (MAPA, 2016). Minas Gerais continua sendo o principal estado criador de equinos, seguido por Rio Grande do Sul, Bahia, Goiás e São Paulo (MAPA, 2016).

Segundo Sullivan *et al.* (1975) e Voss (1993) 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 (Brandão, 2008).

A criopreservação de gametas sempre foi vista com especial atenção pelo seu potencial na preservação, disseminação e melhoramento do material genético animal. Na espécie equina, o processo de criopreservação do sêmen permite o armazenamento das células espermáticas por um longo período de tempo 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 (Brandão, 2008). No entanto, o processo de criopreservação do sêmen provoca diversos danos aos espermatozoides devido as mudanças de temperatura e danos oxidativos (Tash e Mann, 1973), os quais comprometem a viabilidade, a motilidade, a longevidade e funções fisiológicas mais complexas da célula. (Roca *et al.*, 2013). Alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em membranas espermáticas e sistema de defesa antioxidante limitado (como: glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase) tornam o sêmen mais suscetível a danos por estresse oxidativo, especialmente durante o descongelamento (Asadi *et al.*, 2017). Portanto, substâncias antioxidantes e ativadoras do metabolismo celular podem ser importantes para o sucesso do uso do sêmen criopreservado equino.

A adição de substâncias como a cafeína ao sêmen pode induzir ao aumento da motilidade e a capacitação espermática, necessários para a fecundação do oócito (Maia e Bicudo, 2009). A cafeína é uma substância bioativa identificada como 1,3,7-trimetilxantina com propriedades antioxidantes (Yashin *et al.*, 2013, Pariz e Hallak 2016), e pode ser encontrada em diversos itens alimentares como café, semente de cacau e chá verde (Iarc, 1991). Seu mecanismo de ativação da motilidade espermática ocorre via inibição da fosfodiesterase. A fosfodiesterase converte a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) a sua forma acíclica AMP, responsável por ativar a proteína quinase (Hou *et al.*, 2002). Dessa forma, a cafeína aumenta a meia vida do AMPc, necessário para desencadear o processo de motilidade, capacitação, e reação acrossômica do espermatozoide (Nascimento, 2003), e penetração do espermatozoide no oócito (Domínguez *et al.* 2003, Martinez *et al.*, 2009). Além disso, a adição de cafeína ao sêmen durante o processo de congelamento-descongelamento diminuiu o destacamento acrossômico e aumentou a atividade mitocondrial espermática (Li *et al.*, 2010). O congelamento do sêmen induz a um processo chamado de criocapacitação espermática. Este, por meio da indução de alterações semelhantes a

capacitação espermática, reduz a meia vida do espermatozoide pós- descongelamento (Gadella *et al.*, 2001).

A adição de cafeína também é capaz de proteger os espermatozoides de danos nas membranas e fragmentação do DNA mediante a eliminação de oxidantes durante o descongelamento do sêmen humano (Esterbauer e Cheeseman, 1990). As propriedades antioxidantes da cafeína foram comprovadas em alguns estudos com camundongos nos quais a cafeína atuou como antioxidante em células do fígado, rim, pulmão, cérebro, e eritrócitos (Kamat e Devasagayam, 2000, Jasiewicz *et al.*, 2016, Ullah *et al.*, 2015).

Visto que a espécie equina apresenta índice variável de fertilidade com a inseminação artificial principalmente com sêmen criopreservado, a utilização de estratégias para maximização da capacidade fecundante do espermatozoide equino pós-descongelamento é de grande importância para o sucesso da reprodução. Assim a adição de antioxidantes e potenciadores da motilidade espermática a diluidores de sêmen pode ser uma alternativa para aumentar a fertilidade do espermatozoide congelado-descongelado.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o efeito *in vitro* da adição diferentes concentrações de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento sobre a qualidade espermática.
- Avaliar a taxa de recuperação e de espermatozoides morfológicamente normais após a realização do método de seleção espermática *swim-up* e adição de diferentes concentrações de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento.
- Avaliar a taxa de fertilidade *in vivo* do sêmen equino pós-descongelamento com adição de cafeína.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A célula espermática

O espermatozoide equino é uma célula altamente especializada que se divide em cabeça, colo e cauda (Meyers, 2009, Amann e Pickett, 1987, Fig. 1). A cabeça é achatada e consiste de acrossoma e núcleo revestidos pela membrana plasmática. O acrossoma é 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 (Pesch e Bergmann, 2006). Para serem liberadas, um complexo mecanismo deve ocorrer, denominado reação acrossômica, no qual a membrana acrossômica externa se une à membrana plasmática gerando a liberação do conteúdo da vesícula acrossômica (Fawcett, 1970). O núcleo do espermatozoide possui 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 (Rovan, 2001).

O colo é um pequeno segmento entre a cabeça do espermatozoide e o flagelo composto por colunas segmentadas e uma estrutura fibrosa densa, o capítulo (Pesch e Bergmann, 2006). A cauda é a parte mais longa do espermatozoide (55 μ m) 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. O axonema consiste em um par central de microtúbulos circundado por nove pares de microtúbulos periféricos. 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).

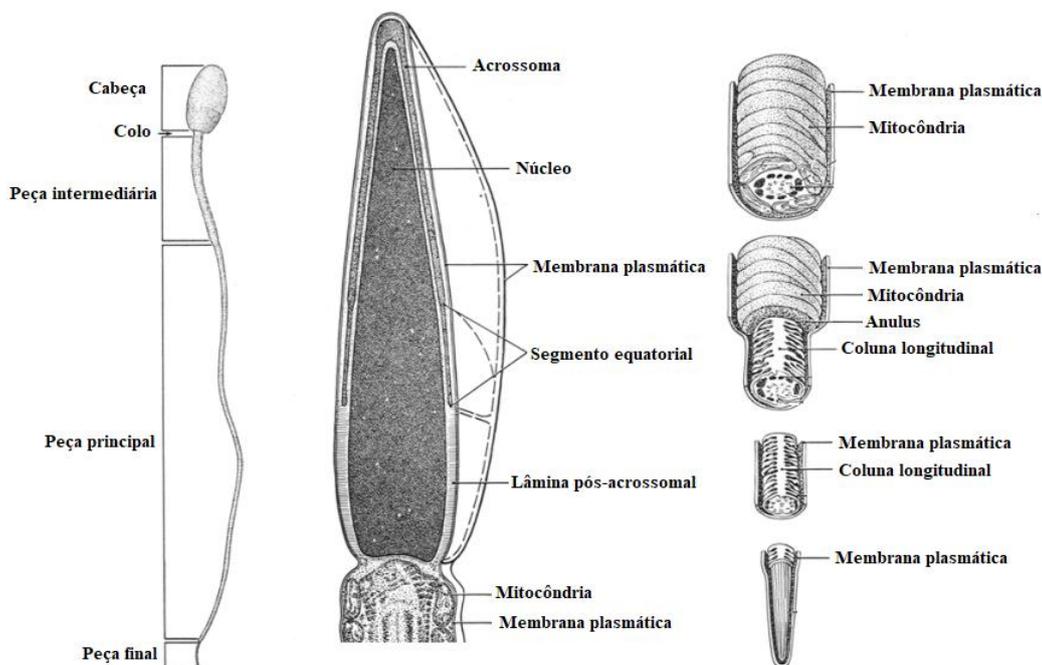


Figura 1: Morfologia do espermatozoide equino (Amann e Pickett, 1987).

Estruturas membranosas fazem parte da constituição do espermatozoide, tais como a membrana plasmática, acrossômica externa e interna, nuclear e a membrana mitocondrial. A estrutura básica das membranas é um mosaico fluido, constituído por dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteína (Vos *et al.*, 1993). Os lipídios das membranas são em sua maioria fosfolipídios, glicolipídios e colesterol. A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide (Amann e Graham, 1992; Alberts *et al.*, 2004), sendo que no equino sua composição lipídica é de aproximadamente 57% de fosfolipídios, 37% de colesterol e 6% de glicolipídios. Os fosfolipídios são divididos em fosfoglicerolipídios e esfingomielina (Gadella *et al.*, 2001). Os

ácidos graxos predominantes no espermatozoide equino são o docosapentanóico (C22:5 n-6), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), diferindo dos de outras espécies quanto a alta incidência de ácidos graxos 22:5 entre seus fosfolipídios em relação aos ácidos graxos docosaheptaenóico (22:6 n-3) (Gadella *et al.*, 2001). Garanhões que possuem ejaculados mais resistentes à criopreservação possuem predominância de C22:5 n-6, enquanto os garanhões com ejaculado de menor resistência a congelabilidade possuem mais C18:0 e C16:0 e menos C22:5 n-6. Esse efeito provavelmente se deve a menor sensibilidade a peroxidação lipídica e melhor funcionalidade da membrana? nos ejaculados resistentes (Pesch e Berhmann, 2006).

As proteínas se misturam aos lipídios nesta estrutura e desempenham a maioria das funções específicas da mesma. São classificadas em proteínas integrais e periféricas (Amann e Pickett, 1987). As proteínas integrais atuam como poros ou canais que atravessam as membranas, receptores ou partículas intramembranas. Já as proteínas periféricas aderem a pontos específicos da membrana através de forças eletrostáticas, sendo por isso facilmente removíveis.

A proporção entre colesterol e fosfolipídios com cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, bem como a natureza dos fosfolipídios 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 Pickett, 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 (Graham, 1996). 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).

3.2. 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. 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, conseqüentemente, 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, Fig. 2). 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)

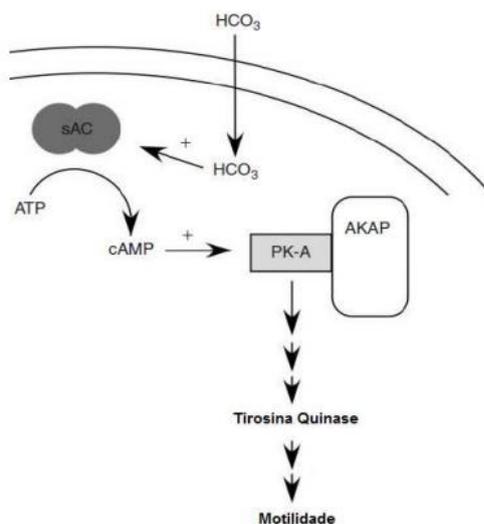


Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização da motilidade associada ao AMPc (sAC – Adenilato ciclase solúvel; AKAP - Proteína ancoradora de proteína quinase A) Fonte: Adaptado de Turner (2006)

Durante o processo de capacitação, a MP passa por reorganizações visando adquirir habilidade para fertilização. As maiores modificações envolvem alterações nos componentes da membrana que podem ser modificados ou removidos por secreções do trato genital feminino, provocando a desestabilização da bicamada lipídica. (Gadella *et al.*, 2001). O processo de capacitação pode ser dividido em duas cascatas de eventos: a rápida e a lenta. Os eventos rápidos incluem a ativação do movimento assimétrico e vigoroso do flagelo assim que o espermatozoide deixa o

epidídimo. Já os lentos caracterizam-se pela mudança nos padrões de movimento flagelar denominado hiperativação. O início dos eventos lentos da capacitação é marcado pela remoção de colesterol das membranas com conseqüente aumento da fluidez da mesma (Ickowicz *et al.*, 2012).

No trato genital feminino, a camada glicoproteica é removida ou modificada (Gadella *et al.*, 2001) para alterar o fluxo iônico transmembrana, expor sítios de receptores da membrana plasmática e remover componentes que cobrem a cauda, os quais restringem a hiperativação do espermatozoide. Outras proteínas do plasma seminal atuam na remoção de substâncias da membrana, como o colesterol. As proteínas do plasma seminal bovino (BSP) foram associadas ao processo de capacitação através da ação direta na retirada de colesterol da membrana (Manjunath e Thérien, 2002). Na espécie equina também foram encontradas proteínas (HSP-1 e HSP2) com grande homologia com as BSP (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005).

A retirada de colesterol favorece a saída de fosfolipídios no início da capacitação, o que é reforçado por ação conjunta de lipoproteínas de alta densidade (HDL), presentes na tuba uterina (Manjunath e Thérien, 2002). A desestabilização da membrana provocada pela remoção do colesterol promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Amann e Graham, 1992; Gadella *et al.*, 2001; Gadella e Colenbrander, 2003). No entanto, a indução da capacitação espermática pode ser induzida *in vitro*, durante o processo de criopreservação, levando a redução da viabilidade e longevidade espermática (Gadella *et al.*, 2001). A saída prematura do colesterol da MP durante a criopreservação do espermatozoide equino pode ser reduzida por meio da adição do complexo ciclodextrina-colesterol (CDC) durante o processo de congelamento de sêmen equino (Oliveira *et al.*, 2010). Este complexo induz a inserção de colesterol na MP levando a um aumento do percentual de espermatozoide com MP íntegra. Por outro lado, foi observada redução *in vitro* da taxa de reação acrossômica induzida. Fisiologicamente, o aumento da fluidez é essencial para que ocorram diversos eventos importantes da capacitação, inclusive a reação acrossômica e a fusão espermatozoide-oócito (Thomas *et al.*, 2006).

As albuminas presentes no ambiente uterino causam a saída de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, provocando o transporte ativo de íons cálcio (Ca^{2+}), bicarbonato e peróxido de hidrogênio, para o meio intracelular, resultando na ativação da adenilato ciclase para produzir AMPc (Gadella *et al.*, 2001). O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), responsável pela fosforilação dos resíduos de serina e posteriormente dos resíduos de tirosina das proteínas de membrana da cabeça e da cauda do espermatozoide (Breitbart e Naor, 1999; Breitbart, 2003). A fosforilação da tirosina é um marcador de capacitação espermática.

Uma vez capacitado, o espermatozoide demonstra um padrão vigoroso de movimentação denominado hiperativação. A hiperativação espermática refere-se a uma mudança no padrão de motilidade dos espermatozoides, com batimentos flagelares assimétricos e de alta amplitude, que inclui um aumento na velocidade curvilínea (VCL) e amplitude lateral da cabeça (ALH), e uma redução da velocidade progressiva e linearidade. Estas alterações induzem a um padrão de motilidade circular que ajuda os espermatozoides a se soltarem do epitélio tubário, migrarem através do lúmen da tuba uterina e penetrarem na zona pelúcida (Ortgies *et al.*, 2011). A hiperativação não ocorre normalmente no sêmen sob circunstâncias normais, sendo que menos de 1% de plasma seminal (v/v) pode inibir o teste de penetração em oócito de hamster (Kanwar *et al.*, 1979) e o ensaio de ligação a zona pelúcida em humanos (Huysen *et al.*, 1997).

O padrão de batimento flagelar assimétrico e de alta amplitude tem se mostrado altamente dependente da concentração de Ca^{2+} intracelular, mostrando o papel crucial do cálcio na hiperativação espermática (Okabe, 2013). Os canais de Ca^{2+} do espermatozoide (CatSper) estão localizados na membrana plasmática da peça principal e são a fonte primária de Ca^{2+} para hiperativação em espermatozoides de hamster (Ren *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2003). Eles se abrem em resposta ao aumento do pH intracelular o qual é associado com a capacitação espermática (Loux *et al.*, 2013). Os canais CatSper foram identificados no espermatozoide equino, entretanto, a relação de entrada de cálcio com indução da hiperativação foi considerada fraca (Loux *et al.*, 2013).

Durante a reação acrossômica, a membrana plasmática se une a membrana acrossômica externa formando vesículas e expondo a membrana acrossômica interna, a qual se liga a zona pelúcida. *In vitro*, foi testada a inibição da reação acrossômica do espermatozoide congelado equino com a adição de inibidores de serino proteases (Vasconcelos *et al.*, 2010). No entanto, esta inibição não foi suficiente para reduzir as alterações induzidas pela criopreservação. Após a reação acrossômica, o espermatozoide hiperativado penetra na zona pelúcida (ZP) até chegar no espaço perivitelinico. O espermatozoide se liga lateralmente com a região equatorial ao oolemma sendo envolvido pela membrana oocitária, se localizando no citoplasma do oócito (Flesch e Gadella, 2000). A capacitação e hiperativação espermática requerem um meio de fornecimento de cálcio e bicarbonato, bem como a ativação da síntese de AMPc para que se obtenha sucesso na fecundação (Suarez, 2008).

3.3. Princípios de 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 (Voss, 1993). 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. A redução da taxa de fertilidade observada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos causados a funcionalidade e integridade de estruturas das membranas espermáticas (Parks e Graham, 1992).

Os danos ocorridos durante a criopreservação são atribuídos às mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana espermática, toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico (Watson, 2000). 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). 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 de 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. 3).

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.

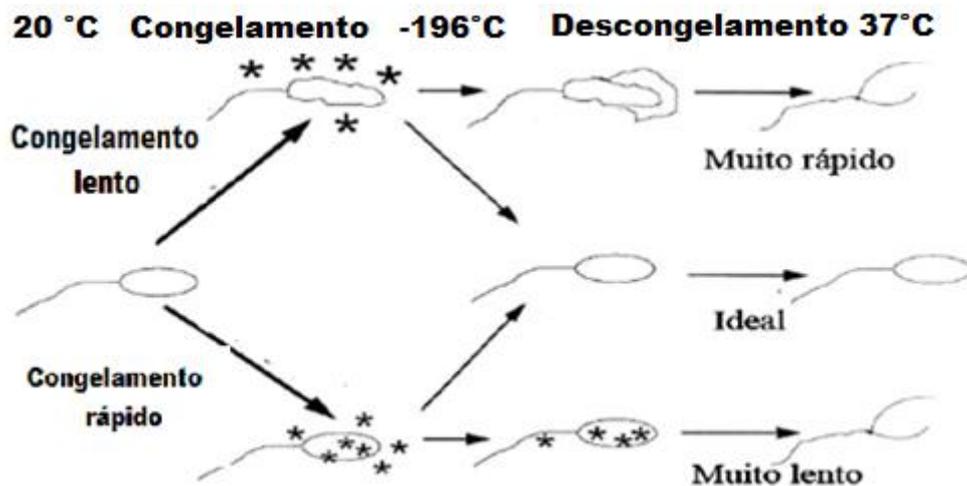


Figura 3: Representação esquemática das mudanças físicas do espermatozoide equino durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

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). 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).

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Estes 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. Além disso, promovem uma maior estabilidade a membrana plasmática do espermatozoide (Amam e Pickett, 1987).

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; Watson, 1979; Dalimata e Graham, 1997).

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). Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatar o efeito crioprotetor do glicerol. 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 (Watson, 2000). 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, 1995).

3.4. Processo de criopreservação de sêmen

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. 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 (Amann e Pickett, 1987; Jasko *et al.*, 1992; Pickett e Amann, 1992; 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 ressuspenso com o diluidor de congelamento. Para o congelamento tem se preconizado concentrações finais que variam de 100 a 200 milhões espermatozoides/ml (Jasko, 1994; Vidament *et al.*, 1997, Nascimento, 2006).

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozoides sejam preservados com diluidores apropriados (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000). 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 fosfocaseinato 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 (Manjunath e Thérien, 2002).

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 (Loomis *et al.*, 1983; Vidament *et al.*, 1997).

Para Amann e Pickett (1987), reduções na temperatura abaixo dos 37°C e, especialmente de 20°C, iniciam alterações de natureza biofísica no espermatozoide equino. Estes pesquisadores concluíram que, para o sucesso da preservação do sêmen a baixas temperaturas, uma série de complexas interações entre diluidor, taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento se faz necessário. Já os principais fatores a serem considerados no momento do descongelamento são tipos de envase utilizado, uniformidade de descongelamento em relação à condutividade de calor, espessura da parede das palhetas e a temperatura da água do banho-maria.

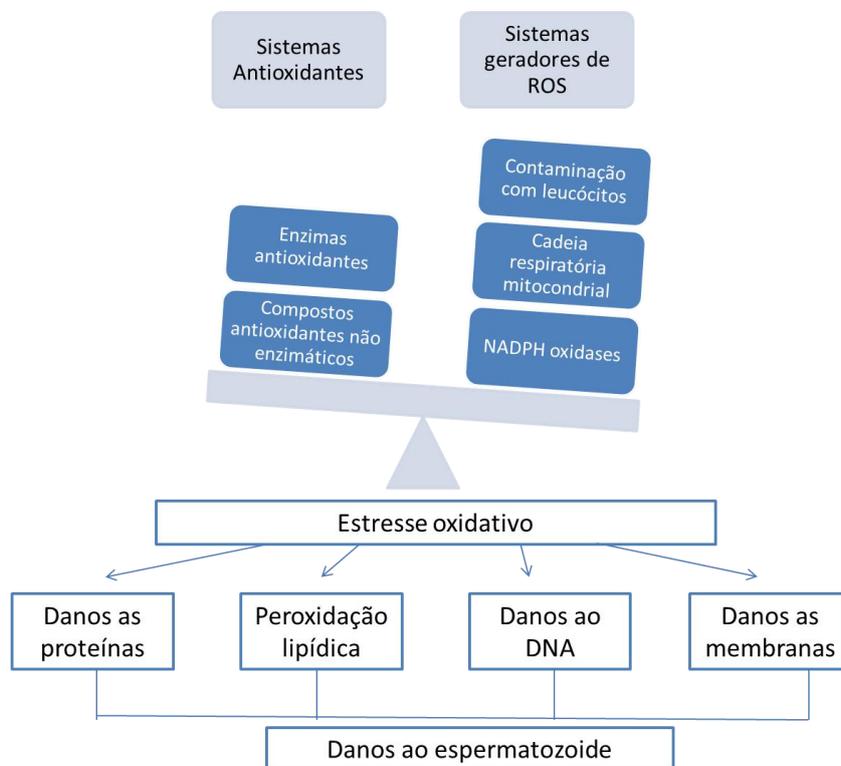
3.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre os sistemas de geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis pela sua remoção. Tal equilíbrio é cuidadosamente regulado dentro das células, como também no compartimento extracelular através de uma grande variedade de vias. Se as células espermáticas são expostas a níveis excessivos de ROS, em seguida, a sua capacidade de fertilização e integridade genética poderão ser comprometidas (Aitken, 1999).

No caso dos espermatozoides, as fontes de ROS são externas e internas. A externa, fonte particularmente de ânion superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é resultado da contaminação do sêmen com leucócitos. Esta fonte de ROS já foi associada à subfertilidade ou até mesmo infertilidade em humanos (Aitken *et al.*, 1996). Quanto à fonte interna de ROS, dois mecanismos envolvidos foram caracterizados em espermatozoides de ratos (Vernet *et al.*, 2001). Um mecanismo é através da fuga das ROS dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (Balaban *et al.*, 2005), enquanto o outro mecanismo baseia-se em um sistema enzimático relacionado com a família das NADPH oxidases (NOX) ligadas à membrana plasmática da célula, as quais utilizam os dinucleotídeos de adenina reduzidos (NADP-H) como substrato (Ball *et al.*, 2001; Vernet *et al.*, 2001). Um membro dessa família de oxidases (NOX5) já foi caracterizado nos testículos e espermatozoides equinos indicando um potencial mecanismo para a geração de ROS nestas células (Sabeur e Ball, 2007). Análises da origem da produção das ROS através das NADPH oxidases demonstraram maior concentração na cabeça e peça intermediária dos espermatozoides, o que sugere que a produção de superóxido pode ser atribuída a duas fontes diferentes (Sabeur e Ball, 2006). A capacidade de geração das ROS é significativamente aumentada em espermatozoides anormais (Iwasaki e Gagnon, 1992), particularmente as células com retenção de citoplasma (Gomez *et al.*, 1996). Espermatozoides com gotas citoplasmáticas apresentam maior conteúdo celular de enzimas citoplasmáticas, incluindo a glicose-6-fosfato desidrogenase. Esta enzima é responsável pelo fluxo de glicose através da via das pentoses fosfato com geração associada de NADPH (Baumber *et al.*, 2000).

As concentrações de radicais livres e espécies reativas derivadas de radicais são determinadas através do equilíbrio entre as respectivas taxas de produção e taxas de degradação por vários compostos antioxidantes e enzimas (Fig. 4). Halliwell e Gutteridge (1999) definiram antioxidantes como substâncias que são capazes, em concentrações relativamente baixas, de competir com outros substratos oxidáveis e, assim, retardar ou inibir significativamente a oxidação desses substratos. Esta definição inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), e a catalase (CAT), bem como compostos não enzimáticos tais

como o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno, o ácido ascórbico (vitamina C), e a glutathione (Dröge, 2002).



Em um estudo realizado por Aurich *et al* (1997), o antioxidante ácido ascórbico mostrou efeitos protetores sobre a integridade da membrana espermática equina após armazenamento do sêmen refrigerado, sugerindo que os danos causados pelas ROS podem estar relacionados à perda da função do espermatozoide durante o armazenamento do sêmen equino.

Além disso, há compostos que têm uma atividade antioxidante específica relativamente baixa, mas, quando presentes em concentrações elevadas, podem contribuir significativamente para a atividade global de eliminação de ROS. Como exemplos, temos os aminoácidos livres, peptídeos e proteínas. Praticamente todos os aminoácidos podem servir como alvos para ataque oxidativo por ROS, embora alguns aminoácidos, tais como triptofano, tirosina, histidina, e cisteína sejam particularmente sensíveis a ROS (Dröge, 2002).

Como o espermatozoide possui quantidades limitadas de antioxidantes, o plasma seminal mostra-se uma fonte potente destes, que atuam protegendo o espermatozoide dos efeitos adversos das ROS (Ball, 2008). As principais enzimas antioxidantes descritas no sêmen são a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Estas enzimas são bem conhecidas por converterem ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em O_2 e água (Sikka, 2004):

Figura 4: Representação das causas e consequências do estresse oxidativo na célula espermática (Dröge, 2002 Adaptada).

O resfriamento e descongelamento dos espermatozoides podem causar um aumento na geração de óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é produzido em organismos superiores por oxidação de um dos átomos terminais de nitrogênio da L-arginina. Este processo é catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Dependendo do microambiente, o NO pode ser convertido em várias outras espécies reativas de nitrogênio, como cátion nitrosônio (NO₁), nitrito (NO₂) ou peróxinitrito (ONOO₂) (Dröge, 2002). Embora a produção de óxido nítrico permaneça inalterada durante o resfriamento do espermatozoide, uma súbita explosão da produção de radicais de óxido nítrico é observada durante o descongelamento (Meyers, 2012).

Uma grande variedade de compostos tem sido testada em combinação com crioprotetores comuns básicos tais como gema de ovo e leite a fim de minimizar os danos causados pelo congelamento e descongelamento. Estes compostos incluem carnosin, carnitina, hipotaurina, taurina e vitamina E (Sanchez-Partida *et al.*, 1997). Os efeitos benéficos de tais antioxidantes fornecem evidências de que o estresse oxidativo ocorre durante a criopreservação (Alvarez *et al.*, 1987; Alvarez e Storey, 1992; Chen *et al.*, 1993; Sanchez-Partida *et al.*, 1997). As ROS são uma fonte importante de danos ao DNA do espermatozoide, e a adição de antioxidantes pode desempenhar um papel na redução de apoptose durante a armazenagem de sêmen e seu trânsito no trato genital (Sikka, 2004).

Todavia, as ROS parecem exercer um papel fisiológico no espermatozoide possivelmente relacionado com o processo de transdução de sinais. Muitos eventos fisiológicos dentro das células espermáticas são controlados pelas ROS, como a hiperativação, capacitação, reação acrossômica, ligação à zona pelúcida e penetração no oócito (De Lamirande *et al.*, 1997). Em termos moleculares, o efeito das ROS no processo de fosforilação da tirosina está intrinsicamente associado à capacitação espermática (Aitken *et al.*, 1995; Leclerc *et al.*, 1997; De Lamirande *et al.*, 1997; Lewis e Aitken, 2001).

3.6. Cafeína

A cafeína é uma substância bioativa identificada como 1,3,7-trimetilxantina podendo ser encontrada em diversos itens alimentares como café, semente de cacau e chá verde (Iarc, 1991). (Fig. 5). Tal como a pentoxifilina e a teofilina, a cafeína é uma metilxantina. Estas são frequentemente utilizadas em meios diluidores espermáticos para melhorar características seminais (Glogowski *et al.*, 2002). Em vários estudos que avaliaram a suplementação de metilxantinas sobre a qualidade espermática observou-se que essas substâncias resultaram em aumento de motilidade espermática tanto no sêmen *in natura* de bovinos e homens (Lardy *et al.*, 1971; Rees *et al.*, 1990) quanto no sêmen criopreservado de homens (Barkay *et al.*, 1997; David *et al.*, 2007).

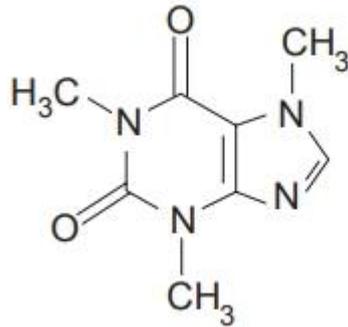


Figura 5: Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Fonte: Saldanha, 2012

A cafeína é um composto considerado estimulante metabólico, em decorrência, principalmente, da sua atuação como um inibidor competitivo a isoenzimas da fosfodiesterase em vários tecidos. Essa enzima é responsável por hidrolisar o AMPc (adenosina monofosfato cíclico), inativando-o. As alterações fisiológicas no espermatozoide induzidas pela cafeína promovem aumento de AMPc intracelular, responsável por ativar a proteína quinase. A via de sinalização AMPc/PKA é considerada uma das principais vias de regulação da motilidade e da capacitação espermática (Hou *et al.*, 2002). Visto que a cafeína é capaz de aumentar a concentração intracelular de AMPc pelo controle da atividade da fosfodiesterase, essa metilxantina pode apresentar um importante papel na modulação das funções espermáticas (Fig. 6).

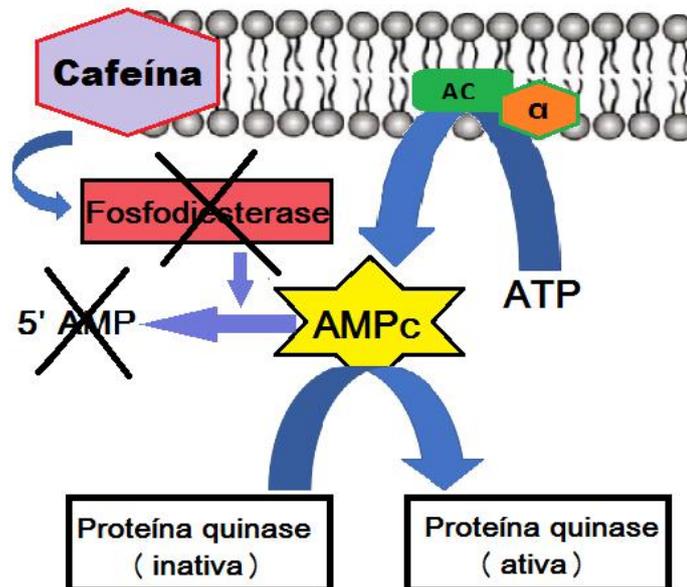


Figura 6: Mecanismo de ação da cafeína para aumento da concentração de AMPc na membrana plasmática (Hou *et al.*, 2002, adaptado).

A adição de cafeína ao sêmen é capaz de aumentar a porcentagem de células móveis, a intensidade e longevidade da motilidade espermática de carneiros (Colás *et al.*, 2010). A adição de cafeína foi reportada ao sêmen fresco e resfriado de coelhos (López e Alvarinõ, 2000) e varrões (Glogowski *et al.*, 2002). Em coelhos (López e Alvarinõ, 2000) e em varrões

(Glogowski *et al.*, 2002) a adição de cafeína na concentração de 5 mM ao sêmen diluído, fresco e resfriado aumentou a porcentagem de células móveis. A adição de cafeína na concentração de 2 mM ao sêmen congelado-descongelado de equino não foi capaz de induzir um aumento na motilidade progressiva comparado ao grupo controle (Stephens *et al.*, 2013). Entretanto, a adição de 5mM de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento aumentou a motilidade total comparada ao grupo controle após 120 minutos de descongelamento (Rota *et al.*, 2018)

3.7. Métodos de avaliação espermática *in vitro*

Para o desenvolvimento de métodos de congelamento são necessários testes *in vitro* que se correlacionem com a fertilidade *in vivo*, visto que testes de fertilidade *in vivo* com um adequado número de equinos são extremamente caros (Katila, 2001). A avaliação espermática mais utilizada de rotina é a de motilidade. Apesar de sua limitada aplicabilidade, este tipo de avaliação é de rápida execução e de fácil acesso. No entanto, a avaliação do sêmen *in vitro* através de outros testes é essencial para auxiliar na previsão da qualidade e fertilidade do sêmen.

Avaliação da motilidade espermática

A motilidade espermática é prontamente identificável e reflete vários aspectos essenciais do metabolismo do espermatozoide. Contudo, a motilidade deve ser avaliada juntamente com outros parâmetros a fim de se estimar o potencial fecundante dos espermatozoides. Normalmente, a motilidade progressiva (espermatozoides com movimento retilíneo e circular amplo) e a total (movimento progressivo e localizado) são estimadas através de porcentagens. O movimento circular amplo no espermatozoide equino é normal e deve-se à alta incidência de implantação abaxial da cauda a cabeça do espermatozoide (Kenney *et al.*, 1983). O vigor (velocidade dos espermatozoides) é avaliado em uma escala de 0-5.

Para obter uma estimativa precisa, as condições ambientais devem ser ideais e padronizadas para o sêmen. Todo o equipamento deve ser limpo (de preferência descartável) e antes da utilização, mantido a temperatura corporal por meio do armazenamento em uma estufa ou em placa aquecedora. A temperatura da lâmina deve ser controlada (+37°C), utilizando uma placa aquecedora sobre o microscópio; a profundidade da suspensão na lâmina deve ser padronizada, sendo que múltiplos campos perto do centro da lâmina devem ser examinados (Katila, 2001).

A avaliação com microscopia em campo claro não requer equipamento caro e é fácil de executar. No entanto, uma grande variação pode ser causada por diferenças entre os examinadores, uma vez que a avaliação é subjetiva e exige experiência. Se a motilidade for baixa, provavelmente não se indicará a utilização do sêmen. Por outro lado, um sêmen com motilidade alta não indica, necessariamente, que a capacidade fecundante do espermatozoide é suficiente para fertilidade desejada, sendo necessários outros exames de sêmen de rotina (Hafez, 1995).

Análise de características da motilidade espermática avaliada com sistema computadorizado

A avaliação visual microscópica da motilidade é uma técnica subjetiva propensa ao erro humano. Para tanto, têm sido desenvolvidos métodos mais objetivos, como o baseado em imagens microscópicas da motilidade espermática analisadas com auxílio de computador (CASA). As imagens de vídeo informatizadas do movimento espermático são obtidas a partir da visualização ao microscópio de campos com espermatozoides móveis. Um número definido

(geralmente 20 a 30) dos quadros de vídeo sucessivos é analisado a uma taxa constante, tipicamente 30-60 quadros por segundo. Quando todos os quadros para um dado campo foram analisados, algoritmos do computador são usados para distinguir espermatozoides de artefatos e reconstruir as trajetórias dos espermatozoides (Jasko, 1992). Cada espermatozoide é classificado como móvel ou sem motilidade, e a concentração de ambos é calculada. Os dados de motilidade são ainda caracterizados da seguinte forma: porcentagens de motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade curvilínea média (VCL- $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), retilinearidade (STR% = VSL/VAP), linearidade (LIN% = VSL/VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- μm), frequência de batimento flagelar (BCF-Hz) e oscilação dos espermatozoides (WOB- %). Ainda estão pouco claras as informações obtidas com as características específicas da motilidade com o CASA em relação a qualidade do sêmen. Isso é devido a não definição ainda de valores padrões para movimentos de espermatozoides normais ou anormais e não haver uma normalização internacional de configurações do equipamento (Katila, 2001). Na análise de sêmen congelado, partículas que não são espermatozoides (por exemplo da gema de ovo) podem ser erroneamente identificadas como espermatozoides, causando superestimação da concentração de espermatozoides e subestimação da proporção de espermatozoides móveis (Comhaire *et al.*, 1992). A concentração máxima de espermatozoides que pode ser lida pelo CASA é usualmente de 50×10^6 esp./ml, contudo uma diluição de 25×10^6 esp./ml tem sido recomendada (Varner *et al.*, 1991).

Palmer e Magistrini (1992) inseminaram 766 éguas com sêmen congelado avaliado pelo CASA, mas nenhum dos critérios mensurados (VCL, LIN, ALH, MOT, RAP) teve uma correlação significativa com a fertilidade. Até o momento, a superioridade da análise automática objetiva na avaliação de sêmen congelado com o CASA não foi comprovada. No entanto, é uma maneira objetiva de avaliação com precisão a velocidade e linearidade (Katila, 2001).

Morfologia espermática e integridade de membrana

Em alguns estudos, o aumento das anormalidades dos espermatozoides no ejaculado foi associado com redução da fertilidade (Bielański 1975, Jasko *et al.* 1990). No entanto, outros trabalhos não encontraram nenhuma relação entre o percentual de espermatozoides com a morfologia normal no sêmen fresco e a fertilidade (Voss *et al.* 1981, Dowsett e Pattie 1982). Algumas alterações morfológicas podem ser aceitas para ganhões, desde que o número total de espermatozoides móveis e morfológicamente normais no ejaculado for adequado (Kenney *et al.*, 1983). Às vezes, as baixas taxas de prenhez com inseminação com sêmen congelado são devidas ao pequeno número de espermatozoides vivos e morfológicamente normais. Após o congelamento e descongelamento, mudanças estruturais foram observadas no acrossoma, nas fibras externas da peça intermediária e no axonema da peça principal (Christensen *et al.*, 1995).

Entre todos os exames, o uso de corantes fluorescentes usados na citometria de fluxo permite avaliar vários parâmetros espermáticos simultaneamente de milhares de espermatozoides em um curto período de tempo (Zeginiadou *et al.*, 2000; Rathi *et al.*, 2001). Estas avaliações favorecem a predição da fertilidade potencial de um determinado animal e avaliam com mais acurácia a congelabilidade do sêmen de um ganhão (Magistrini, 2000). A membrana plasmática do espermatozoide envolve toda a célula e desempenha diversas funções importantes na fisiologia da célula. Se a membrana plasmática do espermatozoide não estiver funcionalmente intacta este será considerado inviável. A integridade física da membrana pode ser avaliada com marcação das células com corantes fluorescentes (Rathi *et al.*, 2001).

Uma combinação de duas sondas fluorescentes, como a carboxifluoresceína diacetato (CFDA) e o iodeto de propídio (PI), pode ser utilizada para avaliar a viabilidade celular. As moléculas de 6-CFDA atravessam as membranas espermáticas e são de-esterificadas por esterases no interior da célula. O corante 6-CFDA é convertido em CFDA, o qual é não penetrante a MP ficando retido no interior de células com membranas intactas e emitindo fluorescência verde. O corante PI é não penetrante a MP de células com membrana íntegra. Portanto, ao se ligar ao DNA de células com MP danificadas, o corante emite fluorescência vermelha, o que não ocorre se a MP estiver íntegra (Malmgren, 1997).

O método mais comumente utilizado para detectar a integridade acrossômica é a coloração com conjugados de fluoresceína-lectina, tais como a aglutinina do amendoim *Peanut agglutinin* (PNA), a aglutinina da ervilha *Pisum sativum agglutinin* (PSA) ou a concanavalina A (ConA) acoplados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC, Magistrini *et al.* 1997). Espermatozoides com acrossoma intacto apresentam intensa fluorescência verde na região acrossômica. Enquanto espermatozoides reagidos mostram uma imagem de fluorescência heterogênea. As células espermáticas que completam a reação acrossômica adquirem uma fluorescência no segmento equatorial ou permanecem não coradas (Cheng *et al.*, 1996). Kneissl (1993) encontrou alta correlação entre a motilidade total avaliada com o CASA e a porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra corados com CFDA e PI. A citometria de fluxo demonstrou ser uma ferramenta valiosa para obtenção de respostas de diferentes subpopulações de espermatozoides as condições de capacitação (Ricker *et al.*, 2006). A avaliação por citometria de fluxo do sêmen congelado de 5 garanhões com o auxílio do corante PI obteve correlação significativa com a fertilidade ($r = 0,68$) em 40 éguas e foi superior a análise a motilidade total e teste de penetração oócito de hamster (Wilhelm *et al.*, 1996).

Teste hiposmótico

O teste hiposmótico se baseia no princípio de quando os espermatozoides são diluídos em uma solução hipotônica, a água atravessa a MP da célula, em uma tentativa de atingir o equilíbrio osmótico. Isto conseqüentemente aumenta o volume da célula, reduzindo o comprimento do flagelo, devido ao enrolamento do axonema (Drevius e Eriksson 1966). A entrada de água ocorre principalmente na região da cauda, visto que é onde a membrana é mais frouxamente aderida. A formação de diferentes tipos de enrolamento da cauda é um sinal de que a água foi transportada para dentro da célula de modo a atingir o equilíbrio osmótico. Isto indica que a MP está funcional (Colenbrander *et al.*, 1992). Quando o espermatozoide não suporta o estresse osmótico, a membrana plasmática se rompe e ocorre desespiralização da cauda (Jeyendran *et al.*, 1984). O teste hiposmótico foi desenvolvido para a avaliação do sêmen de humanos, utilizando-se uma solução a 150mOsm/L contendo citrato de sódio e lactose (Jeyendran *et al.*, 1984). A avaliação da funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide humano foi avaliada com uma modificação da solução hipotônica com carboidrato e citrato de sódio por uma com solução hipotônica contendo água destilada (osmolaridade= 0 mOsm/kg, Lomeo e Giambersio, 1991). Este teste foi modificado por Lagares *et al.* (2000) para avaliação do sêmen equino. Nesta avaliação, uma alíquota de 100 µl de sêmen foi adicionada a 200 µl (diluição 1:2) de água destilada a 37°C, seguido de incubação a 37°C por 5 min. Após este período, 200 espermatozoides das amostras foram analisados em microscopia de contraste de fase (400x). O percentual de espermatozoides que reagiu positivamente ao teste hiposmótico foi calculado por meio da porcentagem de espermatozoides que reagiu positivamente ao HOST (cauda enrolada)

em relação ao total avaliado. Lagares (1995) avaliou 156 ejaculados de 13 garanhões, e observou uma correlação positiva entre o teste hiposmótico e a taxa de fertilidade.

Métodos de seleção espermática

As técnicas de seleção espermática visam melhorar a qualidade do sêmen fresco, resfriado e congelado de garanhões através da separação dos espermatozoides com motilidade progressiva bem como morfologicamente normais (Macpherson *et al.*, 2001). Os métodos usados para separação de espermatozoides móveis de amostras de sêmen incluem *swim-up*, filtração em lâ de vidro e uso de procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade (Dode *et al.*, 2002). Segundo Henkel e Schill (2003), o método de preparação espermática ideal deve isolar o maior número de espermatozoides móveis possível, não causar danos ou alterações nas células espermáticas, retirar espermatozoides mortos e outras células, eliminar substâncias tóxicas ou bioativas como fatores de decapacitação ou ROS e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculados.

O método do *swim-up* utiliza a motilidade das células espermáticas como método de seleção. Sob condições fisiológicas, apenas espermatozoides com boa motilidade completam a migração através dos fluidos da cérvis e da tuba uterina (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997). Ng e colaboradores (1992) comparando as técnicas de Percoll e *swim-up*, observaram que a taxa de recuperação foi superior com Percoll. Entretanto, os padrões de qualidade espermática foram superiores quando o *swim-up* foi utilizado. Rodríguez-Martínez (1997) determinou aumento das taxas de fecundação de bovinos após utilização da seleção espermática com *swim-up*. No entanto, uma desvantagem do método é a grande perda de células espermáticas. O uso da habilidade de migração dos espermatozoides neste procedimento resulta em amostras contendo espermatozoides móveis, com rendimento de aproximadamente 10- 20% para sêmen *in natura* ou < 10% da amostra original em amostras de sêmen congelado-descongelado (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997).

3.8. Fertilidade *in vivo* do sêmen congelado

A finalidade da utilização de sêmen congelado equino é a obtenção de taxas de fertilidade semelhantes à monta natural, porém ainda são necessários o aperfeiçoamento e a padronização de técnica de criopreservação para maximizar esta tecnologia. Dentre alguns fatores podem ser destacados o momento da inseminação, local de deposição do sêmen, número de espermatozoides móveis na dose inseminante, qualidade e padronização do sêmen congelado.

Amann e Pickett (1987) sugeriram que o processo de congelamento-descongelamento afeta a motilidade espermática progressiva, o metabolismo espermático, a integridade de membrana celular, as enzimas acrossômica, as nucleoproteínas e a interação oócito-espermatozoides. No entanto, os autores registraram baixa taxa de fertilidade com sêmen congelado, embora as doses inseminantes tivessem concentração adequada de espermatozoides com motilidade progressiva.

As concentrações espermáticas ideais para obtenção da máxima eficiência reprodutiva em garanhão, divergem possivelmente em decorrência de diferentes protocolos utilizados. O uso de diferentes diluidores, o momento de inseminação, a qualidade seminal interfere na taxa de fertilidade. Os critérios mínimos estabelecidos para o uso de sêmen descongelado na

inseminação artificial têm sido preconizados como sendo de 30% de motilidade imediatamente após o descongelamento (Cristanelli *et al.*, 1984; Love *et al.*, 1999).

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado vem demonstrando ser uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva em programas comerciais. A IA pode ser realizada pelo método convencional, depositando de 200 a 800 milhões de espermatozoide viáveis no corpo do útero (Morris *et al.*, 2000), ou pela deposição do sêmen próxima a junção útero tubárica ipsilateral à ovulação por meio de pipeta longa e flexível guiada através da cérvix e corno uterino (Fleury e Cassoli, 1999).

Medidas têm sido descritas para aumentar a taxa de fertilidade do sêmen equino congelado-descongelado (Voss, 1993). No entanto, ainda não foi reportada a influência da adição de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento *in vitro* sobre as características de motilidade, funcionalidade e integridade de membrana espermática, ação antioxidante, taxa de recuperação espermática e morfologicamente normais após *swim -up* e a taxa de fertilidade *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios brasileiros de ética e bem-estar animal para utilização de animais na pesquisa e foram aprovados pelo “Comitê de Ética em Uso de Animais” (CEUA) da UFMG, com protocolo: 394/2017.

Coleta e avaliação do sêmen

Foi utilizado um ejaculado de nove garanhões (n=9) das raças Mangalarga Marchador, Árabe e Campolina clinicamente saudáveis, com idade entre 5 e 6 anos, localizados nas cidades de Caeté, Pará de Minas e Esmeraldas/MG, nos meses de março, outubro, novembro e dezembro de 2017. Os animais estavam sendo utilizados na estação de monta e foram selecionados a partir de exame andrológico e do histórico reprodutivo. As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial modelo “Hannover”. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi filtrado para a retirada da fração gel e avaliado quanto à motilidade total e progressiva, vigor, concentração e morfologia espermáticas.

O sêmen fresco foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva e total, e vigor com o auxílio de um microscópio de campo claro (100x). Foram utilizados apenas ejaculados com motilidade progressiva igual ou superior a 50% e vigor igual ou superior a 3. O cálculo da concentração espermática/ml foi realizado através da contagem de espermatozoides com hemocítmetro. A morfologia espermática foi avaliada através da técnica de preparação úmida (Mies Filho, 1975). O sêmen foi preservado em solução de formol salina tamponada e 100 espermatozoides foram avaliados por amostra com auxílio de microscopia de contraste de fase (1000x). Foram utilizados somente ejaculados com porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais maior ou igual a 70% (CBRA, 2013).

Congelamento do sêmen

Para o congelamento do sêmen dos garanhões, o sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com diluidor de Kenney *et al.* (1975) e centrifugado (400xg, 10 min). O sobrenadante foi descartado de modo a se deixar 10% do centrifugado. Após a homogeneização, o sêmen foi resuspendido

com o diluidor de congelamento INRA 82 para se obter 100×10^6 esp./ml e avaliado quanto à motilidade total e progressiva, e vigor espermáticos. As amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5ml, seladas e imediatamente resfriadas com uma curva de $0,27^\circ\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de 5°C por 1,5h. As palhetas foram dispostas a 2,5cm acima do nitrogênio líquido e após 20 min. imersas neste, sendo armazenadas em botijões de nitrogênio líquido (-196°C).

O presente trabalho consistiu em três experimentos onde foram realizadas 1) avaliações *in vitro* das amostras de sêmen, 2) seleção espermática com *swim-up* e 3) avaliação da fertilidade *in vivo* do tratamento que apresentou melhores resultados *in vitro* e do controle, pós-descongelamento de sêmen e adição de diferentes concentrações de cafeína.

Experimento 1: Avaliação *in vitro* da qualidade espermática pós-descongelamento com adição de diferentes concentrações de cafeína

Avaliação espermática pós-descongelamento

Para a análise espermática amostras de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho-maria e distribuídas em quatro tratamentos: T1) sêmen congelado com diluidor INRA82, controle, T2) T1+3mM de cafeína, T3) T1+5mM de cafeína, e T4) T1+7,5mM de cafeína. Após o descongelamento das amostras de sêmen os testes em seguida foram realizados.

Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA)

Para análise da motilidade e cinética espermática, uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ de sêmen entre lâmina e lamínula de $22 \times 22 \text{mm}$ de cada tratamento foi avaliada nos tempos T0) imediatamente após adição de cafeína; T20: 20min.; T30: 30min; T40: 40min e T50: 50min após adição de diferentes concentrações de cafeína quanto a motilidade total (MT%), progressiva (MP%), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m}/\text{s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- μm), frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%) e oscilação dos espermatozoides (WOB- %) com o aparelho de avaliação computadorizada espermática (CASA: Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Espanha). Foram analisados 5 campos/amostra. As configurações do CASA utilizadas foram: captura: 25 imagens por segundo; câmara: lâmina e lamínula; motilidade progressiva > 75% de retilinearidade (STR), circular <50% de linearidade (LIN).

Avaliação da funcionalidade espermática

A porcentagem de espermatozoides com membrana funcional foi avaliada por meio do teste hiposmótico com água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991) modificado por Lagares *et al.* (2000) na diluição 1:2 (sêmen: água destilada). Pós-descongelamento, uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ de sêmen foi adicionada a $200 \mu\text{L}$ de água destilada a 37°C . Após 5 minutos de incubação 200 células por amostra foram analisadas em microscopia de contraste de fase (400x). O percentual de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico com cauda enrolada foi calculado subtraindo-se a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada avaliadas no exame morfológico.

Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossômica

A integridade das membranas plasmática e acrossômica foi avaliada com auxílio de citometria de fluxo, com as sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e Isotocianato de fluoresceína- *Peanut agglutinin* (FITC-PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em solução tamponada fosfatada (PBS, 250 µl de sêmen:5 mL de PBS). Uma alíquota de 200µL dessa suspensão foi corada com FITC-PNA (1,125µg/ml) e incubada por 10 min. a 37°C. Posteriormente as amostras foram diluídas acrescentando-se 1mL de PBS, coradas com PI (1,5 mM) e incubadas por 10 min. a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dez mil eventos, a uma taxa de 500 células por segundo, foram analisados por amostra.

As seguintes categorias espermáticas foram observadas: PI+/PNA+: membrana plasmática e acrossômica não íntegras, PI+/PNA-: membrana plasmática não íntegra e acrossômica íntegra, PI -/PNA-: membrana plasmática e acrossômica íntegras, PI- e PNA+: membrana plasmática íntegra e acrossômica não íntegra. Foram considerados espermatozoides com reação acrossômica espontânea somente os com PI-/PNA+, e os espermatozoides viáveis sem reação acrossômica espontânea os com PI-/PNA-.

Mensuração da concentração de espécies reativas ao oxigênio

Visto que foi observada maior porcentagem de espermatozoides com MT no tratamento com 5mM de cafeína (T3) comparada ao controle, o efeito antioxidante foi avaliado nestes dois tratamentos por meio da mensuração de nitrito (NO_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Foi realizada a mensuração da concentração de NO_2^- e H_2O_2 ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína) com espectrofotometria com reagente de Griess (Green *et al.*, 1982) e dosagem pelo método FOX 2 modificado (Nourooz-Zadeh, 1994), respectivamente.

O nitrito é um dos dois produtos primários, estáveis e não voláteis da decomposição do NO , e sua medição usando espectrofotometria com reagente de Griess (Green, 1997) é uma maneira de investigar a formação de óxido nítrico. O Griess Reagent System baseia-se na reação de diazotização química que utiliza 2% (p / v) de sulfanilamida e 0,2% (p / v) de dicloridrato de N-1-nafiletiletlenodiamina (NED) sob condições ácidas (5% (v / v) de ácido fosfórico). O limite de detecção é de nitrito de 2,5 µM (125 pmol) (em água destilada ultrapura e desionizada). A absorvância das amostras foi determinado a 560 nm.

Para mensuração do H_2O_2 foi utilizada a técnica espectrofotométrica de FOX-2 modificada (oxidação ferrosa do Xilenol Orange, versão 2). Essa técnica consiste na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas, pelos H_2O_2 lipídicos. O indicador utilizado é o Xilenol Orange, que reage com os íons Fe^{3+} produzindo um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção $4,3 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, a 560nm. Para tal, preparou-se o reagente de FOX no momento da análise e este foi mantido ao abrigo de luz durante todo o experimento. Em um microtubo de 0,5mL, foi adicionado 450µL do reagente de FOX a 50µL da amostra de sêmen descongelado (37°C, 30seg) e após 30 min, a amostra foi centrifugada (300xg, 15seg). O branco foi feito com 450µL do reagente de FOX adicionado de 50µL de água destilada. Duzentos microlitros das amostras e do branco (duplicata) foram pipetados para uma microplaca a qual foi submetida à leitura em espectrofotômetro a 560nm. O cálculo da concentração de H_2O_2 nas amostras foi realizado de acordo com o coeficiente de extinção molar

de H_2O_2 . Logo: $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot C$, onde A_λ =absorbância a 560nm; ϵ_λ = coeficiente de extinção molar do cromóforo; C = concentração de hidroperóxidos (mol/mL).

Experimento 2: Análise da seleção espermática com a técnica de *swim-up* com adição de diferentes concentrações de cafeína

Para avaliar se a adição de cafeína aumentava a taxa de recuperação espermática e de espermatozoides morfologicamente normais, foi adicionada cafeína em diferentes concentrações ao meio de seleção espermática por *swim-up*. Para a seleção espermática com a técnica de *swim-up*, amostras de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho-maria e distribuídas em quatro tratamentos: T1: controle (sem adição de cafeína); T2: controle + 3mM de cafeína; T4: controle + 5mM de cafeína e T5: controle + 7,5mM de cafeína. Após o descongelamento, uma alíquota de cada amostra de sêmen foi depositada no fundo de um tubo cônico tipo Eppendorf de 1,5 ml contendo meio TCM 199 com sais de Hanks e 10% de soro fetal bovino em uma proporção de 1: 3 (sêmen: meio). Os tubos foram dispostos em banho-maria a um ângulo de 30° e a temperatura de 37°C durante diferentes tempos de incubação: 20, 40, 60 e 80 min. Após a incubação, aproximadamente 1/3 do volume total do tubo foi retirado do sobrenadante e a concentração espermática/ml foi calculada com um hemocitômetro e microscopia de campo claro.

A análise da morfologia dos espermatozoides antes e recuperados pós *swim-up* foi realizada em microscopia de contraste de fase (1000x) de 200 células espermáticas de amostras preservadas em solução formol salina tamponada a 2%.

Experimento 3: Avaliação *in vivo* da taxa de fertilidade de sêmen congelado-descongelado com adição de cafeína

Foi avaliada a taxa de fertilidade de um garanhão maturo sexualmente (9 anos) com inseminação de 8 éguas/tratamento sendo o T1: sêmen congelado/descongelado com INRA 82 (controle) e T3: sêmen congelado/descongelado adicionado de 5mM de cafeína antes da inseminação artificial. A concentração de 5 mM de cafeína foi escolhida para o teste de fertilidade *in vivo*, visto que foi observada maior porcentagem de espermatozoides com MT comparada ao controle e maior taxa de recuperação espermática após *swim-up*.

A taxa de fertilidade foi avaliada com IA de 16 éguas de forma aleatória. As éguas se encontravam alojadas na Fazenda Experimental da PUC-Betim e foram selecionadas para o experimento após avaliação de escore corporal (de 0 a 10). Foram usadas somente éguas com escore acima de 6, status uterino saudável (sem cistos endometriais e acúmulo de líquido e/ou ar intrauterino), temperamento tranquilo e idade entre 4 a 8 anos. Antes do início das inseminações, as éguas foram vermifugadas e tratadas com carrapaticida para o controle de infestações por endo e ectoparasitas. As mesmas foram mantidas em regime de pastejo rotacionado em piquetes de tifton e suplementação com sal mineral. As éguas foram examinadas diariamente por palpação retal e com ultrassonografia, e a ovulação foi induzida com um análogo de GnRH, Acetato de Histrelina (Strelin® , 250 µg/ml na dose de 1ml IM) quando foi detectado um folículo ovariano ≥ 35 mm de diâmetro acompanhado de edema uterino grau 3 (1-3) compatível com o estro na espécie equina de acordo com a classificação de Samper (1997). Após 24 horas da indução da ovulação as éguas foram examinadas com ultrassonografia a cada 6 horas até a identificação da ovulação, com a presença de um corpo lúteo, quando foram inseminadas com

5ml de sêmen (10 palhetas de 0,5ml) com o auxílio de uma pipeta flexível (Minitube do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil), depositando o sêmen no ápice do corno uterino correspondente ao ovário no qual foi detectada a ovulação, respeitando a mesma técnica de inseminação e volume de sêmen para os dois grupos. O percentual de espermatozoides com motilidade total na dose inseminante foi de 30% perfazendo uma dose inseminante de 150×10^6 de espermatozoide com motilidade total. O diagnóstico de gestação foi realizado com ultrassonografia 14 dias pós ovulação e IA, quando uma dose de 1ml de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Campinas, SP, Brasil) foi administrada por via intramuscular provocando luteólise.

Análises estatística

Para a avaliação do efeito da adição de diferentes concentrações de cafeína foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso, considerando o ganhão como bloco. Os cálculos de média, desvio padrão, erro padrão e análise de variância foram realizados conforme Sampaio (2002). As médias obtidas para os diferentes parâmetros foram comparadas. A MT, VAP, VCL, VSL, BCF, STR, LIN, WOB, ALH, concentração de peróxido de hidrogênio e nitrito, taxa de recuperação espermática e porcentagem de espermatozoides com membrana funcional e íntegra, com e sem reação acrossômica espontânea apresentaram distribuição normal e as médias foram analisadas por ANOVA e comparadas pelo teste Duncan. O percentual de espermatozoides com MP e o percentual de espermatozoides morfologicamente normais após a seleção espermática pelo método de *swim-up* não apresentaram distribuição normal e foram analisados como variáveis não paramétricas pelo teste de Friedman. Os dados foram analisados com o programa Infostat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Foi considerada significativa a probabilidade de $P < 0,05$.

Para a análise da taxa de gestação foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. As médias obtidas foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. Os dados foram analisados com o programa Infostat (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Foi considerada significativa a probabilidade de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação *in vitro* da qualidade espermática pós-descongelamento com adição de diferentes concentrações de cafeína

Os parâmetros de avaliação do sêmen fresco do ejaculado de nove ganhões ($n=9$) utilizados no presente experimento foram descritos na tabela 1. Após a coleta, os ejaculados apresentaram motilidade total (MT) de 70 a 90%, motilidade progressiva (MP) de 60 a 80% e vigor espermático de 3 a 4, estando os valores dentro do aceitável para criopreservação. A concentração espermática variou de 100×10^6 a 522×10^6 esp./ml e o número total de espermatozoides no ejaculado foi de 3 a $18,9 \times 10^9$. O percentual de espermatozoides morfologicamente normais no ejaculado foi de 75% a 85%, apresentando-se dentro da normalidade para o sêmen equino ($>70\%$), de acordo com o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013)

Tabela 1: Características espermáticas de avaliação do sêmen fresco (n=9).

Garanhão	MT (%)	MP (%)	Vigor (1-5)	Vol. (ml)	Nº esp. x10 ⁹ /ejac.	Conc. esp. x10 ⁶ /ml	Esp. morf. normais%
1	80	70	4	35	9,9	282,5	80
2	70	60	4	75	18,9	252,5	76
3	70	60	3	33	3,3	100,0	84
4	80	70	4	50	12,1	243,5	75
5	70	60	4	36	11,7	326,0	75
6	80	70	4	40	14,0	467,5	75
7	90	80	4	10	5,2	522,0	80
8	80	70	3	40	8,8	220,0	75
9	70	60	3	10	3,0	300,0	85
Média	76,7	66,7	3,7	36,6	9,7	301,6	77,8

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva, Vol.=Volume, Nº esp. x10⁹/ejac.: número total de espermatozoides x10⁹no ejaculado, Conc. esp. x10⁶/ml: concentração espermática x10⁶/ml, Esp. morf. normais %: porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais.

Não houve interação entre tratamento e tempo após o descongelamento das amostras de sêmen e adição de diferentes concentrações de cafeína avaliadas com o CASA em diferentes tempos (Tab. 2 a 4, P>0,05).

A MT foi mantida até 30min, havendo uma redução significativa em relação ao controle aos 40 até 50 min após o descongelamento das amostras (P<0,05 Tab.2). Somente com a adição de 5mM de cafeína houve aumento significativo da MT em relação ao controle, além de ter sido superior a 3mM (P<0,05, Tab.2), embora semelhante a 7,5mM de cafeína (P>0,05).

Tabela 2: Percentual de espermatozoides com motilidade total avaliado pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).

Trat /tempo	Motilidade total (%)					Média
	t0	t20	t30	t40	t50	
I 82	37,5±9,2	36,5±7,9	36,2±8,5	26,2±6,6	26,5±5,6	32, ±3,4 ^b
I+3mM Caf	32,3±4,5	33,2±3,4	26,8±4,9	22,3±3,6	21,3±3,6	27,2 1,9 ^b
I+5 mM Caf	53,1±8,4	42,0±5,4	37,2±5,2	30,2±5,1	32,2±4,3	38,9 2,8 ^a
I+7,5mM Caf	45,9±6,8	37,3±5,4	31,5±7,3	26,7±5,4	26,9±4,3	33,6 2,8 ^{ab}
Média	42,2±3,8 ^A	37,2±2,8 ^A	32,9±3,3 ^{AB}	26,4±2,6 ^B	26,7±2,3 ^B	

Trat= Tratamento, I 82 e I: diluidor de congelamento INRA 82, Caf: cafeína, ^{ab} valores com letras diferentes entre linhas e ^{AB} entre colunas diferiram estatisticamente (P<0,05).

Houve redução significativa da MP a partir de 40min até 50min pós-descongelamento (P<0,05 Tab.3). Foi observada redução significativa da MP com a adição de 3mM de cafeína em relação

a 5mM. (P<0,05, Tab.3). No entanto, nenhum dos tratamentos com adição de cafeína diferiu do controle (P>0,05).

Tabela 3: Percentual de espermatozoides com motilidade progressiva avaliado pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).

Trat /tempo	Motilidade Progressiva (%)					Média
	t0	t20	t30	t40	t50	
I82	9,2±3,2	6,1±1,7	5,6±1,9	4,3±1,6	4,3±1,6	5,9±0,9 ^{ab}
I +3 mM Caf	6,1±1,3	4,4±1,1	4,2±1,4	2,9±0,8	2,8±0,8	4,1±0,5 ^b
I+5 mM Caf	12,6±2,9	7,7±1,5	7,4±1,3	4,7±1,3	5,5±1,3	7,6±0,9 ^a
I+7,5 mM Caf	7,9±1,9	7,0±2,3	6,4±2,2	6,1±2,3	6,5±1,9	6,8±0,9 ^{ab}
Média	8,9±1,3 ^A	6,3±0,8 ^{AB}	5,9±0,9 ^{AB}	4,5±0,8 ^B	4,8±0,7 ^B	

Trat= Tratamento, I 82 e I: diluidor de congelamento INRA 82, Caf: cafeína, ^{ab} valores com letras diferentes entre linhas, e ^{AB} entre colunas diferiram estatisticamente (P<0,05).

Não houve diferença do VCL, BCF e VAP, VSL, STR, LIN, WOB e ALH entre os tempos e o VAP, VSL, STR, LIN, WOB e ALH entre os tratamentos avaliados com o CASA (P>0,05, Tab 4). O tratamento com 7,5mM apresentou VCL e BCF maiores que 3mM de cafeína e o BCF maior que o controle (P<0,05), enquanto o VCL dos tratamentos com cafeína não diferiu do controle (P>0,05, Tab 4).

Tabela 4: Parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema de avaliação espermática computadorizada (CASA) pós-descongelamento (média± erro padrão)

Trat	VCL (µm/s)	BCF (Hz)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	STR (%)	LIN (%)	WOB (%)	ALH (µm)
I82	31,4± 9,5 ^{ab}	7,4± 0,3 ^b	23,0± 1,3 ^a	17,2± 1,1 ^a	72,6± 1,3 ^a	52,8± 1,3 ^a	71,8± 1,4 ^a	2,1± 0,1 ^a
I +3mM Caf	29,6± 1,0 ^b	7,6± 0,3 ^b	21,2± 0,9 ^a	15,9± 0,8 ^a	73,3± 1,1 ^a	52,2± 1,4 ^a	70,7± 1,1 ^a	2,1± 0,1 ^a
I +5mM Caf	33,5± 1,3 ^{ab}	8,0± 0,3 ^{ab}	24,3± 1,1 ^a	18,4± 0,9 ^a	74,3± 1,1 ^a	53,7± 1,5 ^a	71,7± 1,1 ^a	2,2± 0,1 ^a
I +7,5 mM Caf	35,3± 1,9 ^a	8,6± 0,3 ^a	24,9± 1,6 ^a	18,5± 1,3 ^a	72,9± 1,3 ^a	50,8± 1,7 ^a	68,9± 1,4 ^a	2,1± 0,1 ^a

Trat= Tratamento, I82: INRA 82, Caf: cafeína, VCL: velocidade curvilínea; BCF: frequência de batimento cruzado, VAP: velocidade média da trajetória, VSL: velocidade linear progressiva, STR: retilinearidade, LIN: linearidade, WOB: índice de oscilação, ^{ab} valores com letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente (P<0,05)

O percentual de espermatozoides com membrana funcional avaliados com o teste hiposmótico (HOST) não diferiu significativamente entre os grupos e tempos avaliados (Tab.5).

Tabela 5: Percentual de espermatozoides com membrana espermática funcional (teste hiposmótico, HOST+) após a adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).

Espermatozoides com membrana funcional (% HOST+)						
Trat /tempo	t0	t20	t30	t40	t50	Média
I82	31,1±2,9	31,2±3,5	31,4±3,4	31,4±3,2	28,3±2,7	30,7±1,3
I +3mM Caf	32,3±2,8	30,6±3,6	30,8±3,7	30,2±3,4	30,7±2,8	30,9±1,4
I +5mM Caf	33,2±2,9	31,2±2,9	30,0±2,9	32,1±2,9	30,9±3,1	31,5±1,3
I +7,5mM Caf	31,3±3,3	31,7±3,3	30,1±2,5	29,8±2,8	29,7±3,2	30,5±1,3
Média	32,0±1,5	31,2± 1,6	30,6±1,5	30,9±1,5	29,9±1,4	

Trat= Tratamento, I82 e I: INRA 82, Caf: cafeína; não houve diferença estatística entre os valores entre linhas e colunas (P>0,05)

Não houve diferença significativa da taxa de espermatozoides com membranas íntegras (PI-, Tab. 6) e reação acrossômica espontânea (PI-/PNA+, Tab.7) avaliados com citometria de fluxo entre os tratamentos e tempos testados.

Tabela 6: Percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegras (PI-) com citometria de fluxo após a adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos pós-descongelamento (média±erro padrão).

% Espermatozoide com Membrana Plasmática íntegra (PI-)					
Trat /tempo	T20	t30	t40	t50	Média
I 82	27,0±4,2	30,2±4,9	27,0±4,6	27,6±4,0	27,9 ±2,2
I +3mM Caf	26,5±3,7	29,7±4,8	27,6±5,6	29,4±2,9	28,3±2,1
I +5mM Caf	28,8±4,3	32,2±5,2	28,2±5,2	27,1±5,4	29,1±2,4
I +7,5mM Caf	28,2±4,1	28,2±4,4	26,6±3,9	25,8±4,5	27,2±2,0
Média	27,6±1,9	30,1±2,3	27,4±2,3	29,8±2,1	

Trat= Tratamento, I82 e I: INRA 82, Caf: cafeína; não houve diferença estatística entre os valores entre linhas e colunas (P>0,05)

Tabela 7: Percentual de espermatozoides com reação acrossômica espontânea pós-descongelamento e adição de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos avaliado com citometria de fluxo (média±erro padrão).

% Taxa de reação acrossômica espermática espontânea (PI-/ PNA+)					
Trat /tempo	T20	t30	t40	t50	Média
I 82	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,6±0,1	0,4±0,1
I +3mM Caf	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1
I +5mM Caf	0,3±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1
I +7,5mM Caf	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,7±0,1	0,5±0,1
Média	0,3±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	

Trat= Tratamento, I82 e I: INRA 82, Caf: cafeína; não houve diferença estatística entre os valores entre linhas e colunas (P>0,05)

A adição de 5mM de cafeína ao sêmen pós- descongelamento reduziu a concentração de nitrito ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína, $P<0,05$), embora não tenha diferido quanto a concentração de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína) comparado ao controle ($P>0,05$, Tab. 8).

Tabela 8: Concentração pos- descongelamento de Peróxido de Hidrogênio e Nitrito ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína) e após a adição de 5mM de cafeína (média±erro padrão)

Tratamentos	Peróxido ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína)	Nitrito ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína)
INRA 82	36,4±3.6 ^a	12,8 ±2.9 ^a
INRA 82 + 5mM Cafeína	37,0±2.1 ^a	11,4±2.1 ^b

^{ab} valores com letras diferentes entre linhas diferiram estatisticamente ($P<0,05$).

Experimento 2: Análise da seleção espermática com a técnica de *swim-up* com adição de diferentes concentrações de cafeína

O número de espermatozoides recuperados após *swim-up* foi maior com a adição de 5mM de cafeína comparado ao *swim up* sem cafeína ($P<0,05$, Fig. 7). O tempo de incubação dos espermatozoides de 20 a 80 min não influenciou a taxa de recuperação espermática nos tratamentos avaliados ($P>0,05$).

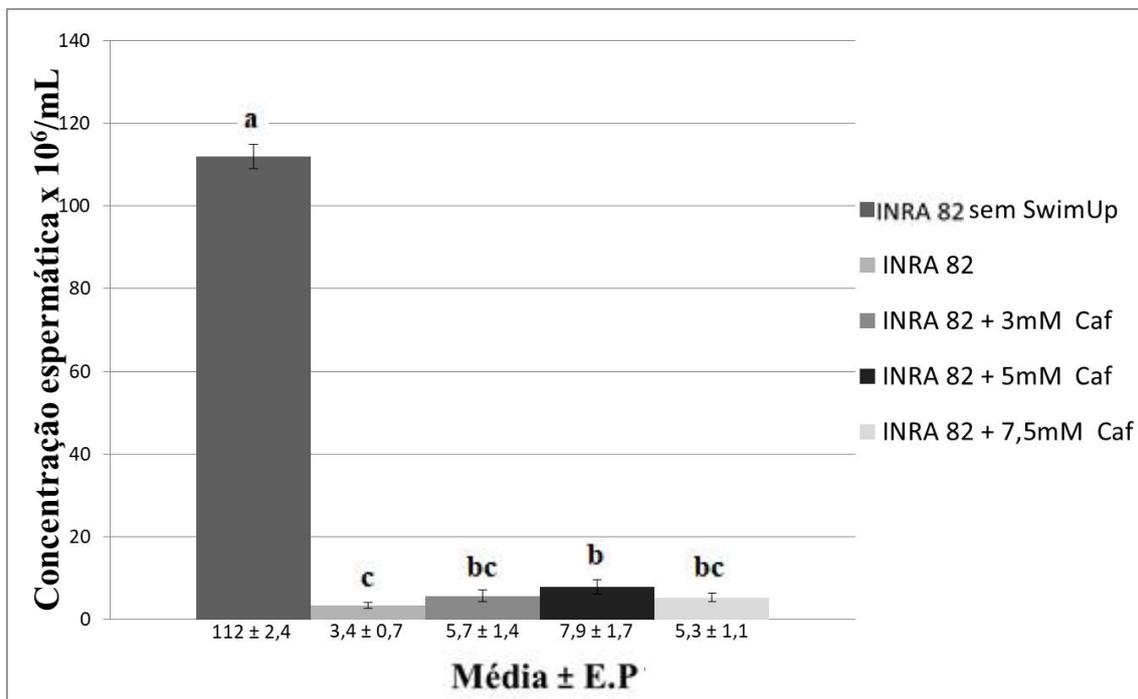


Figura 7. Número de espermatozoides pós-descongelamento e recuperados com adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; ^{abc} valores com letras diferentes diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

A porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais foi maior após *swim-up* ($P < 0,05$) independente do tempo entre 20 a 80 min de incubação e adição de cafeína, ($P > 0,05$, Fig. 8). Não houve interação entre tempo e tratamento.

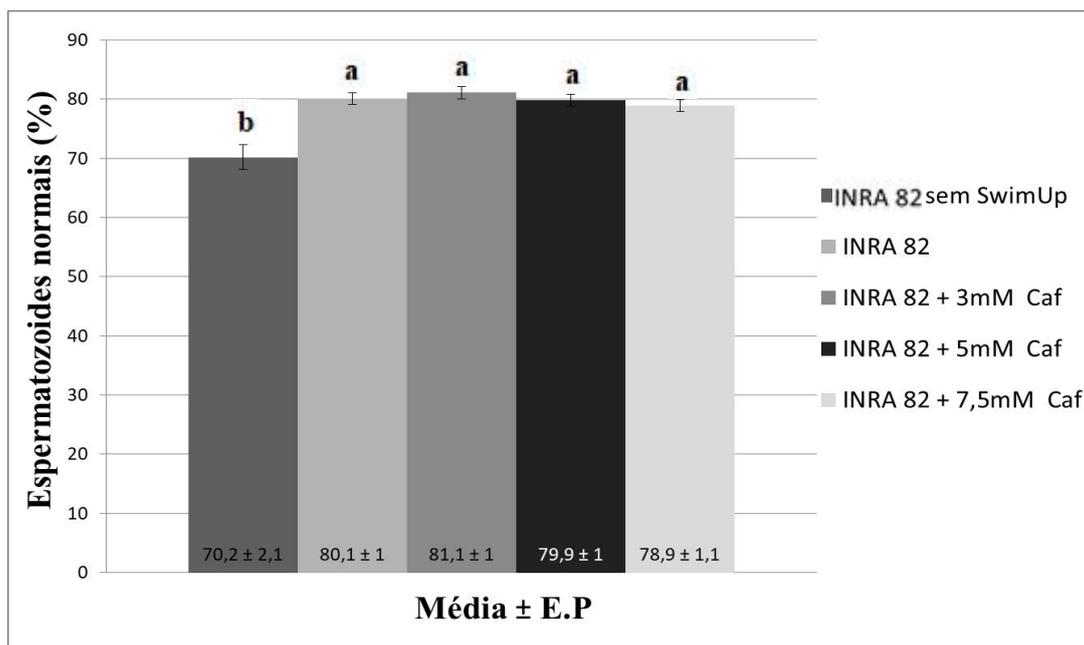


Figura 8. Porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P :erro padrão; ^{ab} valores com letras diferentes diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

Houve redução da porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada pós *swim-up* depois de 20 a 80 min de incubação independente do tratamento (Fig. 9, $P < 0,05$).

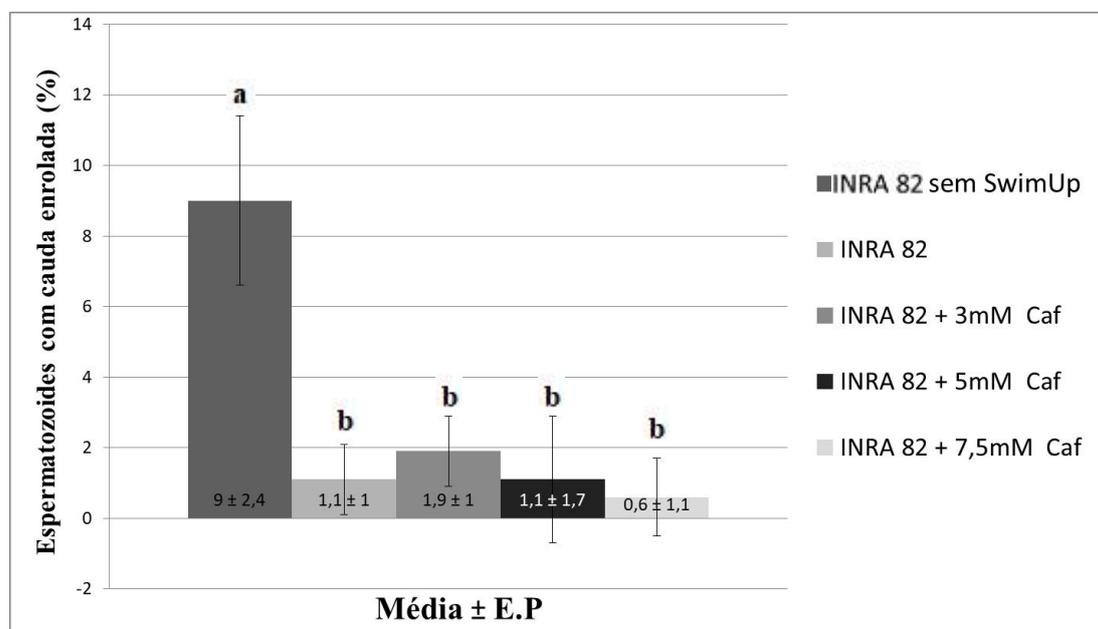


Figura 9. Porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática com swim-up após 20 a

80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; ^{ab} valores com letras diferentes diferiram estatisticamente (P<0,05).

A porcentagem de espermatozoides com defeito de peça intermediária após *swim-up* não sofreu redução comparada ao controle pós-descongelamento (P>0,05), embora 5mM de cafeína tenha aumentado comparado ao *swim-up* sem cafeína (I82, P<0,05). Não houve influência do tempo sobre o percentual de defeitos de peça intermediária avaliado entre os tratamentos (P>0,05, Fig 10).

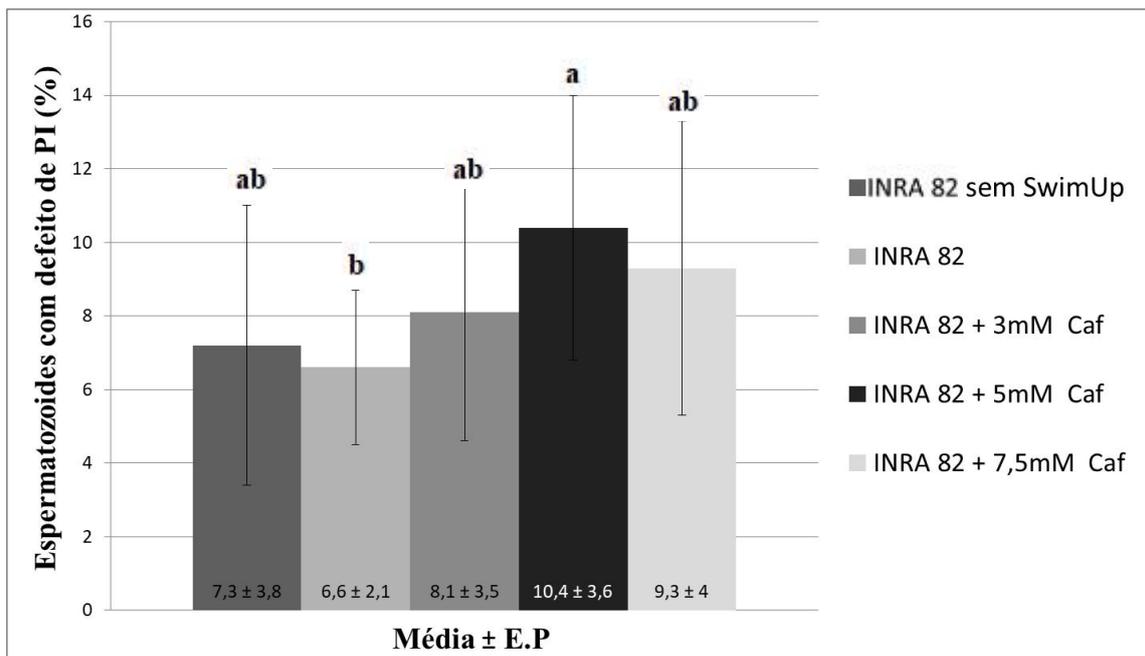


Figura 10. Porcentagem de espermatozoides com defeito de peça intermediária pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; ^{ab} valores com letras diferentes diferiram estatisticamente (P<0,05).

Não houve diferença estatística entre os tempos e tratamentos quanto as porcentagens de espermatozoides com defeito de cabeça (Fig.11), com gota citoplasmática proximal (Fig. 12) e com gota citoplasmática distal (Fig. 13) antes e após o *swim-up* depois de 20 a 80 min de incubação.

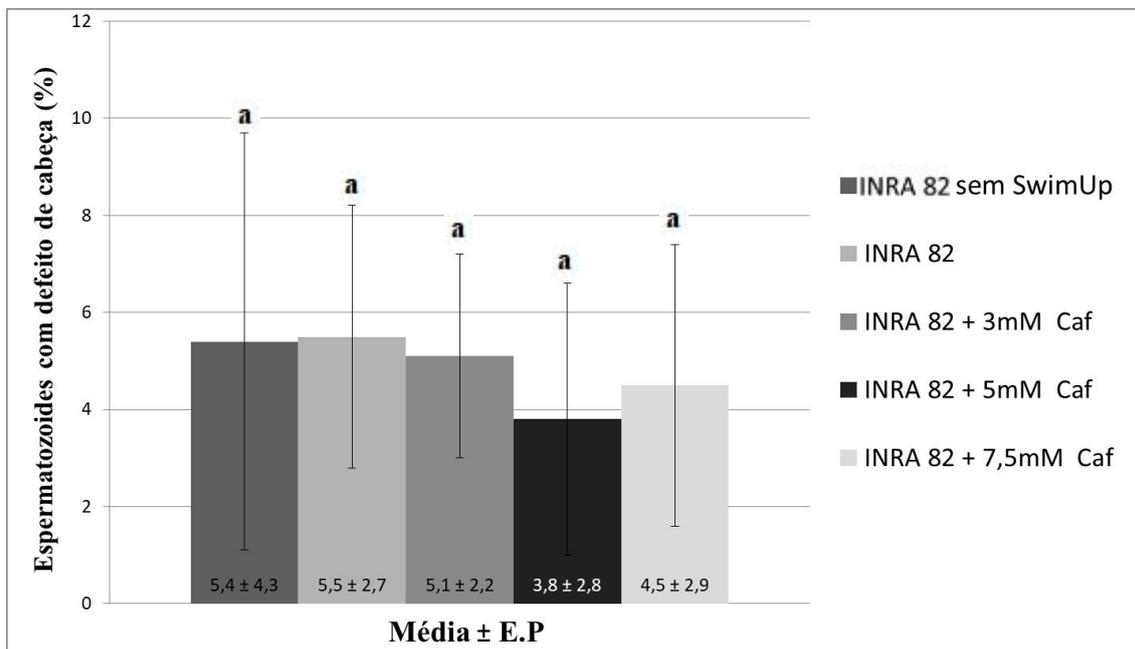


Figura 11. Porcentagem de espermatozoides com defeito de cabeça pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; Valores com letras iguais não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

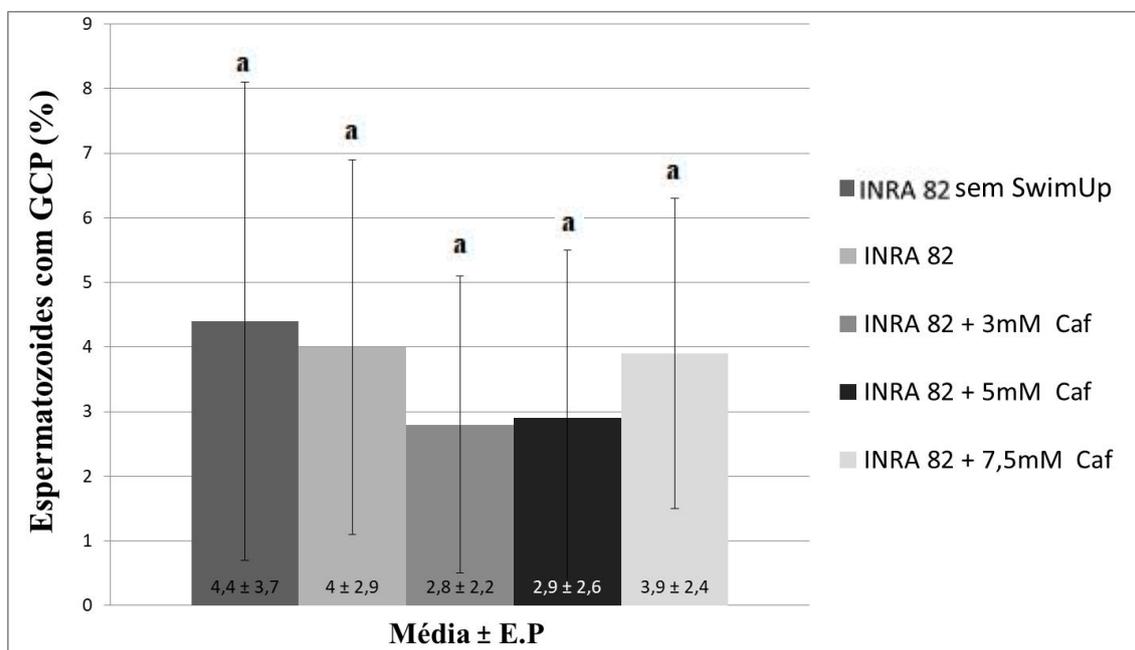


Figura 12. Porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática proximal pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática

pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; GCP: gota citoplasmática proximal. Valores com letras iguais não diferiram estatisticamente ($P>0,05$).

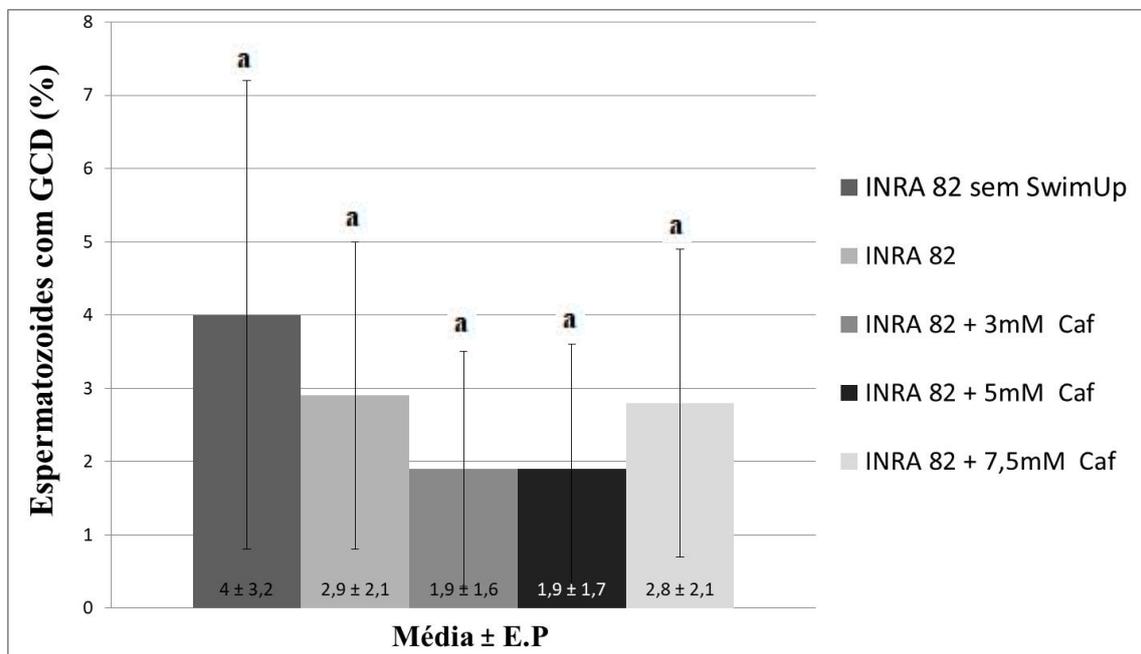


Figura 13. Porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática distal pós-descongelamento e após adição de diferentes concentrações de cafeína com seleção espermática pelo método de swim-up após 20 a 80 min de incubação. Caf: cafeína; E.P: erro padrão; GCD: gota citoplasmática distal. Valores com letras iguais não diferiram estatisticamente ($P>0,05$).

Experimento 3: Avaliação *in vivo* da taxa de fertilidade do sêmen congelado e descongelado sem e com adição de 5mM de cafeína

A taxa de fertilidade *in vivo* do sêmen congelado e descongelado foi maior no grupo de éguas inseminadas com a adição de 5mM de cafeína comparada ao controle ($P<0,05$, Tab. 9).

Tabela 9: taxa de fertilidade de éguas inseminadas (n=16) com semen congelado e descongelado (I82) e após adição de 5mM de cafeína.

	Taxa de prenhez % (prenhes +/-total IA)
I82	12,5 % (1/8) ^b
I82 + 5 mM Cafeína	62,5 % (5/8) ^a
Total	37,5 % (6/16)

I82: INRA 82, ^{abcd} valores com letras diferentes entre linhas diferem estatisticamente ($P>0,05$)

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a adição de 5mM de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento aumentou a motilidade espermática total, a taxa de recuperação de espermatozoides morfológicamente normais após o *swim-up* e a taxa de prenhez *in vivo* após inseminação artificial (IA). É possível que o aumento da motilidade espermática tenha auxiliado na migração espermática para a tuba uterina (Fiala *et al.*, 2010), resultando em aumento da taxa de fertilidade comparada ao grupo controle. O mecanismo de ação da cafeína sobre a motilidade espermática ocorre devido ao efeito inibitório da cafeína sobre a fosfodiesterase que, por sua vez, ajuda na manutenção de uma elevada concentração de AMPc intracelular. O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que atua em múltiplas vias de controle da função flagelar por meio da ativação da tirosina quinase. Esta é responsável pela fosforilação de proteínas localizadas no flagelo, liberando energia necessária para dar início à atividade da dineína ATPase, indutora da movimentação flagelar espermática (Perreault *et al.*, 1982; Vijayaraghavan *et al.*, 1996). Em sêmen de cães e varrões, a adição de cafeína no momento do descongelamento na concentração de 7,5 e 10mM, respectivamente, aumentou a motilidade espermática total (Milani *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2013). Em equino, enquanto a adição de 2mM de cafeína ao sêmen pós-descongelamento não aumentou a motilidade espermática (Stephens *et al.*, 2013), a adição de 5mM de cafeína aumentou a motilidade total comparada ao grupo controle após 120 minutos (Rota *et al.*, 2018), enquanto no presente trabalho até 50 minutos pós descongelamento.

Visto que frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento, no presente trabalho o BCF foi mais alto com a adição de 7,5mM de cafeína comparado ao grupo controle, embora, não tenha diferido de 5mM de cafeína. Este resultado sugere que a adição de 7,5mM de cafeína pode iniciar uma hiperativação espermática, uma vez que a cafeína age aumentando a motilidade espermática (Perreault *et al.*, 1982).

A principal vantagem do *swim-up* é a seleção de células de melhor qualidade. No entanto, o número de espermatozoides recuperados geralmente é baixo, principalmente quando a motilidade inicial da amostra é reduzida (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997). No presente estudo, o aumento da motilidade espermática com a adição de 5mM de cafeína levou ao aumento da recuperação de espermatozoides com morfologia normal pelo *swim-up*. Esse método de seleção se usado com sêmen com alto percentual de defeitos espermáticos, principalmente os defeitos de cauda, pode maximizar o número de espermatozoides normais na dose inseminante. Consequentemente, reduzira a produção de ROS e RNS, visto que espermatozoides anormais aumentam a sua produção (Ball, 2008). Portanto, a adição de 5 mM de cafeína ao sêmen pós-descongelamento é recomendada antes da IA para aumento da taxa de fertilidade equina com sêmen congelado. Além disso é recomendado seu uso no *swim up* para selecionar o espermatozoide a ser usado na injeção intracitoplasmática espermática na produção *in vitro* de embrião equino (ICSI, Galli, 2003).

A cafeína na concentração de 5mM apresentou efeito antioxidante reduzindo a produção de NO₂⁻ devido a sua ação na redução da formação de RNS (Azam *et al.*, 2003). A produção de NO permanece inalterada durante o resfriamento do espermatozoide, no entanto, uma súbita explosão de produção de radicais de NO é observada durante o descongelamento (Meyers, 2012). Presume-se que a redução da concentração de oxidantes pela cafeína seja pela sua habilidade em “sequestrar” OH⁻ e elétrons potencialmente danosos às células. Outra forma de

ação antioxidante da cafeína é via inibição da enzima ciclooxigenase, a qual pertence a um dos sistemas enzimáticos responsáveis pela geração de ROS (Azam *et al.*, 2003). Propriedades antioxidantes da cafeína foram comprovadas em alguns estudos, nos quais ela agiu “sequestrando” o OH⁻ de células do fígado, rim, pulmão, cérebro, e eritrócitos (Kamat e Devasagayam, 2000, Jasiewicz *et al.*, 2016, Ullah *et al.*, 2015). A ação antioxidante da cafeína (1mM) foi observada também no sêmen de carneiro pós-descongelamento ao reduzir a concentração da enzima glutathiona peroxidase e melhorar a capacidade antioxidante (Jenagrad *et al.*, 2018).

Quanto a funcionalidade e viabilidade das membranas espermáticas os resultados do presente experimento corroboraram com o estudo com sêmen de varrões (Yamaguchi *et al.*, 2013), visto que não sofreram influência da cafeína. Neste estudo, após 90 minutos do descongelamento do sêmen de varrões e adição de 10mM de cafeína não foram encontradas diferenças sobre a integridade de membrana plasmática e acrossômica, sugerido que a cafeína não possui efeito sobre as membranas espermáticas. No entanto, uma maior taxa de fertilidade com IA com sêmen congelado foi reportado em marrãs com adição de 10mM de cafeína ao sêmen de varrões.

No presente experimento, a adição de 5mM de cafeína ao sêmen congelado e descongelado de equinos aumentou a taxa de fertilidade em relação ao controle corroborando com o trabalho de Yamaguchi *et al.* (2013). Os autores relataram um aumento da motilidade espermática do sêmen pós-descongelamento, uma menor expressão de leucócitos polimorfonucleares e redução da resposta inflamatória no útero de marrãs inseminadas, o que pode ter favorecido ao aumento da taxa de fertilidade. Durante o congelamento de sêmen equino grande parte do plasma seminal é descartada, induzindo a um aumento da quimiotaxia de neutrófilos pós-IA com sêmen congelado (Katila, 2001). Portanto, a adição de substâncias que atrasem a migração de neutrófilos podem favorecer a uma maior taxa de migração de espermatozoides a tuba uterina antes de serem fagocitados no lúmen do útero.

No presente trabalho, a taxa de fertilidade do grupo controle foi inferior (12,5%) ao relatado para IA com sêmen congelado com o diluidor INRA 82 (25-40%, Vidament *et al.*, 1997). Isso possivelmente foi devido à baixa motilidade espermática da dose inseminante (DI) e consequente número reduzido de espermatozoides moveis/DI (120×10^6 de espermatozoide com MT) comparada ao mínimo recomendável (200×10^6 de espermatozoides com MT, Fleury e Cassoli, 1999). Portanto, no presente estudo, a adição de 5mM de cafeína foi fundamental para aumentar a motilidade espermática e consequente taxa de fertilidade (de 12,5 para 65%). Assim, a adição de 5mM de cafeína ao sêmen equino pós-descongelamento possibilitou o uso de doses inseminantes com número reduzido de espermatozoides moveis e alcançou a fertilidade esperada. Portanto, sua adição ao sêmen de baixa congelabilidade pode ser uma alternativa para aumentar a fertilidade equina.

7. CONCLUSÕES

A adição de 5mM de cafeína ao sêmen equino congelado e descongelado apresentou atividade antioxidante e estimuladora da motilidade espermática levando a um aumento da fertilidade do espermatozoide equino pós-descongelamento. Portanto, adição de 5mM de cafeína antes da IA pode ser sugerida como alternativa para aumentar a taxa de fertilidade de sêmen equino de baixa congelabilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.659-668, 1995.
- AITKEN, R.J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis. *J. Reprod. Fertil. Dev*, v.115, p.1–7, 1999.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, K. *et al.* On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 35, p.541–551, 1996.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS *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.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence of increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*, v. 13, p.232-241, 1992.
- ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.*et al.* Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.*, v. 8, p.338–348, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger. Cap. 80, p. 717-718, 1992.
- 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.
- ASADI N.; BAHMANI M.; KHERADMAND A.; *et al.* The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. *J. Clin. Diagn*, 1-5, 2017.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. *et al.* Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, p.185–192, 1997.
- AZAM, M.; LATEK, R.R.; DALEY, G.Q. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112:831-843, 2003.
- BALABAN, R.S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, v. 120, p. 483–495, 2005.

- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p. 257-267, 2008.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and the Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability, and Mitochondrial Membrane Potential. *J. Androl*, v.22, n.6, p. 1061-1069, 2001.
- BARKAY, J. ZUCKERMAN, H., SKLAN, D., *et al.* Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fertility and Sterility*. 28:175-177, 1997.
- BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B. *et al.* 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.
- BATTELIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J., *et al.* Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.391-410. 1997.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. *et al.* The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, v.21, p.895-902, 2000.
- 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.
- BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fert., Suppl* 23, p.19-24, 1975.
- 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 spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.
- BREITBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction*, n. 4, p. 151-159, 1999.
- BREITBART, H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Cellular and Molecular Biology*, v. 49, n. 3, p. 321-327, 2003.
- CARLSON, A.E.; HILLE, B.; BABCOCK, D.F. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol*, v.312, p.183-192, 2007.

- CARLSON, A.E.; WESTENBROEK, R.E.; QUILL, T. *et al.* CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci*, v.100, p.14864–14868, 2003.
- CHEN, Y.; CANN, M.J.; LITVIN, T.N. *et al.* Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, v. 289, p. 625–628, 2000.
- CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiol*, v. 30, p.421-431, 1993
- CHENG, F-P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F. *et al.* Use of PNA (Peanut Agglutinin) to assess the acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Andr.*, v. 17, p.674-682, 1996.
- CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIET, J.M.; VAN BUITEN, A. *et al.* Ultrastructure of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.*, Mono 1, p.769-777, 1995.
- COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *International Journal Andrology*, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 187-197, 2010.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.R.; VAN BUITEN, A. *et al.* Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta vet. Scand.*, Suppl 88, p.49-58, 1992.
- COMHAIRE, F.H.; HUYSSSE, S.; HINTING, A. *et al.* Objective semen analysis: has the target been reached? *Human Reprod.*, v. 7, p.237-241, 1992.
- CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. *et al.* Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*, v.22, n.1, p. 39-45, 1984.
- 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.; *et al.* Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews*, v.79, n.2, p. 481-510, 1999.
- DAVID, R. J.; MCVICAR, C.M.; MCCLURE, N.; *et al.* Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction in vitro. *Fertil Steril*, New York, v. 87, n. 5, p. 1064–1070, 2007.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. *et al.* Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. reprod.*, v. 2, p.48-54, 1997.

- DODE, M.A.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G; *et al.* The effects of sperm preparation and co-incubation time in vitro fertilization of bos indicus oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 69, p. 15-23, 2002.
- DOMÍNGUEZ, J. C.; GONZÁLEZ, R.; ALEGRE, B.; *et al.* Aditivos seminales em lainseminación artificial de La coneja. Cátedra de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria de La Universidad de León. 2003.
- 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.
- DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl* 32, p.1-8, 1982.
- DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, v. 42, p.136-156, 1966.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Ver*, v. 82, p. 47-95, 2002.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-421, 1990.
- FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.* v.2, p. 90-127, 1970.
- FIALA, S.; CRUZ, L.A; RODRIGUES, R.; *et al.* Sperm cells in the reproductive tract of the mare: *Pferdeheilkunde*. 26, 19-21, 2010
- FLESCHE, 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.
- FLEURY, J. J.; CASSOLI, P. D. Inseminação artificial em equino com baixa dose de sêmen congelado. In: *Arquivos da faculdade de veterinária da universidade federal do rio grande do sul*, 27. Porto Alegre. *Anais Campos do Jordão: SBTE*, p. 223, 1999.
- GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: *Proceedings of a work shop on transporting gametes and embryos*, 12, Brewster – Massachusetts, p. 43-48, 2003.
- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. *et al.* Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.
- GALLI, G.; DUCHI, R.; GROTTI, G.; *et al.* Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p. 599-616, 2003.

- GLOGOWSKI, J.; DANFORTH, D. R.; CIERESZKO, A. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *J Androl*, v. 23, n. 6, p. 783-792, Nov. 2002.
- GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J. *et al.* Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*, v. 17, p. 276–287, 1996.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; MORELLA, F.J.; PEÑA, B. *et al.* 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.
- GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod*, v. 2, p. 147–156, 1997.
- HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole. Cap. 24, p. 513- 535, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.
- HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 108, 2003.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p.3–22, 2000.
- HOU, L. J.; MA, X. H.; YANG, Z. M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, Stoneham, v. 58, n. 7, p. 1349-1360, Oct. 2002
- HUYSER, C.; FOURIE, F. LE-R.; MOOLMAN, H. The influence of sera, follicular fluids and seminal plasma on human sperm–zona pellucida binding. *Hum. Reprod.*, v.12, p.792–799, 1997.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. *Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry*. 1991.
- ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Revisão. Asian J Androl*, v.14, p. 816–821, 2012.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.*, v.57, p.409–416, 1992.

- JASIEWICZ, B.; SIERAKOWSKA, A.; WANDYSZEWSKA, N.; *et al.* Identification of the newly synthesized 8-[(pyrrolidin-1-ylcarbonothioyl) sulfanyl] caffeine as antioxidant and highly potent cytoprotective agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 3994-3998, 2016.
- JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.8, p.129-148, 1992.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; *et al.* Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, p.1241–1252, 1992.
- JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J. Am.Vet. Med. Assoc.*, v.197, p.389-394, 1990.
- JASKO, J. D. Procedures for cooling and freezing equine semen. *Ars. Vet*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- JENAGRAD, P. A.; KKIA, H. D.; EBRAHIMI, M. M. Evaluating caffeine antioxidant properties on Ghezel ram sperm quality after freeze-thawing. *Revue. Méd. Vet.*, 169, 10-12, p 233-240, 2018.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v. 70, p. 219-228, 1984.
- KAMAT, J.P.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Oxidative damage to mitochondria in normal and cancer tissues, and its modulation. *Toxicology*, 155, 73-82, 2000.
- KANWAR, K.C.; YANAGAMASHI, R.; LOPATA, A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 31, p. 321-327, 1979.
- KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta vet. scand.*, v. 42, p.199-217, 2001.
- KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. *et al.* Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proc. 21st Am. Ass. Eq. Pract.*, p.327-349. 1975.
- KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R. *et al.* Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. *Hastings: Journal Society Theriogenology*, v.9, 100p, 1983.
- KNEISSL, S. Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluss der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. (Cryopreservation of stallion semen: The influence of

semen collection techniques, centrifugation, packaging forms, and methods of freezing on the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa). Tese de doutorado. Hannover, 1993.

LAGARES, M. A. Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen (The determination of the osmotic resistance of stallion spermatozoa). Tese de doutorado. Hannover, 1995.

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

LARDY, H. A. *et al.* Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry, Australia*, v. 10, n. 10, p. 1825–1831, 1971

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.

LEWIS, B.; AITKEN, R.J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J. Androl.*,v. 22, p.611–622, 2001.

LI, Z.; LIN, Q.; LIU, R.; *et al.* Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Androl.*, 31, 437-444, 2010.

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.

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.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. *et al.* Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA lactose- egg yolk and packaged in straws. *J Anita Sci*, v. 56, p.687-693, 1983.

LÓPEZ, F. J.; ALVARINO, J. M. R. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 147-154, Feb. 2000

LOUX, S.C.; CRAWFORD, K.R.; ING, N.H. *et al.* CatSper and the Relationship of Hyperactivated Motility to Intracellular Calcium and pH Kinetics in Equine Sperm. *Biol Reprod.* v.89, n.5, p.1-15, 2013.

LOVE, C. C.; LOCH, W. L.; BRISTON, F.; *et al.* Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. *Theriogenology*, v.31, n.3, p.613-622, 1989.

MAGISTRINI, M. Semen evaluation. IN: SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: W. B. Saunders Company. Cap.8, p. 91-108, 2000.

- MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y. *et al.* New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*, v. 48, n.7, p. 1229-1235, 1997.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.*, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, v. 48, p. 523-530, 1997.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J.Reprod. Immunol.*, v.53, p. 109-119, 2002.
- MACPHERSON, M.L.; SHORE, M.D.; FERNANDEZ,M.H.; *et al.* Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. *Havemeyer Foundation Mono Series*, v.6, p.27-29, 2001.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO <http://www.agricultura.gov.br/>, 2016
- MARTINEZ, M. E. C., ARREDONDO J. F. V., SÁENZ, E. O. *et al.* Efecto de la cafeína en la hiperactividad de las células espermáticas en la especie porcina (*sus scrofa*). Trigésimo ciclo de pós-graduação e investigação. *Divisão de Estudos de Pós graduação e Investigação*. 2009.
- MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equi Vet*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.
- 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.
- MEYERS, S.A. Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa. *Proceedings Association for Applied Animal Andrology Conference- Vancouver*, p. 85-100, 2012.
- MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQÜIDOCULTURA, 4, 1986, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo : Sociedade Brasileira de Hipologia, p.33-34, 1986.
- 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
- MILANI, C.; FONTBONNE, A.; SELLEM, E. *et al.* Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2’deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, v.74, p.153-164, 2010.
- MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. *Theriogenology*, v.70, p.463–468, 2008.

- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasmamembrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241–249, 2005.
- MORRIS, L. H. A.; HUNTE, R.H.; ALLEN, W.R. . Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. Fertil*, v.118, p. 95-100, 2000.
- 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.
- NASCIMENTO, A. B. Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática in vitro em suínos. Fortaleza. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará (UECE), 2003.
- 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 again damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. *Cryobiology*. London, New York: Academic press, p. 179-220, 1966.
- NG, F. L., LIU, D. Y., BAKER, H. W. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod*, v. 7, p. 261- 266, 1992.
- 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.
- OKABE, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, v. 140, p.4471-4479, 2013.
- OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; *et al.* Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 118, 194–200, 2010.
- OLSON, G.E.; LINCK, R.W. Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm. *J. Ultrastruct. Res.* v.61, p.21–43, 1977.
- 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.

- ORTGIES, F.; KLEWITZ, J.; GORGENS, A. *et al.* Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Androl.*, v.44, p. 130–138, 2011.
- PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta vet. Scand. Suppl* 88, p.137-152, 1992.
- PARIZ, J.R.; HALLAK, J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods. *Androl.*, 48, 1049-1054, 2016.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- PERREAULT, S.D.; ROGERS, B.J. Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v.38, p.258-260, 1982.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation: Review. *Micron*, v. 37, p. 597–612, 2006.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger. Cap. 83, p. 769-789, 1992.
- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; *et al.* The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl.* 35(2): 109-124, 2012.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. *et al.* Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, v. 65, n. 2, p. 462 – 470, 2001.
- REN, D.; NAVARRO, B.; PEREZ, G. *et al.* A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, v. 413, p.603–609, 2001.
- REES, J. M.; FORD, W. C. L.; HULL, M. G. R. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 90, n. 1, p. 147-156, Jan. 1990.
- RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J. *et al.* 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. *et al.* 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.
- RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 9, p. 297- 308, 1997.

- ROVAN, E. Biochemistry of spermatozoa. In: BUSCH, W., HOLZMANN, A. Veterinary Medicine Andrology, Physiology and Pathology of Reproduction in Male Animals. Stuttgart: Schattauer, p. 23–54, 2001.
- ROTA, A; SABATINI, C.; PRZYBYT, A. *et al.* Post-thaw Addition of Caffeine and/or Pentoxifylline Affect Differently Motility Characteristics of Horse and Donkey Cryopreserved Spermatozoa. Journal of equine veterinary Science, v66, p.85-86, 2018.
- SABEUR, K.; BALL, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. Reproduction, v. 134, p.263–270, 2007.
- SABEUR, K.; BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. Am. J. Vet. Res., v. 67, p.701–706, 2006.
- SALDANHA, L. A. Efeitos da ingestão de cafeína, café (*Coffea arábica*) e chá mate (*Ilexparaguariensis*) sobre a atividade lipolítica do tecido adiposo e parâmetros metabólicos em ratos submetidos ao exercício físico. Tese (Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública (USP), 2012.
- SAMPAIO, I. B. M. Testes estatísticos para comparação de médias. In: Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, Cap. 17. p. 189-207, 2002.
- SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. In: Proceedings of the 43rd Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract., p. 41–43, 1997
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. Reprod Fertil Dev, v. 9, p.689-696, 1997.
- 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.
- SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. Nature, v.166, p. 668–669, 1950.
- STEPHENS, T. D.; BROOKS, R.M; CARRINGTON, J.L.; *et al.* Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on postthaw motility and longevity of equine frozen semen. Journal of Equine Veterinary Science, New York, v. 33, n. 8, 615-621, Aug. 2013.
- SUAREZ, S.S. Control of hyperactivation in sperm. Hum Reprod Update, v. 14, p.647–657, 2008.

- SULLIVAN, J.J., TURNER, P.C.; SELF, L.C. *et al.* Survey of reproductive efficiency in the quarter horse and thoroughbred. *J Reprod Fertil, Supl.*23, p.315-318, 1975.
- TASH J.S.; MANN F.R.S. Adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 184, 109-114, 1973.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A., BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p.1531–1550, 2006.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; *et al.* The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod.Scien.*, v.89, p. 159-170, 2005.
- TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 18, p. 25–38, 2006.
- ULLAH, F.; ALI, T.; ULLAH, N.; *et al.* Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochem. Int.* 90, 114-124, 2015.
- VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am. J.Vet.Res.*, v. 52, p. 224-230, 1991.
- VASCONCELOS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTORO, M. M.; *et al.* Addition of Serine protease inhibitors on equine sperm extender during cooling and freezing. *Pferdeheilkunde* 26, 2010.]
- VERNET, P.; FULTON, N.; WALLACE, C. *et al.* Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1102–1113, 2001.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, M.; JULIENNE, P. *et al.* Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology.*, v.48, n. 6, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. *et al.* 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.
- VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K. *et al.* Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biology of Reproduction*, v.54, p.709-718, 1996.
- VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.178, p.287-289, 1981.
- VOSS, J.L. Breeding Efficiency. In: MCKINNOW, A.O., VOSS, J.L. *Equine reproduction*. Philadelphia : Lea & Febiger, p. 1114, 1993.

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.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrosomal integrity of stallion sperm prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 33, n.3, p. 320-329, 1996.

YAMAGUCHI S.; SUZUKI C.; NOGUCHI M.; *et al.* Effects of caffeine on sperm characteristics after thawing and inflammatory response in the uterus after artificial insemination with frozen-thawed boar semen. *Theriogenology*. 79:87–93, 2013.

YASHIN A.; YASHIN Y.; WANG J.Y.; *et al.* Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants*, 2, 230-245, 2013.

ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Androl.*, v. 32, n.9, p. 335-343, 2000.

9. ANEXOS

Anexo 1

MEIOS DILUIDORES

Meio de Kenney (Kenney *et al.*, 1975)

Componentes	Quantidade (100 mL)
Glicose	4,9g
Leite em Pó (desnatado)	2,4g
Sulfato de Gentamicina	100mg
Bicarbonato de sódio 8,4%	1,6mL
pH	6,8
Osmolaridade	392 mOsm

Meio INRA 82 para congelamento de sêmen equino (Vidament *et al.*, 1997)

Componentes	Quantidade (100mL)
Leite desnatado em pó	5g
Glicose	2,5g
Lactose	0,15g
Rafinose	0,15g
Citrato de Sódio	0,025
Citrato de Potássio	0,041g
Hepes	0,476g
Gema de ovo	2 ml (2%)
Glicerol	2,5 ml (2,5 %)
Sulfato de gentamicina	5 mg
Penicilina G	5.000 UI
pH	6,64

Anexo 2

FICHA DO EXPERIMENTO

PROTOCOLO PARA SÊMEN EQUINO CONGELADO

Garanhão: _____ Data: ___/___/___ Hora: _____ N° do Ejac.: _____
Idade: _____

Exame do sêmen fresco

Volume: _____ mL Aspecto: leitoso aquoso soroso cremoso
Motilidade Total: _____ Motilidade Progressiva: _____ Vigor: _____
Concentração: _____ sptz/mL N° total sptz: _____ sptz/ejaculado
Centrifugação: Diluído 1:1 Kenney 400g/10min Deixar 10% do plasma seminal
Espaço para cálculo:

Resfriamento: _____ min até 5°C 20 min no vapor de N₂ N₂ líquido
Caneco: _____
Teste hiposmótico: Íntegros: _____ Lesados: _____

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Garanhão: _____ Data: ___/___/___

Avaliação morfológica (%): (Técnica: preparação úmida)	
Total de espermatozoides normais:	
Defeito de Acrossoma	
Defeito de Cabeça	
Defeito de peça intermediária	
Gota citoplasmática proximal	
Gota citoplasmática distal	
Cauda dobrada	
Defeito de inserção	
Formas teratológicas	
Total de defeitos	

Anexo 3

AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE ESPERMATOZÓIDES COM REAÇÃO ACROSSÔMICA ESPONTÂNEA E MEMBRANA ÍNTEGRA COM OS CORANTES ISOTICIANATO DE FLUORESCÉINA- *PEANUT AGGLUTININ* (PNA-FITC) E IODETO DE PROPÍDEO (PI) COM CITOMETRIA DE FLUXO

- a) Solução estoque PNA-FITC: 1500µg/mL
 - b) Solução trabalho: 100µL da solução estoque + 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (75µg/mL)
 - c) Solução trabalho PI: 0,5mg de PI + 1mL de solução salina (0,9% NaCl)
- Diluir a amostra de sêmen na proporção 1:20 em PBS a 37°C.
 - Misturar 200µL da suspensão acima + 15µL da solução trabalho de FITC-PNA (Concentração final 1,125µg/mL)
 - Incubar 10 min a 37°C em banho maria
 - Adicionar 1mL PBS + 15µL PI (solução trabalho 1,5mM) e incubar por mais 10 min em temperatura ambiente
 - Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

Anexo 4

PROTOCOLO DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA PELO MÉTODO SWIM-UP *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDE EQUINO CONGELADO/DESCONGELADO

1. Descongelar 2 palhetas de sêmen a 37°C por 30 seg.
2. Colocar 150 µL de meio TCM 199 com sais de Hanks e 10% de soro fetal bovino em tubos cônicos de 1,5mL.
3. Adicionar 50 µL de sêmen no fundo de cada tubo e incubar por 20, 40, 60 e 80 min a um ângulo de 30° e 37°.
4. Retirar aproximadamente 1/3 do sobrenadante e colocar em tubo cônico.
5. Calcular a concentração esp/mL com um hemocitômetro e microscopia de campo claro.
6. Analisar morfologia espermática sob microscopia de contraste de fase (1000x).