



BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E
CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO**

LAVRAS-MG

2014

BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO
RESFRIADO**

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

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientadores

Dr. Luis David Solis Murgas

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS-MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Pereira, Bárbara Azevedo.

Adição de ácido clorogênico e cafeína ao sêmen suíno resfriado /
Bárbara Azevedo Pereira. – Lavras : UFLA, 2014.
106 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.
Bibliografia.

1. Antioxidante. 2. Ativador metabólico. 3. Espécies reativas ao
oxigênio. 4. Inibidor de fosfodiesterase. 5. Varrão. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.408245

BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA

**ADIÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO
RESFRIADO**

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

APROVADA em 13 de agosto de 2014.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dra. Valeria Vânia Rodrigues UNIFENAS

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

LAVRAS-MG

2014

*Vocês são a minha força, o meu norte
Sem vocês nada disso teria sentido
Tudo que faço é para vocês
Amor maior não existe!*

Papai e Mamãe

A vocês, ofereço e dedico

AGRADECIMENTOS

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

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

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amados pais, Tânia Maria de Azevedo Pereira e Paulo Roberto Pereira, pela dedicação, apoio, exemplo e amor incondicionais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pelos cinco anos de orientação, oportunidades, amizade e confiança.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, por sempre estar ao meu lado, apoiando-me e auxiliando-me na condução dos trabalhos.

À Profa. Dra. Valeria Vânia Rodrigues, pela disponibilidade e contribuições.

Aos amigos do GETESE pela companhia, amizade, apoio, compreensão, e por todos os momentos que passamos juntos. Sem vocês, este trabalho não teria se concretizado.

Ao Lucas Cota Torres por ser meu porto seguro e pela amizade, amor e companheirismo. Você sempre esteve ao meu lado!

Aos meus anjos da guarda e melhores amigos/irmãos Eloiza Lanferdini, Mariele Cristina Teles e Luiz Gustavo Pessoa Rocha. Não sei o que seria da minha vida sem vocês.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

*A suprema arte do professor é despertar a
alegria na expressão criativa do conhecimento,
dar liberdade para que cada estudante
desenvolva sua forma de pensar e entender o
mundo, assim criamos pensadores, cientistas e
artistas que expressarão em seus trabalhos
aquilo que aprenderam com seus mestres.*

(Albert Einstein)

RESUMO GERAL

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de verificar o efeito da do ácido clorogênico associado ou não à cafeína sobre a qualidade do sêmen de suíno resfriado. O experimento I foi conduzido para avaliar o efeito isolado do ácido clorogênico na qualidade seminal, ao passo que no experimento II avaliou o uso dessa substância associada ou não à cafeína. Doze ejaculados foram utilizados em cada experimento. No experimento I, diferentes concentrações de ácido clorogênico (0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 mg/mL) foram adicionadas às doses inseminantes, testadas e comparadas a 200 µg/ml de vitamina E. Avaliações seminais foram realizadas antes e após 24 e 72 horas de armazenamento a 15°C. O ácido clorogênico aumentou a motilidade e a viabilidade espermática, a integridade de acrossoma e a quantidade de mitocôndrias com atividade máxima durante o armazenamento. Comparado à vitamina E, o ácido clorogênico mostrou-se superior em relação à viabilidade espermática, integridade acrossomal e mitocôndrias ativas. Esse ácido também reduziu a concentração de dialdeidomalônico (MDA), às 72 horas de armazenamento. Dessa forma, conclui-se que a adição de ácido clorogênico, durante o processamento das doses melhora a qualidade seminal do sêmen suíno armazenado por até 72 horas a 15°C. No experimento II, seguiu-se o mesmo protocolo de avaliação do sêmen utilizado no experimento anterior, sendo testada a melhor dose de ácido clorogênico (4,5 mg/ml), associada ou não de cafeína a 8,0 mM adicionados no momento da avaliação. O ácido clorogênico melhorou a integridade de acrossoma e a atividade mitocondrial. A cafeína também melhorou a atividade mitocondrial, mas reduziu a viabilidade. Com 24 horas, houve interação entre o ácido clorogênico e cafeína para a viabilidade, acrossoma e atividade mitocondrial, sendo o uso associado dessas substâncias o melhor tratamento. Às 72 horas de armazenamento, houve interação positiva entre a cafeína e o ácido clorogênico na motilidade e viabilidade, melhorando-os. Sem a adição de ácido clorogênico a cafeína reduz a motilidade e viabilidade espermática. As doses suplementadas com ácido clorogênico apresentaram menores perdas de motilidade com a incubação. O ácido clorogênico não interferiu no vigor espermático, mas as doses que receberam cafeína apresentaram redução desse parâmetro durante a incubação. O uso isolado da cafeína aumentou a quantidade de MDA no plasma seminal, ao passo que o ácido clorogênico reduziu a concentração desse produto. Portanto, a adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico, durante o processamento de doses inseminantes de suínos, associado ao uso de cafeína a 8 mM, durante o reaquecimento seminal, melhora a qualidade seminal do sêmen suíno armazenado por até 72 horas a 15°C.

Palavras-chave: Antioxidante. Ativador metabólico. Espécies reativas de oxigênio. Espermatozoide. Inibidor de fosfodiesterase. Varrão.

ABSTRACT

Two experiments were conducted with the objective of verifying the effect of the chlorogenic acid, associated or not to caffeine, over the quality of cooled swine semen. The experiment I was conducted to evaluate the isolated effect of the chlorogenic acid over the quality of semen, while experiment II evaluated the use of this substance associated or not to caffeine. Twelve ejaculated were used in each experiment. In experiment I, different concentrations of chlorogenic acid (0.0; 1.5; 3.0; 4.5 and 6.0 mg/mL) were added to the inseminating doses, tested and compared to 200 µg/mL of vitamin E. Seminal evaluations were performed before and after 24 and 72 hours of storage in 15°C. The chlorogenic acid increased motility and sperm viability, the integrity of the acrosome and the quantity of mitochondria with maximum activity during storage. Compared to the vitamin E, the chlorogenic acid showed to be superior concerning spermatoc viability, acrosome integrity and active mitochondria. This acid also reduced the concentration of malondialdehyde (MDA), at 72 hours of storage. Thus, it is concluded that the addition of chlorogenic acid during the processing of the doses improves seminal quality of swine semen stored for up to 72 hours at 15°C. In experiment II, the same semen evaluation protocol of the previous experiment was followed testing the best dose of chlorogenic acid (4.5 mg/mL) associated or not to caffeine at 8.0 mM, added at the time of evaluation. The chlorogenic acid improved acrosome integrity and mitochondrial activity. The caffeine also improved mitochondrial activity, but reduced viability. With 24 hours, there was interaction between the chlorogenic acid and the caffeine for viability, acrosome and mitochondrial activity, with the associated use of these substances being the best treatment. At 72 hours of storage, there was positive interaction between the caffeine and the chlorogenic acid on motility and viability, improving both. Without the addition of chlorogenic acid, the caffeine reduces motility and sperm viability. The doses supplemented with chlorogenic acid presented lower losses of motility with incubation. The chlorogenic acid did not interfere with spermatoc vigor, but the doses that received caffeine presented reduction of this parameter during incubation. The isolated use of caffeine increased the quantity of MDA in the seminal plasma, while the chlorogenic acid reduced the concentration of this product. Therefore, the addition of 4.5 mg/mL of chlorogenic acid during the processing of swine inseminating doses, associated or not to the use of caffeine at 8 mM during seminal reheating, improves the seminal quality of swine semen stored for up to 72 hours at 15°C.

Keywords: Antioxidant. Metabolic activator. Oxygen reactive species. Spermatozoa. Phosphodiesterase inhibitor. Boar.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Representação esquemática da via de sinalização da motilidade associada ao AMPc (sAC – Adenilato ciclase solúvel; AKAP - Proteína ancoradora de proteína quinase A).....21
- Figura 2 Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico e do ácido 5-cafeoilquínico.....26
- Figura 3 Estrutura química da cafeína30

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade e integridade de acrossoma do sêmen suíno diluído e avaliado em diferentes tempos de incubação a 37° C..... 64
- Figura 2 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade espermática, integridade de acrossoma e viabilidade do sêmen suíno diluído e armazenado por 24 horas a 15 °C. 65
- Figura 3 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade, viabilidade espermática e integridade de acrossoma do sêmen suíno diluído e armazenado por 72 horas a 15 °C..... 66
- Figura 4 – Efeito do ácido clorogênico sobre a capacidade antioxidante (Trolox equivalente) e concentração de dialdeidomalônico (MDA) no sêmen suíno diluído antes e após 72 horas de armazenamento a 15 °C.....67

ARTIGO 2

- Figura 1 – Taxa de degradação da motilidade do sêmen suíno adicionado de cafeína (C) ou ácido clorogênico (AC) após diferentes tempos de armazenamento. Colunas seguidas de letras diferentes dentro do tempo diferem pelo teste de Friedman ($P < 0,05$)94
- Figura 2 – Consumo de glicose (mg/dL) antes e depois de 72 horas de armazenamento após adição de cafeína (C) e ácido clorogênico.(AC). Colunas seguidas de letras iguais dentro do tempo não diferem pelo teste de Friedman ($P < 0,05$)95

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Tabela 1 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído e incubado a 37° C (n=12).....61
- Tabela 2 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído armazenado por 24 horas a 15° C e incubado a 37° C (n=12).....62
- Tabela 3 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído armazenado por 72 horas a 15° C e incubado a 35° C (n=12).....63

ARTIGO 2

- Tabela 1 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.91
- Tabela 2 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 35 °C.92
- Tabela 3 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 35 °C.93

Tabela 4 – Vigor espermático de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico, avaliado após diferentes tempos de armazenamento e em diferentes tempos de incubação a 35 °C.....	94
Tabela 5 – Peroxidação lipídica do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico em diferentes tempos de armazenamento.	95

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 14
2	REFERENCIAL TEÓRICO 16
2.1	Inseminação artificial na suinocultura 16
2.2	Regulação do metabolismo espermático 18
2.3	Espécies reativas de oxigênio (ERO) e função espermática 22
2.4	Ácido Clorogênico 26
2.5	Cafeína 29
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 32
	REFERÊNCIAS 33
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 42	
	ARTIGO 1 Qualidade do sêmen suíno resfriado adicionado de ácido clorogênico 42
	ARTIGO 2 Ácido clorogênico e cafeína na qualidade do sêmen suíno armazenado a 15°C 68

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A Suinocultura é uma das atividades pecuárias mais praticadas no mundo, produziu 107.514 milhões de toneladas de carne suína em 2013 (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS, 2014). Segundo essa mesma fonte, a demanda por esse produto de origem animal tem perspectivas de ascensão, em razão, principalmente, do crescimento populacional.

Com o passar dos anos, a criação de suínos se tornou mais tecnicizada e industrializada, em decorrência dos avanços nas áreas de nutrição, genética sanidade e reprodução, sendo esse último considerado a base do sistema produtivo. Por essa razão, há sempre a necessidade de se buscar novas tecnologias para melhor aproveitar o potencial genético dos reprodutores.

A biotecnologia reprodutiva mais difundida na suinocultura é a inseminação artificial (IA), que consiste em uma técnica considerada, relativamente, simples pela qual se deposita o sêmen no trato reprodutor da fêmea por meio instrumental. A maior vantagem é o melhor aproveitamento dos ejaculados, com conseqüente redução na proporção de machos, em relação às fêmeas, além de garantir melhor controle sanitário e qualidade do sêmen. Entretanto, a principal limitação do uso dessa técnica consiste na dificuldade de preservação das doses inseminantes, a qual se restringe a três ou cinco dias, dependendo do diluidor utilizado. Nesse caso, metodologias que possibilitem maior tempo de armazenamento das doses seminais permitiriam melhor difusão do material genético entre centrais de inseminações e as granjas, além de melhorar o aproveitamento dos machos, reduzindo, assim, os custos com manutenção e alojamento desses animais.

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo conduzidos para assegurar melhores taxas de fertilidade do sêmen armazenado por período superior. Com o passar do tempo, a redução da qualidade das doses inseminantes ocorre, principalmente, porque as temperaturas de estocagem não interrompem, totalmente, o metabolismo dos espermatozoides, que continuam produzindo metabólitos os quais se acumulam e interferem na estrutura espermática. Nesse caso, a adição de substâncias protetoras e moduladoras da função espermática aos diluentes seminais poderia auxiliar na manutenção da qualidade seminal durante períodos maiores de armazenamento. Dentre estas substâncias, pode-se citar o ácido clorogênico, um polifenol com característica antioxidante e de proteção à peroxidação lipídica e a cafeína, uma substância com capacidade de estimular o metabolismo celular durante o reaquecimento das doses inseminantes.

Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de ácido clorogênico, durante o processamento das doses inseminantes e cafeína, durante o reaquecimento do sêmen suíno resfriado a 15 °C

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inseminação artificial na suinocultura

A Inseminação Artificial (IA) consiste na deposição do sêmen por meios instrumentais no trato reprodutivo da fêmea, sendo considerada uma biotecnologia que contribui, significativamente, para a melhoria dos índices reprodutivos e consequente aumento da produtividade. A suinocultura tecnificada cada vez mais utiliza a IA como componente do manejo reprodutivo, em virtude, principalmente, do surgimento de linhagens genéticas de machos terminais que agregam às carcaças de seus descendentes as qualidades exigidas pela tipificação instituída na indústria de carnes (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005).

O uso da IA na produção de suínos iniciou-se na década de 30 na Rússia e Japão e sua utilização tomou uma proporção maior, a partir dos anos 70 e 80, vindo a se consolidar nos anos 90. Mais especificamente no Brasil, a IA na suinocultura desenvolveu-se somente a partir de 1975, quando houve a criação de centrais de inseminação na Região Sul do país. Em 1990, apenas 2% das fêmeas alojadas eram inseminadas no Brasil, porém, atualmente, esse porcentual chega a 70%, colocando o país em primeiro lugar na América Latina em número de fêmeas inseminadas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS, 2011). Riesenbeck (2011) ressalta, ainda, o crescimento dessa tecnologia em diversos países na última década, destacando o crescimento de 450% no Brasil.

Na indústria suinícola, mais de 99% das inseminações são feitas com sêmen diluído em meio líquido e, geralmente, armazenado entre 15 e 20 °C por até três dias (ROCA et al., 2006) e o protocolo de IA envolve a deposição intracervical de, aproximadamente, $3,0 \times 10^9$ espermatozoides em doses de 80 a

100 ml, duas a três vezes durante o estro (JOHNSON et al., 2000). Na monta natural (MN), o volume seminal gira em torno de 300 ml com deposição de 50 a 70 x 10⁹ espermatozoides. Portanto, a utilização da IA permite melhor aproveitamento do ejaculado.

Baseado nessas constatações, uma das principais vantagens da IA é permitir a diminuição da proporção de machos, em relação ao plantel de fêmeas, já que na MN são necessários 5% de machos, enquanto na IA essa proporção é, consideravelmente, reduzida para 0,5 a 1% (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005). Essa otimização dos machos permite maior difusão de genes melhoradores e aumento nas possibilidades de cruzamento, permitindo um avanço considerável na genética dos animais destinados ao abate (RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). Além disso, a produção de doses inseminantes permite melhor controle sanitário das coberturas e dos ejaculados que, por sua vez, facilita a implementação das medidas de higiene. Outro aspecto importante é que os parâmetros reprodutivos podem ser iguais ou superiores aos obtidos com o acasalamento natural (BAILEY et al., 2008).

Mesmo com inúmeras vantagens, a utilização da IA está limitada por fatores como o curto tempo de armazenamento da dose inseminante, já que o sêmen suíno na preservação líquida apresenta significativa perda de sua capacidade fertilizante no decorrer do tempo (FRYDRYCHOVÁ et al., 2010). Além disso, outros fatores relacionados à logística, como o transporte das doses entre a central produtora e a granja, nos casos de centrais abertas e a necessidade de uma estrutura laboratorial mínima na granja (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005), também, limitam o uso da IA.

O ponto crítico para a aplicação da IA com sêmen fresco diluído é a habilidade de manter essas células viáveis, durante a refrigeração (GERRITS et al., 2005), já que a temperaturas entre 15 e 18 °C não interrompem, totalmente, o metabolismo dos espermatozoides, permitindo que tais células continuem

produzindo metabólitos, os quais se acumulam e interferem na qualidade espermática (HOU; MA; YANG, 2002). Conseqüentemente, quanto maior for o tempo de armazenamento do sêmen, menor será a sua fertilidade.

Nos últimos anos, pesquisas com diluidores têm sido desenvolvidas, objetivando melhor qualidade das doses inseminantes armazenadas por maior tempo. A maioria dos diluidores, no entanto, permite o armazenamento do sêmen por no máximo 72 horas após o processamento das doses. Para conservar a qualidade espermática, diluidores de sêmen devem garantir aos espermatozoides boa fonte de energia, pH adequado e uma pressão osmótica ideal, além de prevenir o choque térmico e a peroxidação das membranas e inibir o crescimento microbiano que, também, pode interferir na qualidade do sêmen (VYT et al., 2004).

2.2 Regulação do metabolismo espermático

Nos últimos anos uma crescente quantidade de informações sobre o mecanismo pelo qual o espermatozoide suíno gerencia o nível energético intracelular foi publicada (KAMP et al., 2003; MARIN et al., 2003; MEDRANO et al., 2006a; BUCCI et al., 2011). Compreender o metabolismo energético celular é importante para entender os mecanismos envolvidos na adaptação do espermatozoide às condições externas que, muitas vezes, são consideradas agressivas (MEDRANO et al., 2006a). Do ponto de vista prático, as informações sobre os mecanismos de gestão de energia são fundamentais para o desenvolvimento de protocolos que propiciam o aprimoramento da técnica de conservação espermática, desencadeando grande impacto na IA.

A manutenção das funções espermáticas depende do consumo de substratos energéticos, obtidos com base no plasma seminal, sendo a via glicolítica e a fosforilação oxidativa importantes vias metabólicas de utilização

desses substratos. O espermatozoide suíno tem a capacidade de metabolizar, eficientemente, os açúcares como a glicose (MARIN et al., 2003) e a frutose (JONES; CONNOR, 2000), além do lactato e do citrato (MEDRANO et al., 2006b), piruvato (JONES, 1997) e glicerol (JONES; CHANTRILL; COKINAKIS, 1992), para a obtenção de energia. As diferenças de concentrações desses substratos no plasma seminal, ao longo do tempo, podem ser indicativas do metabolismo energético dos espermatozoides (SELVARAJU et al., 2009; SILVA et al., 2012). A capacidade dessas células em utilizar fontes alternativas de energia permite que se aumente o tempo de sobrevivência celular em situação de baixa disponibilidade de hexoses (MEDRANO et al., 2006b)

Apesar de o espermatozoide ser capaz de captar várias fontes energéticas, as vias metabólicas pelas quais essas fontes serão utilizadas é dependente do substrato. A glicose é o monossacarídeo mais rapidamente consumido por meio da glicólise e produz maior quantidade de energia em um determinado tempo quando comparado com outros açúcares, como frutose, sorbitol e manose, já que a hexoquinase do espermatozoide suíno é mais eficaz em fosforilar a glicose do que esses outros substratos (MEDRANO et al., 2004).

A célula espermática do suíno apresenta como principais vias catabólicas, para obtenção de energia, a conversão de glicose ou frutose à lactato (glicólise anaeróbica) e, se houver oxigênio disponível, a oxidação do lactato em CO_2 e H_2O (KAMP et al., 2003). O equilíbrio entre essas duas vias metabólicas depende de inúmeros fatores, tais como a pressão de O_2 e o pH do meio de conservação e dos níveis intracelulares de ATP (RODRIGUEZ-GIL, 2006).

A relação entre a metabolização de carboidratos pela glicólise ou pelo ciclo de Krebs é dependente da espécie, mas existe um consenso geral sobre o fato de que, praticamente, todos os espermatozoides de mamíferos apresentam elevada atividade glicolítica. A célula espermática do suíno, por exemplo, apresenta maior atividade da via glicolítica, pois mais de 95% de adenosina

trifosfato (ATP), produzidas por essas células, têm origem nessa via de fosforilação (MARÍN et al., 2003). No entanto, mesmo que a energia obtida baseada no ciclo de Krebs seja pequena, esta é absolutamente necessária para manter a motilidade e para a capacitação espermática na espécie suína (ALBARRACIN et al., 2004; RAMIÓ-LLUCH et al., 2013).

A célula espermática requer uma produção permanente de ATP para manter a estrutura celular, a composição iônica intracelular e a motilidade. A motilidade espermática, assim como o processo de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal, são regulados pelas vias de sinalização da adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a qual é dependente de energia (DARSZON et al., 1999). O AMPc é um segundo 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 dessa substância (SIMPSON; WHITE, 1987).

A motilidade espermática ocorre em razão da atividade motora de proteínas axonemais localizadas no flagelo, as quais são ativadas por tirosina quisases. Esse processo é dependente de AMPc que ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA, por sua vez, atua em múltiplas vias de controle de a função flagelar baseada na ativação de vias de tirosina quinase, as quais serão responsáveis pela fosforilação de proteínas localizadas no flagelo, resultando na motilidade (LECLERC; LAMIRANDE; GAGNON, 1996) (Figura 3). O AMPc é o segundo mensageiro da via da Proteína G / adenilato ciclase e essa enzima é responsável pela conversão de ATP em AMPc. Portanto, quaisquer substâncias que estimulem a adenilato ciclase, como o bicarbonato, resultará no aumento dos níveis de AMPc (GADELLA; VAN GESTEL, 2004).

Já, a capacitação espermática compreende uma série de modificações estruturais e funcionais do espermatozoide a fim de torná-lo apto para a fecundação. O mecanismo de ação do AMPc sobre a capacitação espermática é muito semelhante às vias de ativação da motilidade. Nesse processo, a PKA ativada pelo AMPc induz à fosforilação de resíduos de tirosina de tirosinas quinases que agirão sobre proteínas da membrana plasmática relacionadas com a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, tornando-as ativadas (Figura 1) (GADELLA; VAN GESTEL, 2004). Além disso, esse segundo mensageiro está envolvido na remoção do colesterol da membrana plasmática (VISCONTI et al., 1999), sendo esse processo necessário para desencadear desestabilização da bicamada lipídica e, conseqüentemente, fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, dando início à reação acrossômica (BAZER; GEISERT; ZAVY, 1995).

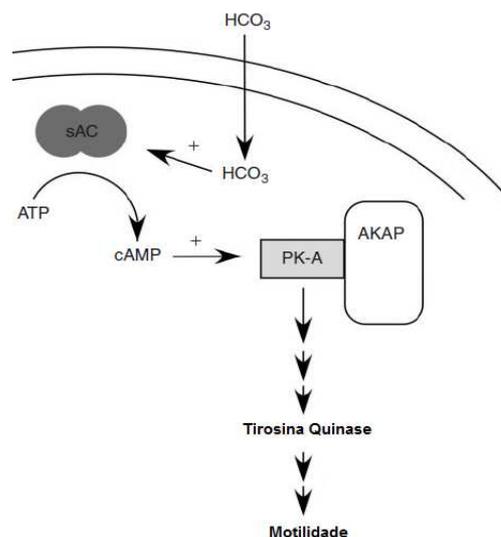


Figura 1 Representação esquemática da via de sinalização da motilidade associada ao AMPc (sAC – Adenilato ciclase solúvel; AKAP - Proteína ancoradora de proteína quinase A)

Fonte: Adaptado de Turner (2006).

Portanto, o conhecimento das rotas metabólicas que estão envolvidos na regulação da funcionalidade espermática permite o desenvolvimento de protocolos que modulem as respostas celulares, durante o armazenamento seminal, de forma a melhorar a qualidade do sêmen armazenado. Desta forma, o uso de substâncias que influenciem essas rotas metabólicas, durante os períodos que antecedem o uso de doses inseminantes, pode ser importante para melhorar a qualidade do sêmen utilizado em programas de inseminação artificial.

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO) e função espermática

Durante o metabolismo oxidativo celular ocorre a formação de ERO, que são intermediários químicos reativos, oriundos do metabolismo do oxigênio, podendo conter um ou mais elétrons desemparelhados (KEFER; AGARWAL; SABANEH, 2009). Em uma célula saudável, 1 a 2% do oxigênio são convertidos em algum intermediário reativo, os quais podem ser o ânion superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), óxido nítrico (NO^{\bullet}) ou peroxinitrito (ONOO) (BATHGATE, 2011). Tais substâncias apresentam efeitos duplos sobre a função espermática, pois em baixas concentrações induzem a capacitação, hiperativação e a fusão espermatozoide-oócito (O'FLAHERTY; LAMIRANDE; GAGNON, 2006), porém, em altas concentrações, reduzem a motilidade (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989), geram danos ao DNA (KITAGAWA et al., 2004; SCHULTE et al., 2010), inibem a fusão espermáticas-oócito (KAJI; KUDO, 2004) e podem levar a célula à apoptose, reduzindo, assim, a capacidade fecundante do sêmen (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008).

Dentre as diferentes ERO, o ânion superóxido (O_2^{\bullet}) apresenta a menor reatividade, quando comparado aos demais, além de não apresentar a habilidade de atravessar membranas lipídicas, restringindo sua ação ao seu local de

produção (NORDBERG; ARNER, 2001). Sua formação ocorre na mitocôndria de forma espontânea, com base no oxigênio molecular adicionado de um elétron. Em contrapartida, o radical hidroxila (HO^\bullet) é considerado o mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar os maiores danos às estruturas celulares, pela da peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Essa molécula é formada, com base no peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+) (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005), denominada reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, não é considerado um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, já que participa como intermediário na reação que produz o radical HO^\bullet . O H_2O_2 é gerado, com base na dismutação enzimática do O_2 pela superóxido dismutase, apresentando meia-vida longa e capacidade de atravessar membranas biológicas (NORDBERG; ARNER, 2001).

Os maiores danos gerados pelas ERO ocorrem quando tais substâncias doam ou roubam um elétron de maneira não emparelhada de moléculas pertencentes às estruturas celulares, especialmente lipídios e aminoácidos (OCHSENDORF, 1999). Nos espermatozoides, as ERO são capazes de promover um ataque oxidativo sobre os lipídeos da membrana espermática, iniciando a cascata da peroxidação lipídica (SHARMA; AGARWAL, 1996), sendo esse processo considerado um importante fator que afeta a função espermática.

As consequências de ataque oxidativo sobre os lipídios de membrana estão relacionadas aos danos físicos causados a essa estrutura, à inibição metabólica e à perda de enzimas intracelulares (WHITE, 1993). Isso ocorre por causa da alteração da fluidez da membrana plasmática, que interfere na funcionalidade dos canais iônicos e, conseqüentemente, na atividade das enzimas intracelulares (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989). Em

decorrência da alteração iônica, a célula espermática, também, pode apresentar menor sensibilidade ao cálcio, reduzindo o influxo desse íon para o interior da célula, dificultando o processo de fusão espermatozoide-oócito (KAJI; KUDO, 2004).

A motilidade espermática é outro parâmetro influenciado pelos radicais livres, já que esses metabólitos são capazes de reduzir a porcentagem de células móveis. De acordo com Lamirande e Gagnon (1995), a redução da motilidade na presença de elevados níveis de ERO ocorre em virtude da redução dos níveis intracelulares de ATP, por meio da inibição da fosforilação oxidativa e/ou da glicólise, com base na ação inibitória das ERO sobre a enzima gliceraldeído-3-fosfato sintetase, limitando, assim, o reabastecimento de energia. Além dessa ação direta dos radicais livres sobre enzimas glicolíticas, os produtos da peroxidação lipídica, como o dialdeidomalônico, apresentam atividade citotóxica sobre o espermatozoide, inibindo a glicólise anaeróbia e a síntese de DNA, RNA e de proteínas (HARTLEY; KROLL; PETERSEN, 1997). Com a redução dos níveis de ATP intracelular, a fosforilação de proteínas axonemais necessárias para a motilidade espermática não ocorre.

Outra estrutura espermática muito sensível aos danos oxidativos é o DNA espermático, já que os radicais livres podem gerar a hidroxilação, abertura do anel e a fragmentação dessa estrutura, reduzindo, assim, as taxas de fertilização (MÉNÉZO et al., 2007). A maioria dos danos causados pelas ERO ao DNA espermático de humanos está correlacionada ao aumento do estresse oxidativo espermático, visto que a maioria das células não viáveis apresentou, concomitantemente, fragmentação de DNA e altas taxas de peroxidação lipídica (GUTHRIE; WELCH, 2012).

Por outro lado, tanto o plasma seminal quanto os próprios espermatozoides são dotados de um conjunto de mecanismos antioxidantes a fim de protegê-los do estresse oxidativo. Dentre esses mecanismos, podem-se citar o

sistema glutationa peroxidase/reductase, superóxido dismutase e catalase, além da presença de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular, como a vitamina E, a vitamina C, o ácido úrico e a albumina (SMITH et al., 1996). O estresse oxidativo ocorre quando as quantidades de ERO presentes no meio superam a capacidade da célula espermática em degradá-los. Entretanto, como o espermatozoide apresenta quantidade limitada de citoplasma celular, as enzimas e substâncias antioxidantes presentes nesse meio não são suficientes para neutralizar todas as ERO geradas, durante o metabolismo energético, especialmente, em condições de armazenamento do sêmen, fato esse que resulta na elevada sensibilidade da célula à presença dessas substâncias reativas (SIKKA, 1996; HENKEL, 2005). Outro fator que torna a célula espermática susceptível aos danos oxidativos é a composição da sua membrana plasmática. Principalmente na espécie suína, essa estrutura apresenta elevadas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (CEROLINI et al., 2000) e as duplas ligações presentes na sua composição são facilmente oxidadas pelas ERO.

Já que os radicais livres são produtos do metabolismo celular e se formam de maneira espontânea, uma alternativa de reduzir a ação desses catabólitos sobre a célula espermática é melhorar a capacidade antioxidante seminal, aumentando a taxa de remoção das ERO. Os diluentes seminais já contêm na sua composição substâncias antioxidantes, entretanto, os compostos, normalmente, utilizados se oxidam rapidamente não mantendo seu efeito protetor durante todo o período de armazenamento seminal. Dessa forma, a utilização de substâncias que possam auxiliar a célula espermática contra o estresse oxidativo, por vários dias, é uma alternativa para manter a qualidade espermática durante o armazenamento.

2.4 Ácido Clorogênico

Ácido clorogênico (ACG) é o nome utilizado para identificar um grupo de ésteres formados considerando a reação de esterificação entre os compostos fenólicos ácidos transcinâmicos (p-cumárico, ferúlico e cafeico) e ácido quínico (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). O primeiro relato sobre a utilização de ácido clorogênico foi, provavelmente, em 1837, por Robiquet e Boutron, mas o termo propriamente dito foi utilizado pela primeira vez por Payen em 1846, que designou esse nome a um composto fenólico com função ácida e estrutura química desconhecida, que conferia cor verde em meio levemente alcalino quando exposto ao ar (CLIFFORD, 1999). Em 1907, essa substância foi isolada na forma de um complexo cristalino, mas teve sua estrutura estabelecida em 1932 por Fisher (MARIA; MOREIRA, 2004). Esse pesquisador concluiu que o ácido clorogênico consistia da união do ácido cafeico com o ácido quínico, formando o composto ácido 5-cafeoilquínico (Figura 2).

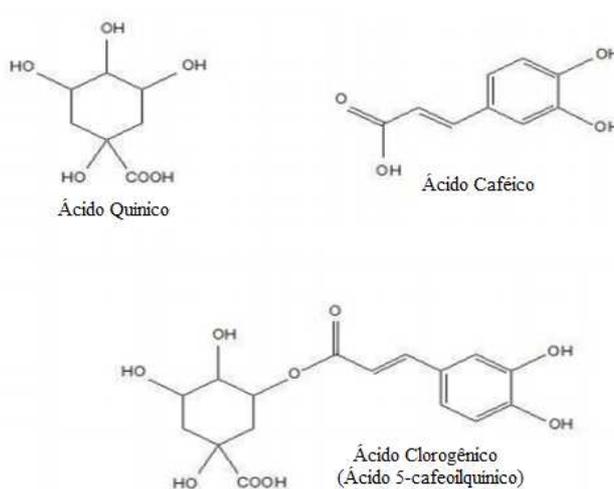


Figura 2 Estrutura química dos precursores do ácido clorogênico e do ácido 5-cafeoilquínico

Por causa de sua estrutura química, o ácido clorogênico pertence à família dos polifenóis, compostos amplamente distribuídos na natureza e encontrados, principalmente, em alimentos de origem vegetal, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o mais comum dos ácidos clorogênicos e o mais conhecido dos fenóis dietéticos, biologicamente, ativos (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003). O grão do café, por exemplo, é uma fonte extremamente rica em ácidos clorogênicos, mas na matéria seca pode conter de 6 a 10% desse composto em sua composição (TUNNICLIFFE; SHEARER, 2008).

Há vários trabalhos na literatura que demonstram o efeito benéfico do ácido clorogênico sobre diferentes quadros fisiopatológicos (BIXBY et al., 2005; BONITA et al., 2007; HOELZL et al., 2010), sendo a sua ação antioxidante o mecanismo de ação mais evidenciado. De acordo com esses trabalhos, observa-se que a habilidade dos polifenóis atuarem como antioxidantes depende da concentração desse composto no meio e do sistema gerador de oxirradicais que será protegido.

O mecanismo antioxidante desse composto está relacionado à sua atividade redutora, ou seja, à sua capacidade de interromper as reações dos radicais livres, além da ação direta de *scavenger/remoção*, sequestrando as ERO presentes no meio (XU et al., 2010). Mattos (2009) observou a formação de complexo entre o ácido cafeico (precursor do ácido clorogênico) e o Fe^{2+} , indisponibilizando esse íon para a reação de Fenton e reduzindo, conseqüentemente, a formação de radicais HO^{\bullet} . Nardini et al. (1995) demonstraram que esse ácido, também, está relacionado com o aumento da resistência das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à peroxidação lipídica.

Além desses mecanismos de ação, os ácidos clorogênicos, também, podem agir sobre enzimas antioxidantes, como a glutatona S-transferase e a NAD(P)H quinona oxidoreductase, aumentando suas atividades, assim como atuar sobre a transcrição gênica pela redução da ativação de fatores de

transcrição induzidos pelas ERO (FENG et al., 2005; XU et al., 2010). Apesar de todas essas ações benéficas sobre os mecanismos antioxidantes, os ácidos clorogênicos apresentam aspectos divergentes, visto que, em baixas concentrações, podem melhorar a função celular, ao passo que, em doses elevadas, reduzem a funcionalidade da membrana mitocondrial por meio do bloqueio da cadeia respiratória (FULDA et al., 2010; MARTIN-HIDALGO et al., 2013).

Estudos na área reprodutiva, tendo como referência os polifenóis, são, na sua maioria, conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito da ingestão dessas substâncias sobre as características seminais em humanos (CHAVARRO et al., 2008; MENDIOLA et al., 2010) e ratos (TÜRK et al., 2008; AWONIYI et al., 2012). Não há relatos na literatura que avaliem a utilização do ácido clorogênico no meio de conservação seminal e seus efeitos sobre os parâmetros espermáticos.

Wittayararat et al. (2013) estudaram o efeito de diferentes doses de polifenóis, derivados do chá verde sobre a qualidade do sêmen canino armazenado a 5 °C, por quatro semanas e observaram que a suplementação exógena com esses antioxidantes aumentou a viabilidade e a motilidade espermática. Esses autores atribuíram esse resultado à ação de *scavenger* direta dos polifenóis, reduzindo, assim, a presença de radicais livres no meio de conservação. Assim como os polifenóis derivados do chá verde, a adição de resveratrol ao meio de congelamento do sêmen humano minimizou os danos ao DNA que ocorrem durante o processo de criopreservação (BRANCO et al., 2010).

Apesar desse resultado satisfatório atribuído a esse polifenol, em trabalhos que avaliaram o efeito da adição dessa substância sobre os parâmetros seminais do sêmen resfriado de suíno (MARTIN-HIDALGO et al., 2013) e descongelado de ovino (SILVA et al., 2012) indica-se que essa substância reduz

o potencial de membrana mitocondrial e a quantidade intracelular de ATP das células espermáticas. A redução desse parâmetro gerado pelo uso do resveratrol pode estar associada à capacidade dessa substância em interromper a cadeia respiratória mitocondrial (ZHENG; RAMIREZ, 2000). Portanto, embora a adição de polifenóis, como o ácido clorogênico, ao meio de conservação seminal possa trazer benefícios à qualidade espermática, os resultados dependem da espécie em estudo, das doses utilizadas, da quantidade de radicais livres presentes no meio e do estado funcional e metabólico da célula espermática.

2.5 Cafeína

As metilxantinas são, frequentemente, utilizadas em meios de diluição espermática a fim de melhorar as características seminais, mas a pentoxifilina, a teofilina e a cafeína têm sido utilizadas mais frequentemente (GLOGOWSKI; DANFORTH; CIERESZKO, 2002). Em vários estudos que avaliaram a suplementação de metilxantinas sobre a qualidade espermática observou-se que essas substâncias resultaram em maiores valores de motilidade espermática tanto no sêmen *in natura* (LARDY et al., 1971; REES; FORD; HULL, 1990) quanto no criopreservado (BARKAY et al., 1977; DAVID et al., 2007).

A cafeína (1,3,7-trimethylxanthine) (Figura 3) é um composto considerado estimulante metabólico, em decorrência, principalmente, da sua atuação como um inibidor competitivo aos isoenzimas da fosfodiesterase em vários tecidos. Essa enzima é responsável por hidrolisar o AMPc (adenosina monofosfato cíclico), inativando-o. Como abordado anteriormente, a via de sinalização AMPc/PKA é considerada uma das principais vias de regulação da motilidade e da capacitação espermática (HOU; MA; YANG, 2002). Portanto, já 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.

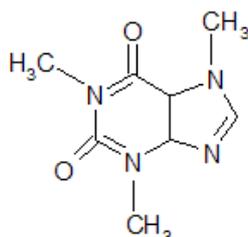


Figura 3 Estrutura química da cafeína

Em estudos realizados por Funahashi e Nagai (2001), as sondas fluorescentes de clortetraciclina (CTC) mostraram que a cafeína induz a capacitação espermática e a reação acrossômica no sêmen *in natura* de suínos e, conseqüentemente, aumentam a capacidade de penetração dos espermatozoides. Além disso, a adição de cafeína, em meios de capacitação espermática e de cultivo de embrião, aumentou a proporção de células capacitadas em relação a não capacitadas e à taxa de formação de blastocistos (OLIVEIRA et al., 2011).

Em relação à motilidade espermática, a cafeína adicionada aos meios de reativação aumenta a porcentagem de células móveis no sêmen diluído e resfriado de coelhos (LÓPEZ; ALMARIÑO, 2000), equinos (CARRINGTON et al., 2011) e suínos (YESTE et al., 2008), provavelmente, pelos aumentos intracelulares de AMPc. Em suínos, a intensidade de movimento, também, foi influenciada por essa substância, porém esse parâmetro foi superior nas amostras que continham cafeína (GLOGOWISKI; DANFORTH; CIERESZKO, 2002).

Variáveis individuais de avaliação do movimento, tais como velocidade curvilínea (VC), amplitude lateral de cabeça (ALC), velocidade linear (VL) e motilidade progressiva (MP), também, são afetadas pela adição da cafeína. Em sêmen de cães, a adição 7,5 mM de cafeína, no momento do descongelamento,

aumentou os valores de VC, ALC e a motilidade total, entretanto, reduziu a VL e a MP (MILANI et al., 2010). A adição de cafeína na concentração de 2 mM no sêmen refrigerado de equino foi capaz de aumentar a MP, quando comparado ao grupo controle, resultando em maior duração da motilidade espermática (CARRINGTON et al., 2011).

Recentemente, Nunes (2012) verificou que a cafeína proporcionou resultados benéficos no sêmen suíno, quando adicionada em doses inseminantes durante o período de reativação após o armazenamento. A autora observou aumento da motilidade e do vigor espermático, porém menores valores de integridade de membrana, que pode ter ocorrido por causa da peroxidação lipídica da membrana, sugerindo maior formação de radicais livres em função do aumento da atividade metabólica celular. Desta forma, a associação desse composto com substâncias antioxidantes como o ácido clorogênico, por exemplo, poderia ser benéfica para a qualidade do sêmen suíno armazenado.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verifica-se que o principal fator que causa a redução da qualidade seminal, durante o armazenamento, é o estresse oxidativo gerado pelas ERO. A formação desses metabólitos ocorre já que a temperatura de armazenamento não é capaz de paralisar totalmente o metabolismo espermático. Portanto, o espermatozoide, durante o armazenamento, está exposto aos radicais livres além de apresentarem um desgaste metabólico.

Substâncias ativadoras do metabolismo celular podem auxiliar na reativação espermática após o armazenamento. Entretanto, ao aumentar a taxa metabólica celular, aumenta-se, também, a formação de ERO. A cafeína atua, principalmente, no metabolismo mitocondrial, aumentando as taxas de fosforilação oxidativa (SCHOFF; LARDY, 1987), principal via pela qual os radicais livres são formados (KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

Portanto, a associação do uso de um ativador metabólico junto com um antioxidante torna-se importante para reduzir a quantidade de ERO no meio, reduzindo, assim, a ocorrência dos danos oxidativos. Então, em função da capacidade antioxidante e do potencial de *scavenger* do ácido clorogênico (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), a associação desse composto com a cafeína poderia trazer resultados benéficos para o sêmen armazenado por tempos superiores.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 59, n. 1, p. 2–11, Jan. 2008.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 43, n. 11, p. 963-974, Nov. 2005.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, New York, v. 41, n. 1, p. 183–197, July 1989.

ALBARRACÍN, J. L. et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. **Biology of Reproduction**, New York, v. 71, n. 5, p. 1437–1445, June 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE SUÍNOS. **Relatórios anuais**. Brasília: ABIPECS, 2011. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/relatorios.html>>. Acesso em: 09 jun. 2014.

AWONIYI, D. O. et al. The effects of rooibos (*Aspalathus linearis*), green tea (*Camellia sinensis*) and commercial rooibos and green tea supplements on epididymal sperm in oxidative stress-induced rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 26, n. 8, p. 1231–1239, Aug. 2012.

BAILEY, J. L. et al. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, n. 8, p. 1251–1259, Nov. 2008.

BARKAL, J. et al. Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. **Fertil Steril**, New York, v. 28, n. 2, p. 175-177, Feb. 1977.

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

- BAZER, F. W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 8, p. 191-193.
- BIXBY, M. et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 345-358, June 2005.
- BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal and human studies. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 187-198, Mar. 2007.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 17-32, Oct. 2005.
- BRANCO, C. S. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, Rockville, v. 60, n. 2, p. 235–237, Apr. 2010.
- BUCCI, D. et al. GLUTs and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 348-355, July/Aug. 2011.
- CARRINGTON, J. L. et al. Effect of caffeine, pentoxifylline, and taurine on post-thaw parameters of equine frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Champaign, v. 31, n. 5, p. 230-356, May 2011.
- CEROLINI, S. et al. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 99–111, Feb. 2000.
- CHAVARRO, J. E. et al. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. **Hum Reprod**, Oxford, n. 23, n. 11, p. 2584–2590, Nov. 2008.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 362–372, Mar. 1999.
- DARSZON, A. et al. Íon channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, Washington, v. 79, n. 2, p. 481-510, Apr. 1999.

DAVID, R. J. 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, May 2007.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS.

Produção animal: carne suína. Washington: USDA, 2014. Disponível em: <www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=ANIMAL_PRODUCTION&navtype=RT&parentnav=PRODUCERS>. Acesso em: 23 jun. 2014.

FENG, R. et al. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 30, p. 27888–27895, July 2005.

FRYDRYCHOVÁ, S. et al. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 55, n. 4, p. 160–166, 2010.

FULDA, S. et al. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, New York, v. 2010, p. 1–24, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2010/214074>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 4, n. 58, p. 424–31, Apr. 2001.

GADELLA, B. M.; VAN GESTEL, R. A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 307–319, July 2004.

GERRITS, R. J. et al. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 283–299, Jan. 2005.

GLOGOWSKI, J.; DANFORTH, D. R.; CIERESZKO, A. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 783–792, Nov. 2002.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, n. 8, p. 1700–1708, Nov. 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HARTLEY, D. P.; KROLL, D. J.; PETERSEN, D. R. Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde protein adducts. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 10, n. 8, p. 895-905, Aug. 1997.

HENKEL, R. R. The impact of oxidants on sperm function. **Andrologia**, Singapore, v. 37, n. 6, p. 205-206, Dec. 2005.

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

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.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 143–172, Aug. 2000.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 4, p. 728-733, Oct. 2003.

JONES, A. R. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, East Melbourne, v. 9, n. 2, p. 227–232, 1997.

JONES, A. R.; CHANTRILL, L. A.; COKINAKIS, A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, East Melbourne, v. 94, n. 1, p. 129–134, Jan. 1992.

JONES, A. R.; CONNOR, D. E. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 12, n. 7-8, p. 355-359, 2000.

KAJI, K.; KUDO, A. The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 4, p. 423–429, Apr. 2004.

KAMP, G. et al. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 517–25, Oct. 2003.

KEFER, C. J.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, Tokyo, v. 16, n. 6, p. 449–457, May 2009.

KITAGAWA, Y. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 7, p. 1186–1197, Oct. 2004.

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

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, May 1971.

LECLERC, P.; LAMIRANDE, E. de; GAGNON, C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. **Biology of Reproduction**, New York, v. 55, n. 3, p. 684–692, Sept. 1996.

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.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. de. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, São Paulo, v. 4, n. 27, p. 586-592, jun./jul. 2004.

MARIN, S. et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolic characterization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 554, n. 3, p. 342–346, Nov. 2003.

MARTIN-HIDALGO, D. et al. The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 5, n. 8, p. 231-242, 2013.

MATTOS, T. G. **Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro II**. 2009. 206 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MEDRANO, A. et al. Hexose-specificity of hexokinase and adp-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 9, p. 1179–1194, Sept. 2006a.

MEDRANO, A. et al. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 3, p. 369–378, 2006b.

MEDRANO, A. et al. Utilization of different monosaccharides by boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 4, p. 259-262, Oct. 2004.

MENDIOLA, J. et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. **Fertility and Sterility**, New York, v. 93, n. 4, p. 1128–1133, Mar. 2010.

MENEZO, Y. J. et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. **Reproductive BioMedicine**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 418–421, Apr. 2007.

MILANI, C. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**, Stonehan, v. 1, n. 74, p. 153-164, July 2010.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 19, n. 5, p. 541-552, Nov. 1995.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Dec. 2001.

NUNES, M. B. **Adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado e descongelado.** 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 399-420, Sept./Oct. 1999.

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

OLIVEIRA, V. P. et al. Influence of caffeine and chondroitin sulfate on swine sperm capacitation and in vitro embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 01-06, Oct. 2011.

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

RAMIÓ-LLUCH, L. et al. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 26, n. 6, p. 883-897, July 2013.

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.

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

RIESENBECK, A. Review on international trade with boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 01-03, Sept. 2011.

ROCA, J. et al. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 2, n. 41, p. 43-53, Oct. 2006.

RODRIGUEZ-GIL, J. E. Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 2, p. 11–20, Oct. 2006.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial insemination in boar reproduction. In: BONET, S. et al. **Boar reproduction**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 589-608.

SCHOFF, P. K.; LARDY, H. A. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, New York, v. 4, n. 37, p. 1037-1046, Nov. 1987.

SCHULTE, R. T. et al. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 27, n. 1, p. 3–12, Jan. 2010.

SELVARAJU, S. et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p. 60–70, July 2009.

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

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 1, n. 1, p. 78-86, Aug. 1996.

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

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

SMITH, R. et al. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Hum Reprod**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1655–1660, Aug. 1996.

TUNNICLIFFE, J. M.; SHEARER, J. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. **Applied**

Physiology, Nutrition, and Metabolism, Ottawa, v. 33, n. 6, p. 1290-1300, Dec. 2008.

TÜRK, G. et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 27, n. 2, p. 289–296, Apr. 2008.

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.

VISCONTI, P. E. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Developmental Biology**, New York, v. 214, n. 2, p. 429–443, Oct. 1999.

VYT, P. et al. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 01-05, Feb. 2004.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 6, n. 5, p. 639–658, 1993.

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

XU, Y. et al. Protective effects of Chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. **Inflammation Research**, Basel, v. 59, n. 10, p. 871-877, Oct. 2010.

YESTE, M. et al. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 degrees C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 109, n. 1-4, p. 236–250, Dec. 2008.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 130, p. 1115-1123, July 2000.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Qualidade do sêmen suíno resfriado adicionado de ácido clorogênico

B.A. Pereira¹, M.G. Zangeronimo¹,

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

“Running head”: Ácido clorogênico no sêmen suíno

Normas da Revista Animal Cambridge

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da adição de ácido clorogênico a doses inseminantes de sêmen de suínos armazenados a 15°C. Doze ejaculados, proveniente de quatro machos foram utilizados, os quais receberam diferentes concentrações de ácido clorogênico (0; 1500; 3000; 4500 e 6000 µg/mL de sêmen) e uma dose de vitamina E (200 µg/mL - controle positivo) durante o processamento. Antes e após 42 e 72 horas de armazenamento a 15°C, as amostras foram incubadas a 37°C e a avaliação dos parâmetros seminais (motilidade, intensidade de movimento, integridade de membrana e acrossoma, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante do plasma seminal) foi feita após 10 e 120 minutos de incubação. O ácido clorogênico influenciou positivamente a motilidade espermática e a quantidade de mitocôndrias com atividade máxima nos dois tempos de incubação. A viabilidade espermática também sofreu influência dessa substância após 24 horas de armazenamento, sendo que houve aumento linear desse parâmetro com a adição de ácido clorogênico. Com relação a integridade acrossomal, o ácido clorogênico aumentou o número de células espermáticas com acrossoma íntegro antes e após 72 horas de armazenamento. Após 24 horas de armazenamento, a ação do ácido clorogênico sobre os parâmetros de viabilidade, integridade acrossomal e mitocôndrias ativas, foi superior a proporcionada pela vitamina E. A adição de ácido clorogênico ao sêmen suíno aumentou a capacidade antioxidante do plasma seminal durante todo o período de armazenamento, promovendo uma redução na concentração de dialdeidomalônico às 72 horas de armazenamento, ou seja, reduzindo as taxas de peroxidação lipídica. Conclui-se que a adição de 4500 µg/mL de ácido clorogênico durante o processamento de doses inseminantes de suínos é viável para garantir melhor qualidade seminal até 72 horas de armazenamento a 15°C. Além disso, doses suplementadas com esse antioxidante e armazenadas por 24 e

72 horas apresentaram parâmetros seminais superiores àquelas que receberam Vitamina E e ficaram armazenadas pelo mesmo período.

Palavras Chaves: polifenóis, antioxidante, vitamina E, espermatozoide suíno, capacidade antioxidante

Implicações

A inseminação artificial na espécie suína trouxe benefícios pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho, melhor aproveitamento de machos geneticamente superiores e redução dos custos de produção. No entanto, a perda de qualidade do sêmen durante o armazenamento das doses inseminates é um problema no sistema de produção. Portanto, o uso de antioxidantes como o ácido clorogênico pode ser benéfico para os programas de inseminação artificial, a fim de reduzir a perda de qualidade seminal a partir do combate aos radicais livres. Este estudo foi realizado para determinar os efeitos do ácido clorogênico sobre parâmetros seminais normais e atividades antioxidantes após o resfriamento do sêmen suíno.

Introdução

Na indústria suinícola, a inseminação artificial (IA) é normalmente realizada utilizando-se doses seminais diluídas em meio líquido e mantidas sob refrigeração de 15°C a 17°C durante 24 - 48 horas, normalmente (Johnson *et al.*, 2000; Pinart *et al.*, 2013). Nessas condições, o sêmen suíno apresenta redução inevitável de capacidade fertilizante com o passar do tempo, devido ao processo normal de desgaste celular (Haugan *et al.*, 2005; Martin-Hidalgo *et al.*, 2013). Assim, o desenvolvimento de técnicas que possibilite a utilização do sêmen suíno por tempos superiores poderia melhorar a eficiência da produção, pela otimização de machos no plantel (Waterhouse *et al.*, 2004).

A redução da qualidade seminal com o decorrer do tempo ocorre devido, principalmente, aos danos oxidativos ocorridos tanto nos mecanismos funcionais quanto estruturais da célula espermática (Conejo *et al.*, 2003; Waterhouse *et al.*, 2004; Martín-Hidalgo *et al.*, 2011), a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo metabolismo espermático (Breininger *et al.*, 2005). As ERO gerados são capazes de induzir a peroxidação lipídica de componentes celulares, resultando na diminuição da motilidade e viabilidade, alterações na permeabilidade de membrana e alterações irreversíveis nas proteínas e no DNA espermático, levando à apoptose e à morte celular (Leon *et al.*, 2004; Martín-Hidalgo *et al.*, 2011).

Particularmente, o espermatozoide suíno é sensível aos danos peroxidativos devido ao seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular (Cerolini *et al.*, 2000; Awda *et al.*, 2009), e a baixa capacidade antioxidante do plasma seminal quando comparado à espécie bovina (Cerolini *et al.*, 2000). Em vista disso, é necessário o desenvolvimento de técnicas que melhorem o potencial das defesas inatas no espermatozoide de varrão e que permitam um eficiente combate às ERO produzidas durante o metabolismo celular. Isso, de fato, possibilitaria a utilização de ejaculados armazenados por mais tempo, mantendo sua qualidade seminal e incrementando a capacidade fertilizante do sêmem refrigerado destinado à IA (Funahashi & Sato, 2005).

A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos já vem sendo estudada por muito tempo na medicina humana. Trabalhos demonstram que essas substâncias possuem efeitos benéficos sobre diferentes quadros fisiopatológicos (Nardini *et al.*, 1995; Eberhardt *et al.*, 2000; Bixby *et al.*, 2005), devido à redução do estresse oxidativo (Hoelzl *et al.*, 2010). Dentre os compostos fenólicos, os ácidos clorogênicos apresentam a ação antioxidante como seu mecanismo de ação mais relevante (Bonita *et al.*, 2007; Hoelzl *et al.*,

2010), devido à sua atividade redutora, ação sobre enzimas antioxidantes e da supressão da ativação de fatores de transcrição induzidos por ERO (Xu *et al.*, 2010). O ácido clorogênico é um composto fenólico encontrado em grãos de café que, na matéria seca, pode conter de 6 a 10% desse composto em sua composição (Tunncliffe & Shearer, 2008).

Diante disso, a adição de ácido clorogênico durante o processamento do sêmen suíno pode auxiliar na manutenção da qualidade das doses inseminantes durante o resfriamento. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a suplementação de ácido clorogênico ao diluidor seminal altera as propriedades do sêmen suíno resfriado e armazenado a 15 °C.

Material e Métodos

Animais e coleta do sêmen

Doze ejaculados provenientes de três animais (quatro ejaculados de cada) foram utilizados. Os varrões apresentavam idade entre 1 – 1,5 anos e pertencem ao Centro Experimental de Suínos localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Esses reprodutores são mantidos em baias individuais com 3,0 m de comprimento, 2,0 m de largura e 1,30 m de altura, e receberam água “*ad libitum*” e 3,0 kg de ração específica para essa fase dividida em dois arraçoamentos diários. Todos os procedimentos envolvidos nesse trabalho foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Lavras, com número de protocolo 040/13.

Os ejaculados foram obtidos pelo método da mão enluvada durante a rotina de coleta da granja, sempre pela manhã. Após a coleta, os ejaculados foram encaminhados para o Laboratório de Reprodução de Suínos do Setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras, no qual realizavam-se as avaliações iniciais de motilidade e intensidade do movimento a

partir da observação subjetiva de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, patologia espermática e concentração com o auxílio da câmara de Neubauer. Apenas a fração rica do ejaculado foi utilizada.

Após a determinação da concentração, calculou-se o volume do sêmen a conter 1,5 bilhões de espermatozoides. Neste volume foi adicionado o diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*®) de modo a formar doses inseminantes de 40 mL com 1,5 bilhões de espermatozoides. As doses foram mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz por 60 minutos. De cada ejaculado, foram processadas seis doses inseminantes.

Procedimento experimental

Após o processamento, diferentes quantidades de ácido clorogênico (Chlorogenic acid crystalline, C3878 - *Sigma-Aldrich*®) foram adicionadas às doses inseminantes, obtendo concentrações finais de 0; 1500; 3000; 4500 e 6000 µg/mL de sêmen. Uma dose recebeu uma determinada vitamina E (DL- α -tocoferol acetato, T3251, *Sigma-Aldrich*) na a concentração final de 200 µg dessa vitamina/mL de sêmen (Mendez *et al.*, 2013), a fim de comparar o efeito do ácido clorogênico com um antioxidante de ação conhecida (controle positivo). Em seguida, as doses foram armazenadas em geladeira a 15 °C. Antes do armazenamento, uma alíquota de 10 mL de cada tratamento foi aquecida em tubos de ensaio em banho-maria a 37 °C. O mesmo procedimento foi realizado às 24 e 72 horas de armazenamento.

Das amostras de sêmen que permaneceram incubadas, foram retiradas alíquotas para avaliação da qualidade espermática. Aos 10, 50, 90 e 120 minutos de incubação foram feitas avaliações de motilidade e intensidade do movimento espermático. Aos 10 e 120 minutos foram avaliados a integridade da membrana espermática e acrossomal, e atividade mitocondrial das células. Aos 60 minutos foram coletadas amostras para determinar a concentração de dialdeidomalônico

(MDA) e o capacidade antioxidante do plasma seminal. As descrições das metodologias envolvidas nas análises encontram-se no próximo item.

Avaliações microscópicas

Para avaliar a motilidade espermática, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C. As avaliações foram feitas em microscópio de contraste de fase com aumento de 100 x. Um total de dez campos foram avaliados de forma subjetiva e por duas pessoas treinadas, determinando à percentagem de espermatozoides móveis. As análises foram feitas em triplicata e de forma cega. A intensidade de movimento foi avaliada por sistema de escalas de 0 a 5, sendo 1 intensidade fraca e 5 a intensidade máxima.

A integridade da membrana espermática (%) foi representada pela percentagem de células com membranas íntegras em relação ao número total de células contadas. Para isso, uma gota do sêmen foi misturada a uma gota (10µl) de corante eosina-nigrosina (Eosina Amarela - 205 – *Vetec Química*[®] e Solução corante de nigrosina - 43925 - *Sigma-Aldrich*[®] na proporção 1:1), seguindo a metodologia de Blom (1950). Após esfregaço em lâmina de microscopio, o número de células com membranas íntegras (sem cor) e células mortas (coradas) foi avaliado em microscópio óptico de luz em aumento de 400 x.

A atividade mitocondrial foi determinada a partir da incubação do sêmen em meio contendo Diaminobenzidina (3,3 '-Diaminobenzidine - D8001 - *Sigma-Aldrich*[®]) dissolvido em PBS (tampão fosfato salino) a uma concentração de 1,0 mg/ml e manuseado na ausência de luz. Uma alíquota de 25 µL de sêmen foi adicionada a 725 µL do meio de incubação e colocada em banho-maria a 37 °C durante 60 minutos na ausência de luz. Após a incubação, foi preparado um esfregaço da suspensão que foi fixado em formaldeído a 10% por 10 minutos. Após a secagem da lâmina, as células espermáticas foram avaliadas em objetiva

de 1000 x, sob imersão em óleo, usando microscopia de contraste de fase. A atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides foi classificada seguindo o proposto por Hrudka (1987), sendo que foi determinada a porcentagem de células pertencentes a classe I, ou seja, células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial.

Para análise da integridade acrossomal, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi adicionado em 10 µl de corante simples de POPE (Pope *et al.*, 1991) e mantidos em contato, antes da realização do esfregaço, por 60 segundos. Após esse período, foi confeccionado um esfregaço em lâmina de microscopia, na qual avaliou-se o número de espermatozoides com o acrossoma íntegro (região acrossomal corado de azul) e não íntegro (região acrossomal não corada ou fracamente corada). A análise foi realizada em microscopia de contraste de fases em aumento de 1000 x sob óleo de imersão.

Todas às análises descritas anteriormente, com exceção da motilidade e da intensidade de movimento, foram realizadas em duplicata, de forma cega, e pelo mesmo avaliador, o qual realizou a contagem de 200 células.

Avaliações bioquímicas

Para realização das análises bioquímicas coletou-se, em tubos de polietileno tipo eppendorf, amostras de 1,0 mL. Esses tubos foram centrifugados a 3360 g durante dez minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos devidamente identificados e foi congelado a -80°C até o dia das análises.

A capacidade antioxidante do sêmen foi determinada utilizando kit comercial colorimétrico (QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit – DTAC-100), de acordo com as recomendações do fabricante, de forma que esse parâmetro foi mensurado de acordo com o equivalente TROLOX. Esse teste representa um indicativo do potencial antioxidante do plasma seminal a partir da redução do

Cu^{2+} em Cu^+ , sendo que quanto maior foi esse potencial de redução, maior é a atividade antioxidante do plasma seminal.

Para avaliar a concentração de MDA (grau de peroxidação lipídica) o Kit QuantiChrom™ TBARS ASSAY (DTBA- 100- bioassay Systems) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante. Esse kit realiza-se a mensuração da quantidade de dialdeidomalônico na amostra, a partir do ácido tiobarbitúrico. O MDA é um produto da lipoperoxidação, sendo um indicativo desse parâmetro. Portanto, quanto maior a quantidade desse produto na amostra, maior foi a taxa de peroxidação lipídica.

Análise estatística

Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso (ejaculado) com parcela subdividida no tempo (tempo de incubação), quando o caso, com seis tratamentos, sendo cinco níveis de ácido clorogênico (0, 1500, 3000, 4500 e 6000 $\mu\text{g/ml}$ de sêmen) e um adicional (controle), contendo vitamina E na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ de sêmen. A parcela experimental foi representada por uma dose inseminante.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias obtidas com os níveis de ácido clorogênico submetidas à análise de regressão. Quando a regressão cúbica foi significativa, o teste SNK a 5% foi utilizado e, para comparar cada média em relação ao controle (vitamina E), o teste Dunnett a 5% foi aplicado. Os dados obtidos com a variável intensidade de movimento foram submetidos à análise estatística não paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Friedman. Toda análise estatística foi realizada no pacote estatístico Action versão 2.4.

Resultados

Análises microscópicas

A adição de ácido clorogênico durante o processamento das doses inseminantes influenciou a qualidade do sêmen antes e após 24 e 72 horas de armazenamento a 15 °C (Tabela 1, 2 e 3). No sêmen diluído antes do resfriamento houve efeito quadrático ($P=0,01$) sobre a motilidade e integridade de acrossoma em todos os tempos de incubação avaliados, sendo que as melhores doses estimadas do ácido foram de 3200 e 3000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 1). A melhor intensidade de movimento foi obtida com a dose de 4500 $\mu\text{g/mL}$ nos tempos 50 e 90 minutos de adição ($P=0,01$), não sendo observada influência nos demais tempos de avaliação ($P=0,10$). Não houve efeito do ácido clorogênico na viabilidade espermática ($P=0,56$) e a redução da qualidade do sêmen durante o período de incubação foi semelhante para todas as variáveis estudadas. Ao comparar cada dose de ácido clorogênico com a vitamina E, observou-se que a adição do ácido em todas as doses reduziu ($P<0,01$) o número de mitocôndrias em atividade máxima após 120 minutos de incubação.

A adição de ácido clorogênico às doses inseminantes também influenciou ($P<0,05$) a qualidade do sêmen armazenado por 24 horas a 15 °C (Tabela 2). Efeito quadrático ($P<0,04$) na motilidade espermática e decréscimo linear da integridade de acrossoma foram observados durante todo o período de incubação com a adição dessa substância. Para motilidade, o melhor nível estimado de ácido foi de 3667 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2). Houve também aumento linear ($P<0,05$) da viabilidade do sêmen avaliado aos 120 minutos de incubação (Figura 2). Para mitocôndrias em atividade máxima, as melhores doses de ácido foram de 1500 e 6000 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0,01$), as quais também foram as únicas semelhantes aos valores obtidos com o uso da vitamina E. Não houve efeito

sobre a intensidade do movimento espermático ($P>0,19$). A diminuição da qualidade do sêmen ao longo do tempo de incubação foi semelhante em todas as variáveis estudadas, com exceção da viabilidade. Não houve redução desse parâmetro ($P>0,05$) até 120 minutos de incubação apenas quando as doses de 3000, 4500 e 6000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogênico foram utilizadas, resultado semelhante ao obtido com o uso da vitamina E.

A qualidade do sêmen diluído por até 72 horas também foi influenciado pela adição de ácido clorogênico (Tabela 3). Houve aumento linear ($P<0,01$) da motilidade e viabilidade espermáticas e integridade de acrossoma em todos os tempos de incubação avaliados (Figura 3). Maior atividade de mitocôndrias ($P<0,01$) foi obtida com a dose de 3000 $\mu\text{g/mL}$ do ácido, sendo esses resultados superiores aos da vitamina E. Não houve efeito ($P>0,18$) sobre a intensidade do movimento espermático e a diminuição da qualidade do sêmen ao longo do tempo de incubação foi semelhante em todos os níveis de adição. Comparado à adição de vitamina E, as doses de 3000, 4500 e 6000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogênico resultaram ($P<0,01$) em maiores valores de viabilidade espermática e integridade de acrossoma, enquanto que apenas a dose de 3000 $\mu\text{g/mL}$ resultou em maior atividade mitocondrial em todos os tempos de incubação avaliados.

Análises bioquímicas

Os valores referentes ao potencial de redução seminal foram superiores nas doses suplementadas com antioxidantes ($P<0,01$) em relação ao controle, sendo, portanto, que a adição de ácido clorogênico melhorou a capacidade antioxidante (Trolox equivalente) do sêmen suíno logo após sua adição e também após o armazenamento por 72 horas (Figura 4).

A concentração de dialdeidomalônico foi superior nas amostras do tratamento controle (sem adição de antioxidante) armazenadas por 72 horas ($P<0,01$).

Os efeitos sobre a capacidade antioxidante e concentração de dialdeidomalônico do ácido clorogênico foram semelhantes ($P>0,05$) aos obtidos com a vitamina E.

Discussão

Relatos contraditórios são encontrados a respeito do efeito do uso de antioxidantes nas doses inseminantes sobre a qualidade espermática do sêmen resfriado ou congelado de várias espécies, incluindo humanos (Peña *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2013). Os resultados parecem ser dependentes do tipo de antioxidante empregado, da dose utilizada e também da capacidade antioxidante natural do sêmen.

Um grande número de estudos sugerem que os polifenóis podem ser benéficos para a funcionalidade celular e saúde animal (Bixby *et al.*, 2005; Farah *et al.*, 2008; Darvesh *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2011) devido as suas propriedades antioxidantes, mas não há estudos na literatura que avaliam o efeito da adição dos ácidos clorogênicos no meio de conservação seminal..

Há estudos que avaliaram o uso de polifenóis sobre a qualidade do sêmen canino armazenado (Wittayarat *et al.*, 2013) e humano congelado (Branco *et al.*, 2010), e observaram que a suplementação exógena com esses antioxidantes aumentou a viabilidade e a motilidade espermática, e minimizou os danos ao DNA. Esses resultados foram atribuídos à ação de *scavenger* direta dos polifenóis, reduzindo assim a presença de radicais livres no meio de conservação.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, a adição de ácido clorogênico melhorou a capacidade antioxidante, na mesma proporção da vitamina E, tanto no sêmen fresco como no armazenado por 72 horas. Essa constatação demonstra que o a capacidade antioxidante do plasma seminal, ou

seja, o potencial de combater as ERO, aumentou, contribuindo para reduzir o estresse oxidativo da célula espermática.

De fato, observou-se redução das concentrações de MDA equivalente no sêmen armazenado por 72 horas, também de forma similar à vitamina E, ou seja, as menores concentrações desse produto da lipoperoxidação demonstram que a utilização de antioxidantes no processamento das doses inseminantes reduz a peroxidação lipídica na célula espermática. Esses resultados demonstram que o meio de conservação do sêmen suíno, sem adição de antioxidantes, não é capaz de manter as características estruturais da membrana espermática por tempos prolongados de armazenamento. A não obtenção de resultados no sêmen fresco sugere que existam substâncias antioxidantes naturais provenientes do plasma seminal ou que estejam presentes nos diluentes utilizados para o preparo das doses inseminantes.

Esses resultados podem explicar a melhora da qualidade do sêmen quando o ácido clorogênico foi adicionado durante o processamento das doses inseminantes. De uma forma geral, um aumento progressivo da motilidade e da integridade de acrossoma foi observado logo após a adição de um determinado nível de ácido clorogênico. Resultados semelhantes para motilidade foram observados no sêmen armazenado por 24 horas. No entanto, nas doses armazenadas por 72 horas, a motilidade espermática melhorou de forma linear à medida que se acrescentou ácido clorogênico.

No presente trabalho, a ação antioxidante do ácido clorogênico pode ter auxiliado na redução do estresse oxidativo, permitindo uma melhor manutenção da funcionalidade celular e da motilidade espermática. Entretanto, em concentrações elevadas, os polifénóis podem ser associados à citotoxicidade celular, já que esses compostos interferem no ciclo celular através do seu potencial redox (Granado-Serrano *et al.*, 2007). Em humanos, Lamirande e Gagnon (1992) observaram que células espermáticas expostas às ERO

apresentaram rápida diminuição da concentração de ATP intracelular, que antecedeu a parada completa da motilidade dos espermatozoides. Segundo Turner (2006), a motilidade espermática é dependente da fosforização de proteínas presentes na cauda por enzimas ATP dependentes o que poderia explicar os resultados.

A adição de ácido clorogênico também melhorou de forma linear a viabilidade espermática do sêmen armazenado por 72 horas. Sabe-se que a produção exarcebada de ERO induz danos celulares que podem reduzir a integridade de membrana, acarretando no aumento de sua permeabilidade que leva a inativação de algumas enzimas, danos ao DNA e morte celular (Marmunti *et al.*, 2012). Nesse caso, a adição de ácido clorogênico foi efetiva no sêmen armazenado por tempo prolongado, quando as defesas naturais ou presentes no diluente não foram capazes de proteger as células contra os danos oxidativos.

Outra estrutura espermática importante é o acrossoma, sendo esta responsável pela fusão do espermatozoide com o oócito (Barros, 2007). A integridade acrossomal, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização. Embora no presente trabalho a adição de ácido clorogênico possa ter reduzido de forma significativa seus valores nas doses inseminantes armazenadas por 24 horas, a dose máxima dessa substância resultou em valores acima de 91,2% de células com acrossoma íntegro, valor considerado bastante elevado. Após 72 horas de armazenamento, houve melhora no número de acrossomas íntegros com a adição de ácido clorogênico, valores estes superiores inclusive aos obtidos com o uso da vitamina E. Funahashi & Sato (2005) relataram melhora na funcionalidade acrossomal em sêmen suíno armazenado a 10°C suplementados com glutatona e cisteína, e atribuíram esse fato à redução das ERO por essas substâncias antioxidantes.

A principal fonte de produção endógena das ERO no organismo são as mitocôndrias, sendo estas responsáveis por aproximadamente 90% da produção

de energia celular a qual ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa (Câmara & Guerra, 2008). As mitocôndrias são responsáveis por manter a motilidade e o metabolismo espermático durante a capacitação.

No presente trabalho, a adição de ácido clorogênico foi capaz de melhorar o número de mitocôndrias em atividade máxima no sêmen suíno resfriado. Com 24 horas de armazenamento, houve melhora em relação ao controle (sem adição de antioxidantes), sendo os resultados semelhantes aos obtidos com a vitamina E. No entanto, às 72 horas de armazenamento, resultados obtidos com a adição de ácido clorogênico foram superiores aos obtidos pela vitamina E. Penã *et al.* (2003) também observaram efeito benéfico da adição de antioxidantes no potencial de membrana mitocondrial, do sêmen suíno descongelado. Esses autores, juntamente com Cummins *et al.* (1994), indicam as mitocôndrias como uma das mais sensíveis estruturas da célula aos danos oxidativos, sendo que os antioxidantes exercem um efeito protetor a essa estrutura.

De uma forma geral, os resultados mostram que os maiores benefícios da adição de ácido clorogênico ao sêmen suíno ocorrem em doses armazenadas por períodos prolongados. Embora a adição exógena de antioxidantes gere resultados positivos, muitos deles promovem melhorias em curto prazo. Assim, a adição de ácido clorogênico às doses inseminantes pode resultar em maiores benefícios em doses inseminantes armazenadas por períodos maiores. Apesar da melhora na qualidade do sêmen suíno com a adição dessa substância, os parâmetros seminais reduziram com o decorrer do período de incubação, independente do tratamento, mostrando a fragilidade do espermatozóide durante o tempo em que permanece armazenado.

Conclusão

A adição de 4500 µg/ml de ácido clorogênico durante o processamento de doses inseminantes de suínos diluídos em BTS é viável para garantir melhor qualidade seminal até 72 horas de armazenamento a 15°C. Além disso, o ácido clorogênico proporcionou melhor proteção aos danos oxidativos em relação a Vitamina E, no sêmen armazenado por três dias.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes (PNPD Institucional), Fapemig (PPM-00460-12), Minitub do Brasil, Fazenda São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFLA pelo apoio concedido.

Referências

- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, and Said TM 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Bio Medicine Online* 8, 616–627.
- Awda BJ, Mackenzie-Bell M and Buhr MM 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction* 81, 553– 561.
- Bixby M, Spieler L, Menini T and Gugliucci A 2005. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences* 77, 345-358.
- Blom E 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility* 1, 176 -177.
- Bonita JS, Mandarano M, Shuta D and Vinson J 2007. Coffee and cardiovascular disease: *In vitro*, cellular, animal and human studies. *Pharmacological Research* 55, 187-198.

Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM and Beconi MT 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63, 2126-2135.

Câmara DR, Guerra MMP 2008. Sperm mitochondria: beyond the synthesis of adenosine triphosphate (ATP). *Brazilian Journal of Animal Reproduction* 32, 93-99.

Cerolini S, Maldjian A, Surai P and Noble R 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science* 58, 99-111.

Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG and Betancourt M. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Archives of Andrology* 49, 287-295.

Cummins JM, Jequier AM and Kan R 1994. Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 345-362.

Darvesh AS, Carroll RT, Bishayee A, Geldenhuys WJ and Van der Schyf CJ 2011. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Review of Neurotherapeutics* 10, 729-745.

Eberhardt M, Lee C and Liu RH 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903-904.

Fulda S, Gorman AM, Hori O and Samali A 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/214074>, published online 20 November 2009.

Funahashi H and Sano T 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology* 63, 1605-16.

Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L and Ramos S 2007. Molecular mechanisms of (-)epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2020-2027.

Haugan T, Reksen O, Grohn YT, Gaustad AH and Hofmo PO 2005. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology* 64, 891–901.

Hoelzl C, Kasmuller S, Wagner K, Elbling L, Huber W, Kager N, Ferk F, Ehrlich V, Nersensyan A, Neubauer O, Desmarchelier A, Marin-Kuan M, Delatour T, Verguet C, Bezençon C, Bessons A, Grathwohl D, Simic T, Kundis M, Schilter B and Cavin C 2010. Instant coffee with high Chlorogenic acid levels protects human against oxidative damage of macromolecules. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 1-12.

Hrudka, F 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology* 10, 809-828.

Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, and Lafay S 2008. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *Journal of Nutrition* 138, 2309–2315.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62,143–72.

Lamirande E and Gagnon C 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology* 13, 368-378.

Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX and Reiter RJ 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Science* 75, 765–790.

Marmunti M, Gutiérrez AM, Gavazza M, Williams S and Palacios A 2012. Susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of fresh boar semen obtained from different hog farms. *Revista Veterinaria* 23, 8-14.

Martín-Hidalgo D, Barón FJ, Bragado MJ, Carmona P, Robina A, García-Marín LJ and Gil MC 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. *Theriogenology* 75, 1550–1560.

Mendez MFB, Zangeronimo MG, Rocha LGP, Faria BG, Pereira BA, Fernandes CD, Chaves BR, Murgas LDS and Sousa RV 2013. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal* Cambridge 7, 793-798.

Ochsendorf FR 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update* 5, 399–420.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M and Rodriguez-Martinez H 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science* 78, 85–98.

Pinart E, Yeste M, Puigmulé M, Barrera X and Bonet S 2013. Acrosin activity is a suitable indicator of boar semen preservation at 17°C when increasing environmental temperature and radiation. *Theriogenology* 80, 234–247.

Pope CE, Zhang YZ and Dresser BL 1991. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22, 87-95.

Roca J, Gil MA, Hernandez I, Parrilla I, Vazquez JM and Martinez EA 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 25, 397–405.

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

Tunncliffe JM and Shearer J 2008. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 33, 1290-1300.

Turner RM 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 25-38.

Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO and Farstad, W 2004. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 62, 1638–1651.

Xu Y, Chen J, Yu X, Tao W, Jiang F, Yin Z and Liu C 2010. Protective effects of Chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice, *Inflammation Research* 59, 871-877.

Tabela 1 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído e incubado a 37° C (n=12).

Variável	Ácido clorogênico (µg/mL)					Vitamina E ¹	CV (%)	Valor de P			
	0	1500	3000	4500	6000			AC	I	AC*I	Vit. E
<i>Motilidade, %</i>											
10 minutos	88,3* [#]	90,4 [#]	92,1 [#]	89,6 [#]	85,6 [#]	89,2 [#]	6,8	<0,01	<0,01	0,45	0,45
50 minutos	84,6*	89,2	91,3	90,0	86,7	88,3					
90 minutos	82,5*	87,1	86,7	89,2	81,7	85,4					
120 minutos	80,5*	82,5	83,8	86,7	81,8	82,1					
<i>Intensidade de movimento,</i>											
10 minutos	3,33	3,50	3,58	3,75	3,17	3,42	-	0,10 [†]			
50 minutos	3,00 b	3,58 ab	3,67 ab	3,75 a	3,25 ab	3,58 ab		0,01			
90 minutos	2,92 b	3,33 ab	3,33 ab	3,67 a	3,25 ab	3,17 ab		0,01			
120 minutos	2,75	3,08	3,17	3,25	2,83	3,08		0,10			
<i>Viabilidade, %</i>											
10 minutos	91,7	91,3	90,8	88,7	89,8	90,6	3,9	0,56	0,17	0,08	0,18
120 minutos	89,3	92,6	91,8	92,6	90,6	88,9					
<i>Integridade de acrossoma, %</i>											
10 minutos	95,4* [#]	96,3 [#]	97,1 [#]	95,9 [#]	95,6 [#]	95,9 [#]	2,1	0,01	<0,01	0,77	0,48
120 minutos	93,4*	95,2	96,1	95,4	94,2	94,9					
<i>Mitocôndrias em atividade máxima, %</i>											
10 minutos	59,8 a ^o	54,5 b ^o	44,3 c ^o	61,5 a	53,7 b ^o	69,5	6,1	<0,01	0,25	0,20	<0,01
120 minutos	61,5 a	55,7 b ^o	46,3 c ^o	65,2 a	50,5 b ^o	69,7					

¹ 200 µg/mL. [†] Valor de P pelo teste de Friedman. * Efeito quadrático para níveis de ácido clorogênico (P<0,05). [#] Efeito linear para tempo de incubação (P<0,05). ^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05). ^o Difere do tratamento adicional (vitamina E) pelo teste Dunnett (P<0,05)

Tabela 2 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído armazenado por 24 horas a 15° C e incubado a 37° C (n=12).

Variável	Ácido clorogênico(µg/mL)					Vitamina E ¹	CV (%)	Valor de P			
	0	1500	3000	4500	6000			AC	I	AC*I	Vit. E
<i>Motilidade, %</i>											
10 minutos	84,2 ^{*#}	85,0 [#]	86,7 [#]	88,3 [#]	85,8 [#]	86,3 [#]	9,1	<0,01	<0,01	0,99	0,17
50 minutos	82,5 [*]	84,2	85,4	86,3	83,8	82,9					
90 minutos	79,6 [*]	81,7	83,8	85,0	79,6	81,3					
120 minutos	76,7 [*]	79,2	79,2	79,2	77,5	78,8					
<i>Intensidade de movimento</i>											
10 minutos	3,17	3,42	3,42	3,58	3,25	3,33		0,19 [†]			
50 minutos	3,25	3,33	3,33	3,58	3,08	3,42		0,26			
90 minutos	2,92	3,08	3,17	3,33	3,08	3,00		0,44			
120 minutos	2,67	2,83	3,08	3,17	2,75	2,92		0,22			
<i>Viabilidade, %</i>											
10 minutos	88,0 [‡]	90,0 [‡]	86,4	87,7	88,3	86,7	4,3	0,17	<0,01	0,07	0,98
120 minutos	83,6 ^{**}	84,7	85,8	86,9	87,6	86,9					
<i>Integridade de acrossoma, %</i>											
10 minutos	95,4 ^{***‡}	95,9 [‡]	93,8 [‡]	94,1 [‡]	93,1 [‡]	95,3 [‡]	3,2	0,04	<0,01	0,88	0,10
120 minutos	93,4 ^{**}	93,8	92,5	91,0	91,2	93,3					
<i>Mitocôndrias em atividade máxima, %</i>											
10 minutos	44,5 c ^ω	62,8 a	55,0 b ^ω	47,5 c ^ω	65,0 a	64,2	8,7	<0,01	0,94	0,93	<0,01
120 minutos	45,0 c ^ω	63,0 a	53,2 b ^ω	47,3 c ^ω	66,8 a	60,3					

¹ 200 µg/mL. [†] Valor de P pelo teste de Friedman. ^{*} Efeito quadrático para níveis de ácido clorogênico (P<0,05). ^{**} Efeito linear para níveis de ácido clorogênico (P<0,05). [#] Efeito linear para tempo de incubação (P<0,05). [‡] Tempo de incubação difere pelo teste F (P<0,05). ^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05). ^ω Difere do tratamento adicional (vitamina E) pelo teste Dunnett (P<0,05).

Tabela 3 – Influência da adição de ácido clorogênico e vitamina E sobre as características do sêmen suíno diluído armazenado por 72 horas a 15° C e incubado a 35° C (n=12).

Variável	Ácido clorogênico (µg/mL)					Vitamina E ¹	CV (%)	Valor de P			
	0	1500	3000	4500	6000			AC	I	AC*I	Vit. E
<i>Motilidade, %</i>											
10 minutos	84,2 [#]	85,0 [#]	86,7 [#]	88,3 [#]	85,8 [#]	86,3 [#]	9,1	<0,01	<0,01	0,99	0,17
50 minutos	82,5 [*]	84,2	85,4	86,3	83,8	82,9					
90 minutos	79,6 [*]	81,7	83,8	85,0	79,6	81,3					
120 minutos	76,7 [*]	79,2	79,2	79,2	77,5	78,8					
<i>Intensidade de movimento</i>											
10 minutos	3,17	3,42	3,42	3,58	3,25	3,33		0,19 [†]			
50 minutos	3,25	3,33	3,33	3,58	3,08	3,42		0,26			
90 minutos	2,92	3,08	3,17	3,33	3,08	3,00		0,44			
120 minutos	2,67	2,83	3,08	3,17	2,75	2,92		0,22			
<i>Viabilidade, %</i>											
10 minutos	88,0 [‡]	90,0 [‡]	86,4	87,7	88,3	86,7	4,3	0,17	<0,01	0,07	0,98
120 minutos	83,6 ^{**}	84,7	85,8	86,9	87,6	86,9					
<i>Integridade de acrossoma, %</i>											
10 minutos	95,4 ^{***‡}	95,9 [‡]	93,8 [‡]	94,1 [‡]	93,1 [‡]	95,3 [‡]	3,2	0,04	<0,01	0,88	0,10
120 minutos	93,4 ^{**}	93,8	92,5	91,0	91,2	93,3					
<i>Mitocôndrias em atividade máxima, %</i>											
10 minutos	44,5 c ^ω	62,8 a	55,0 b ^ω	47,5 c ^ω	65,0 a	64,2	8,7	<0,01	0,94	0,93	<0,01
120 minutos	45,0 c ^ω	63,0 a	53,2 b ^ω	47,3 c ^ω	66,8 a	60,3					

¹ 200 µg/mL. [†] Valores de P pelo teste de Friedman. ^{*} Efeito linear para níveis de ácido clorogênico (P<0,05). [#] Efeito linear para tempo de incubação (P<0,05). [‡] Tempo de incubação difere pelo teste F (P<0,05). ^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem pelo teste SNK (P<0,05). ^ω Difere do tratamento adicional (vitamina E) pelo teste Dunnett (P<0,05)

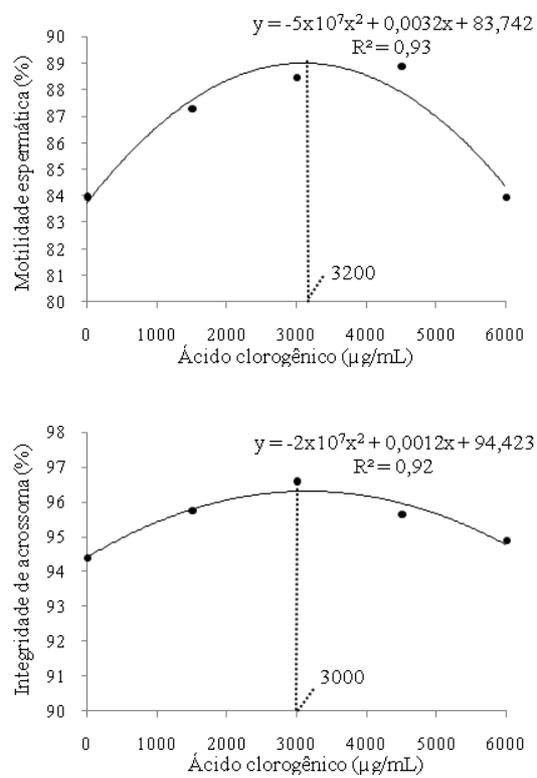


Figura 1 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade e integridade de acrossoma do sêmen suíno diluído e avaliado em diferentes tempos de incubação a 37° C.

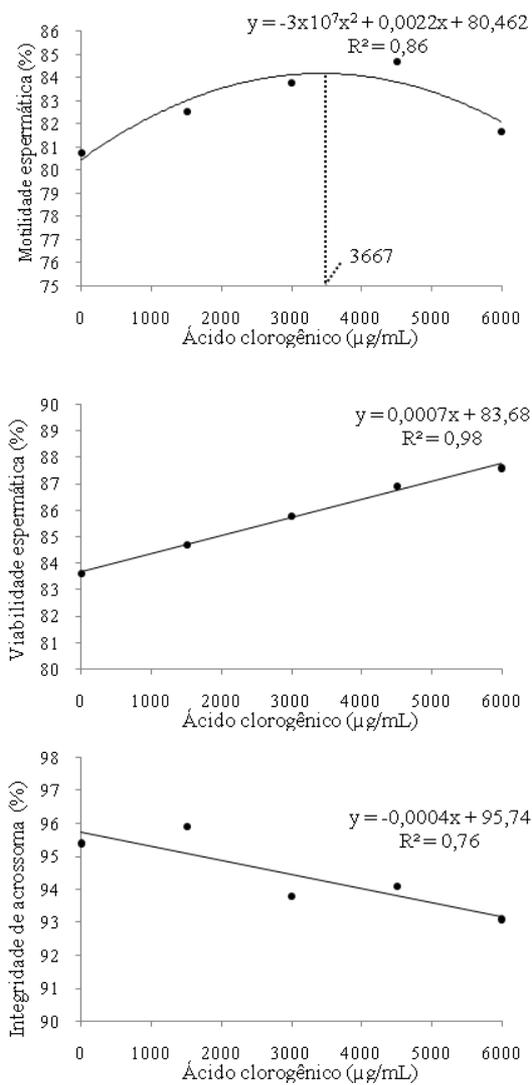


Figura 2 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade espermática, integridade de acrossoma e viabilidade do sêmen suíno diluído e armazenado por 24 horas a 15 °C.

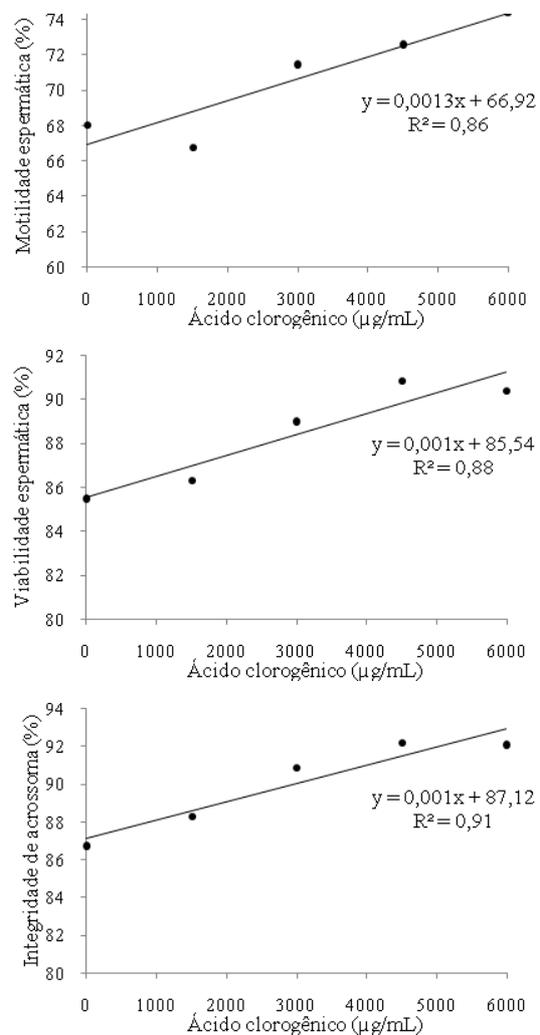


Figura 3 – Efeito do ácido clorogênico sobre a motilidade, viabilidade espermática e integridade de acrossoma do sêmen suíno diluído e armazenado por 72 horas a 15 °C.

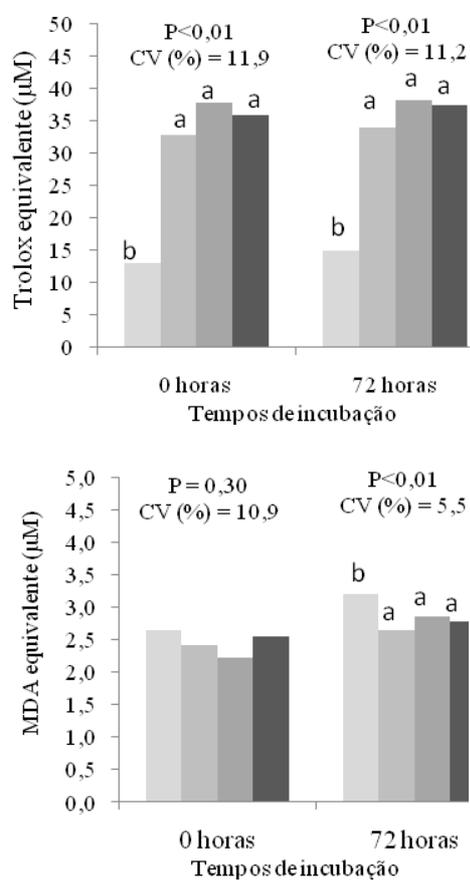


Figura 4 – Efeito do ácido clorogênico sobre a capacidade antioxidante (Trolox equivalente) e concentração de dialdeidomalônico (MDA) no sêmen suíno diluído antes e após 72 horas de armazenamento a 15 °C.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2 **Ácido clorogênico e cafeína na qualidade do sêmen suíno armazenado a 15°C**

B.A. Pereira¹, M.G. Zangeronimo¹, M.C. Teles,

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

Normas da Revista *Journal of Animal Science*.

Resumo

Um experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a adição de cafeína em doses inseminantes de suínos armazenadas a 15 °C, processadas com 4,5 mg/ml de ácido clorogênico. Foram utilizados 10 ejaculados, os quais foram diluídos em (Beltsville Thawing Solution[®]) BTS, formando doses inseminantes de 40 mL com 1,5 bilhões de espermatozoides. Durante o processamento, as doses inseminantes foram adicionadas ou não com 4,5 mg/mL de ácido clorogênico e mantidas em geladeira a 15 °C. Após diferentes tempos de armazenamento (0, 24 e 72 horas), as doses foram incubadas a 37 °C recebendo ou não 8 mM de cafeína. Avaliações seminais foram feitas aos 10 e 120 minutos de incubação. Antes do armazenamento, o ácido clorogênico melhorou a integridade de acrossoma e a atividade mitocondrial, independente da cafeína. A cafeína também aumentou a atividade mitocondrial espermática. Nas doses que não foram suplementadas com ácido clorogênico, a cafeína reduziu a viabilidade. Com 24 horas, houve interação entre as duas substâncias para os parâmetros de viabilidade e acrossoma, sendo que o uso associado de ácido clorogênico e cafeína proporcionaram melhores valores para essas análises. O ácido clorogênico melhorou a motilidade e a atividade mitocondrial independente da cafeína e do tempo de incubação, ao passo que a cafeína só proporcionou maiores valores de atividade mitocondrial aos 10 minutos. Às 72 horas de armazenamento, houve interação entre a cafeína e o ácido clorogênico na motilidade e viabilidade, sendo que o melhor valor desses parâmetros ocorreu quando essas duas substâncias foram utilizadas. Sem a adição de ácido clorogênico a cafeína reduziu a viabilidade espermática. O ácido clorogênico melhorou a integridade acrossomal e a atividade mitocondrial, sendo que esse último parâmetro também foi melhorado pelo uso da cafeína. Com relação ao vigor espermático, o uso de ácido clorogênico não interferiu no parâmetro em

relação ao controle, mas, as doses que receberam cafeína durante o reaquecimento, apresentaram redução do vigor durante a incubação. Ao se avaliar a taxa de degradação da motilidade, as doses suplementadas com ácido clorogênico apresentaram menores perdas de motilidade com a incubação. Não houve influência do ácido clorogênico e da cafeína sobre o consumo de glicose, porém, às 72 horas, o uso isolado da cafeína aumentou quantidade de dialdeidomalônico no plasma seminal, ao passo que o ácido clorogênico reduziu a concentração desse produto. Portanto, a adição de 4,5 mg/ml de ácido as doses inseminantes, associado ao uso de cafeína a 8 mM no reaquecimento seminal, melhora a qualidade do sêmen suíno armazenado por até 72 horas a 15°C.

Palavras chaves: Antioxidantes, ativador metabólico, espermatozoide, inibidores de fosfodiesterase, qualidade seminal, peroxidação lipídica.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a inseminação artificial (IA) com sêmen suíno em preservação líquida em temperatura entre 15 e 18 °C é amplamente utilizada na produção de suínos. Embora a fertilidade do sêmen suíno possa ser mantida nessas condições por 24 a 48 horas, o resfriamento por períodos superiores acarreta em redução da qualidade seminal, devido principalmente ao excesso de espécies reativas ao oxigênio (ERO) produzidas pelo espermatozoide durante o armazenamento (Chatterjee & Gagnon, 2001).

O estresse oxidativo é um importante fator de regulação da viabilidade e funcionalidade espermática (Aitken et al., 2011), já que a peroxidação lipídica induzida pelas ERO altera a estrutura e a função da membrana espermática (Sevanian et al., 1988; Aitken, 1995), gera danos ao DNA (Boe-Hansen et al., 2008), reduz dos níveis de ATP intracelular (Lamirande & Gagnon, 1992) e

reduz a motilidade espermática (Aitken et al., 2012) e a fusão espermatozoide/ovócito (Mammoto et al., 1996). A fim de minimizar esses problemas, trabalhos de adição de antioxidantes aos meios de diluição vêm sendo desenvolvidos (Peña et al., 2003; Agarwal et al., 2004; Mendez et al., 2013). O ácido clorogênico é um polifenol conhecido pela sua capacidade antioxidante *in vitro* devido ao potencial de *scavenge* das ERO (Rice-Evans et al., 1996). O grão de café extremamente rico nesse composto, o qual representa cerca de 10% da matéria seca do grão (Clifford et al., 2005).

Outras substâncias, como as metilxantinas, também vêm sendo utilizadas com a finalidade de melhorar a qualidade espermática e a taxa de fecundação (Li et al., 2011; Nabavi et al., 2013; Yamaguchi et al., 2013). A cafeína está relacionada com o aumento da motilidade espermática *in vitro* (Barkay et al., 1997) devido a sua ação inibidora da fosfodiesterase, enzima responsável pela degradação do AMPc, um segundo mensageiro importante para a motilidade espermática (Marques et al., 2002). No entanto, o aumento da taxa metabólica dos espermatozoides está relacionado ao aumento da produção de ERO, o que prejudicaria a qualidade do sêmen no momento da fecundação.

Nesse sentido, levando em consideração as atividades funcionais do ácido clorogênico e da cafeína, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da adição desses compostos na manutenção da qualidade do sêmen suíno resfriado a 15 °C e armazenado por até 72 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, instalações, coleta do sêmen e delineamento experimental

Foram utilizados dez ejaculados provenientes de três varrões com idade entre um ano e um ano e meio, pertencentes ao Centro Experimental de Suínos localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras

(UFLA), em Lavras, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram mantidos em baias individuais com 3,0 m de comprimento, 2,0 m de largura e 1,30 m de altura, e receberam água “*ad libitum*” e 3,0 kg de ração específica para essa fase dividida em dois arraçoamentos diários. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA, com protocolo número 040/13.

Os ejaculados foram obtidos pelo método da mão enluvada durante a rotina de coleta da granja, sempre às 8h00. Após a coleta, os ejaculados foram encaminhados para o Laboratório de Reprodução de Suínos do Setor de Fisiologia e Farmacologia da UFLA, no qual realizavam-se as avaliações iniciais de motilidade e intensidade do movimento a partir da observação subjetiva de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, patologia espermática e concentração com o auxílio da câmara de Neubauer. Apenas a fração rica do ejaculado foi utilizada.

Após a determinação da concentração, calculou-se o volume do sêmen a conter 1,5 bilhões de espermatozoides. Nesse volume, foi adicionado o diluente BTS (*Beltsville Thawing Solution*[®]) de modo a formar doses inseminantes de 40 mL com 1,5 bilhões de espermatozoides. As doses foram mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz por 60 minutos. De cada ejaculado, foram processadas quatro doses inseminantes que foram distribuídas em delineamento em blocos casualizados (ejaculados) em esquema fatorial 2x2 (com ou sem ácido clorogênico; com ou sem cafeína) em parcela subdividida no tempo (tempo de incubação do sêmen) com dez repetições de um ejaculado cada.

Procedimento experimental

Durante a diluição seminal foram produzidas duas doses inseminantes por ejaculado, sendo que uma dessas doses adicionou-se ácido clorogênico (chlorogenic acid crystalline, C3878 - *Sigma-Aldrich*[®]) na forma a se obter concentração final de 4,5 mg desse antioxidante/ml de sêmen. Em seguida, as

doses foram armazenadas em geladeira a 15 °C. Antes do armazenamento, uma alíquota de 10 mL de cada tratamento (com ou sem ácido clorogênico) foi aquecida em tubos de ensaio em banho-maria a 37 °C, as quais foram adicionadas ou não de cafeína (cafeína puríssima, 533 - *ISO FAR*[®]) a 8,0 mM no sêmen. O mesmo procedimento foi realizado às 24 e 72 horas de armazenamento.

Das amostras de sêmen que permaneceram incubadas, foram retiradas alíquotas para avaliação da qualidade espermática. Aos 10, 60 e 120 minutos de incubação foram feitas avaliações de motilidade e intensidade do movimento espermático. Aos 10 e 120 minutos foram avaliados a integridade da membrana espermática e acrossomal, atividade mitocondrial das células e taxa de consumo de glicose. Aos 60 minutos foram coletadas amostras para determinar a concentração de dialdeidomalônico (MDA) e o potencial antioxidante do plasma seminal.

Avaliações microscópicas

Para avaliar a motilidade espermática, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C. As avaliações foram feitas em microscópio de contraste de fase com aumento de 100 x. Um total de dez campos foram avaliados de forma subjetiva por duas pessoas treinadas, determinando à percentagem de espermatozóides móveis. As análises foram feitas em triplicata e de forma cega. A intensidade de movimento foi avaliado por sistema de escalas de 0 a 5, sendo 0 intensidade fraca e 5 a intensidade máxima.

Com base nos dados obtidos com a motilidade no início e no final do período de incubação, foi calculado a taxa de degradação da motilidade (TDM), de acordo com a seguinte fórmula: $TDM (\%) = \text{motilidade (as 2 horas)} - \text{motilidade (aos 10 minutos)} \times 100$.

A integridade da membrana em porcentagem foi calculada pelo número de células com membranas íntegras em relação ao número total de células contadas. Para isso, uma gota do sêmen foi misturada a uma gota (10µl) de corante eosina-nigrosina (eosina amarela - 205 – *Vetec Química*[®] e solução corante de nigrosina - 43925 - *Sigma-Aldrich*[®] na proporção 1:1), seguindo a metodologia de Bloom (1950). Após esfregaço em lâmina de microscópio, o número de células com membranas íntegras (sem cor) e células mortas (coradas) foi avaliado em microscópio óptico de luz em aumento de 400x.

A atividade mitocondrial foi determinada a partir da incubação do sêmen em meio contendo diaminobenzidina (3,3' - diaminobenzidine - D8001 - *Sigma-Aldrich*[®]) dissolvida em PBS a uma concentração de 1,0 mg/ml e manuseado na ausência de luz. Uma alíquota de 25 µL de sêmen foi adicionada a 725 µL do meio de incubação e colocada em banho-maria a 37 °C durante 60 minutos na ausência de luz. Após a incubação, foi preparado um esfregaço da suspensão que foi fixado em formaldeído a 10% por dez minutos. Após a secagem da lâmina, as células espermáticas foram avaliadas em objetiva de 1000x em microscopia de contraste de fase. A atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides foi classificada seguindo o proposto por Hrudka (1987), sendo que foi determinada a porcentagem de células pertencentes à classe I, ou seja, células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial.

Para análise da integridade acrossomal, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi adicionado em 10 µl de corante simples de POPE (Pope et al., 1991) e mantidos em contato, antes da realização do esfregaço, por 60 segundos. Após esse período, foi confeccionado um esfregaço em lâmina de microscopia, na qual avaliou-se o número de espermatozoides com o acrossoma íntegro (região acrossomal corado de azul) e não íntegro (região acrossomal não corada ou

fracamente corada). A análise foi realizada em microscopia de contraste de fases em aumento de 1000x.

Todas às análises, com exceção da motilidade e da intensidade de movimento, foram realizadas em duplicata de forma cega e pelo mesmo avaliador, o qual realizou a contagem de 200 células.

Avaliações bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas coletou-se em tubos de eppendorf amostras de 1,0 mL, as quais foram centrifugadas a 3360g durante dez minutos. O sobrenadante foi transferido para outros tubos de eppendorf devidamente identificados e foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia das análises.

A glicose no plasma seminal foi avaliada pela metodologia enzimático-colorimétrica, usando o método de ponto final, seguindo as recomendações do fabricante (ANALISA GLICOSE-PP[®] - Belo Horizonte, MG/Brasil). Após a determinação dos valores, subtraiu-se o valor final (120 minutos) do inicial (0 minutos), determinando qual foi a redução dos níveis desse açúcar no meio.

Para avaliar a concentração de dialdeidomalônico (MDA), o Kit QuantiChrom[™] TBARS ASSAY (DTBA- 100- Bioassay Systems - Hayward, CA/EUA) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

Após o teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk), os dados de motilidade e viabilidade espermática, integridade de acrossoma e atividade mitocondrial foram submetidos à análise de variância e as médias dentro de cada fator (caféina e ácido clorogênico) comparadas pelo teste F. Probabilidades menores que 0,05 foram consideradas significativas. Para vigor e taxa de degradação da motilidade foi utilizada análise não paramétrica, sendo as médias

comparadas pelo teste de Friedman. Toda análise estatística foi realizada no programa estatístico Action 2.3.

RESULTADOS

Avaliações Microscópicas

A adição de cafeína no sêmen diluído contendo ou não ácido clorogênico não afetou ($P > 0,05$) a viabilidade e a motilidade espermática (Tabela 1). Houve interação ($P < 0,05$) entre a cafeína e o ácido clorogênico sobre a integridade de acrossoma. Nas doses sem ácido clorogênico, a cafeína reduziu ($P < 0,05$) a porcentagem de acrossomas íntegros aos 10 minutos de incubação, porém, após 2 horas de incubação, a cafeína aumentou esses valores nas doses contendo ácido clorogênico. A cafeína também aumentou ($P < 0,05$) a atividade das mitocôndrias em atividade máxima no sêmen após 2 horas de incubação, independente da presença ou não de ácido clorogênico. O ácido clorogênico, por sua vez, aumentou ($P < 0,05$) a atividade de mitocôndrias e a motilidade espermática nesse tempo de incubação, independente da adição de cafeína. Na presença de cafeína, o ácido clorogênico melhorou ($P < 0,05$) a integridade de acrossoma no sêmen após duas horas de incubação. Ao longo do tempo de incubação, houve perda de motilidade ($P < 0,05$) em todas as doses inseminantes avaliadas, porém, a porcentagem de mitocôndrias em atividade máxima se manteve somente quando cafeína e ácido clorogênico foram associados.

Com relação à adição de cafeína no sêmen armazenado por 24 horas adicionado ou não de ácido clorogênico, observou-se interação ($P < 0,05$) entre essas substâncias na viabilidade espermática e integridade de acrossoma (Tabela 2). Após duas horas de incubação, a cafeína aumentou ($P < 0,05$) a viabilidade nas doses inseminantes que não receberam ácido clorogênico. Porém, quando o ácido clorogênico foi adicionado, houve aumento geral ($P < 0,05$) nesse

parâmetro em ambos os tempos de incubação, independente da adição de cafeína. A integridade de acrossoma do sêmen incubado por 2 horas foi influenciada ($P<0,05$) pelo uso associado da cafeína como o ácido clorogênico, já que essa combinação resultou no aumento na porcentagem de acrossomas íntegros. Para esse parâmetro, a adição isolada dessas substâncias não influenciou os resultados.

A adição de ácido clorogênico aumentou ($P<0,01$) a motilidade espermática independente da adição de cafeína. Entretanto, houve redução ($P<0,05$) da motilidade durante o tempo de incubação, independente da substância adicionada. O ácido clorogênico também aumentou ($P<0,05$) a proporção de mitocôndrias em atividade máxima, independente da adição de cafeína e do tempo de incubação. Já a adição de cafeína melhorou ($P<0,05$) esse parâmetro somente no sêmen incubado por 10 minutos.

Quanto ao sêmen armazenado por 72 horas, houve interação ($P<0,01$) entre cafeína e ácido clorogênico na motilidade e viabilidade espermática (Tabela 3). Com 10 minutos de incubação, a cafeína melhorou ($P<0,05$) a motilidade das doses inseminantes sem ácido clorogênico, mas piorou ($P<0,05$) quando o antioxidante foi utilizado. Esse mesmo efeito não foi observado após 2 horas de incubação. O ácido clorogênico melhorou ($P<0,05$) a motilidade em todos os tempos de incubação avaliados, independente do uso da cafeína. Quanto à viabilidade, houve menores valores ($P<0,05$) após a adição de cafeína, exceto nas doses contendo ácido clorogênico. O ácido clorogênico, por sua vez, melhorou a viabilidade e, somente quando utilizado de forma isolada, manteve esses valores por até duas horas de incubação. A adição dessa substância também melhorou ($P<0,05$) a integridade de acrossoma e a porcentagem de mitocôndrias em atividade máxima, sendo que essa última teve suas características mantidas por até 2 horas de incubação. Nesse tempo de avaliação, as doses adicionadas de cafeína tiveram ($P<0,05$) maior porcentagem de

mitocôndrias em atividade máxima, independente da presença ou não de ácido clorogênico.

Quanto ao vigor, não houve efeito da cafeína e ácido clorogênico quando comparados entre si (Tabela 4). Após 2 horas de incubação, as doses adicionadas de cafeína tiveram menor vigor quando comparadas ao tempo inicial de avaliação (10 minutos), o que não aconteceu com as doses controle ou adicionadas somente de ácido clorogênico.

Durante o tempo de incubação, menores taxas de degradação de motilidade foram observadas ($P < 0,01$) quando o ácido clorogênico foi utilizado, independente do uso de cafeína (Figura 1). Por outro lado, a cafeína de forma isolada aumentou essas taxas.

Avaliações bioquímicas

Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre o ácido clorogênico e a cafeína sobre a peroxidação lipídica. Essas substâncias influenciaram ($P < 0,05$) a concentração de dialdeidomalônico no plasma seminal, somente às 72 horas de armazenamento. Nesse período, a adição de cafeína a 8,0 mM no reaquecimento das doses não suplementadas com ácido clorogênico aumentou ($P < 0,05$) a concentração de dialdeidomalônico. A concentração desse produto da peroxidação lipídica foi inferior ($P < 0,05$) nas doses que receberam 4,5 mg/ml de ácido clorogênico, independente do uso da cafeína.

Com relação ao consumo de glicose, não foi observada interação ($P > 0,05$) entre o ácido clorogênico e a cafeína sobre esse parâmetro (Figura 3). Além disso, essas substâncias também não influenciaram a taxa de consumo de glicose pelos espermatozoides, independente do tempo de armazenamento.

DISCUSSÃO

Atualmente, o maior desafio das tecnologias reprodutivas é manter a qualidade do sêmen suíno resfriado por tempo prolongado. Essa redução da qualidade espermática está relacionada com os danos oxidativos as estruturas celulares (Schulte et al., 2009), e ao desgaste metabólico durante o armazenamento, já que a temperatura de preservação entre 15 e 18 °C não interrompe totalmente o metabolismo espermático.

Efeitos antioxidantes *in vitro* de diferentes polifenóis sobre a função espermática têm sido estudados por vários pesquisadores (Feng et al., 2005; Branco et al., 2010; Martin-Hidalgo, et al., 2013; Wittayarat et al., 2013), a maioria deles relatando a capacidade *scavenger* dessas substâncias. Com relação às taxas metabólicas seminais, o uso da cafeína durante o reaquecimento seminal tem proporcionado aumento da motilidade espermática (López; Almariño, 2000; Yeste et al., 2008; Carrington et al., 2011).

Estudos anteriores realizados demonstraram que a adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico durante o processamento das doses inseminantes (B.A. Pereira, *dados não publicados*), e de 8mM de cafeína durante o reaquecimento seminal (Nunes, 2013), melhoram a qualidade seminal do sêmen suíno armazenado a 15°C. No presente trabalho, o uso de cafeína nas doses armazenadas por 72 horas, suplementadas com ácido clorogênico durante o processamento das mesmas, apresentou melhora na motilidade espermática. Nos outros tempos de armazenamento, não houve interação entre o ácido clorogênico e a cafeína, sendo que, de uma forma geral, a suplementação do meio diluidor seminal com 4,5 mg/ml gera um aumento no motilidade espermática. Nesses períodos a cafeína isoladamente não interfere na motilidade.

Sabe-se que os espermatozoides apresentam elevadas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados na membrana, além de apresentar quantidade limitada de citoplasma celular, no qual as enzimas e substâncias antioxidantes são encontradas, o que resulta na elevada sensibilidade às ERO (Cerolini et al., 2000; Sikka 1996; Henkel, 2005). Desta forma, a presença de substâncias antioxidantes no plasma seminal (ou diluente), dentre elas o ácido clorogênico, são responsáveis por remover uma grande parte destas substâncias nocivas (Mendez et al., 2013), que geram dano celular e prejudicam os parâmetros seminais. Vários estudos demonstram que a adição de antioxidantes ao diluidor seminal melhora a motilidade espermática (Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Michael et al., 2009)

Além do efeito de antioxidantes sobre a motilidade espermática, estudos indicam que a cafeína também apresenta a capacidade de melhorar esse parâmetro através do aumento das concentrações intracelulares de AMPc (Yeste et al., 2008; Carrington et al., 2011), já que várias vias metabólicas espermáticas, como a da motilidade, são dependentes desse segundo mensageiro (Qu et al., 2007). Milani et al. (2010) observaram que a adição de 7,5mM de cafeína ao sêmen canino descongelado aumentou os valores de velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de cabeça (ALH) e a motilidade total. Entretanto, este aumento das concentrações intracelulares de AMPc está associado com o incremento na taxa metabólica celular e com a produção de radicais livres, que poderia reduzir o tempo de viabilidade do sêmen durante a incubação. Assim, uma vez que o ácido clorogênico tenha sido incorporado nas vias de defesas antioxidantes celular, pode haver uma redução da peroxidação lipídica e os danos causados à integridade da célula espermática, mantendo a viabilidade espermática por mais tempo.

Avaliando os dados referentes à peroxidação lipídica, observou-se redução das concentrações de MDA equivalente no sêmen armazenado por 72

horas, nas amostras que receberam 4,5 mg/ml de ácido clorogênico durante o processamento, indicando menor grau de peroxidação lipídica. Esses dados demonstram que o ácido clorogênico pode atuar nas vias de defesas antioxidantes espermáticas, reduzindo os danos gerados pelas ERO. A não obtenção de resultados no sêmen fresco sugere que as substâncias antioxidantes presentes no espermatozóide, assim como no plasma seminal e nos diluentes utilizados para o preparo das doses inseminantes, são capazes de proteger a célula espermática do dano oxidativo por períodos curtos de armazenamento.

Ao contrário do efeito protetor do ácido clorogênico, o uso da cafeína em doses que não receberam esse antioxidante, aumentou as concentrações plasmáticas de MDA às 72 horas de armazenamento. Esse resultado pode estar associado ao aumento da taxa metabólica gerada pela cafeína, já que essa substância é capaz de aumentar a taxa de fosforilação oxidativa celular (Schoff & Lardy, 1987), via pela qual ocorre a maior formação de radicais livres. Apesar desse indício do aumento da taxa metabólica espermática, a cafeína não alterou o consumo de glicose pelos espermatozóides.

Além de ação sobre a motilidade espermática, de uma forma geral, a adição de cafeína no reaquecimento de doses suplementadas com ácido clorogênico aumentou a viabilidade espermática do sêmem resfriado. Entretanto, o efeito contrário foi observado quando a cafeína foi utilizada em doses que não receberam esse antioxidante no processamento. Apesar de o ácido clorogênico influenciar na resposta da cafeína sobre a integridade de membrana, o contrário não ocorreu, já que independente do uso de cafeína no reaquecimento, o ácido clorogênico proporcionou melhores valores de viabilidade espermática. Esse fato indica que o efeito protetor dos danos na membrana do espermatozóide está associado à atividade antioxidante do ácido clorogênico. O ataque oxidativo sobre a membrana gera danos a esta estrutura que acarreta na alteração da fluidez da membrana plasmática, interferindo na atividade enzimática, e na

funcionalidade dos canais iônicos (Aitken et al, 1989), reduzindo portanto a viabilidade espermática.

A membrana acrossomal também está susceptível a danos que ocorrem durante o armazenamento seminal, sendo que a integridade acrossomal, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização. No presente trabalho essa variável foi influenciada somente pela adição de ácido clorogênico ao meio diluidor, o qual melhorou a integridade do acrossoma do sêmen suíno armazenado. Funahashi & Sano (2005) relataram melhora na funcionalidade acrossomal em sêmen suíno armazenado a 10°C suplementados com glutathione e cisteína, e atribuíram esse fato à redução das ERO por essas substâncias antioxidantes.

A integridade das estruturas celulares é fundamental para manter a funcionalidade espermática, é a redução do estresse oxidativo, através do uso de antioxidantes, auxilia nesse processo, melhorando a qualidade da dose seminal (Maia et al., 2009; Wittayarat et al., 2013). A manutenção das funções espermáticas também é dependente do status metabólico do espermatozóide, já que a atividade celular ocorre a partir do consumo de substratos energéticos obtidos no plasma seminal. A via da fosforilação oxidativa é fundamental para a manutenção da motilidade e para a capacitação espermática na espécie suína (Albarracin, et al., 2004; Ramió-Lluch et al., 2013). Dessa forma, a atividade mitocondrial espermática torna-se um parâmetro de avaliação importante. Com relação aos dados obtidos nesse estudo, não foi observado interação entre a cafeína e o ácido clorogênico sobre a atividade mitocondrial. A cafeína foi capaz de aumentar o número de mitocôndrias com atividade máxima, mesmo nas doses que não foram suplementadas com ácido clorogênico. Há evidências que a fosforilação de algumas enzimas mitocondriais mediadas pelo AMPc desempenha papel regulatório da fosforilação oxidativa (Acin-Perez et al.,

2009). Portanto, o aumento intracelular desse segundo mensageiro poderia aumentar a atividade mitocondrial através do estímulo da fosforilação oxidativa.

Ao mesmo tempo em que a energia gerada pelas mitocôndrias é essencial para a funcionalidade espermática (Ramió-Lluch et al., 2013), essa organela é a principal fonte de produção endógena das ERO no organismo. Assim como o uso da cafeína durante o reaquecimento, a adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico ao diluidor seminal também aumentou o número de mitocôndrias com atividade máxima. Apesar do resultado obtido por essas substâncias ter sido o mesmo, o mecanismo pelo qual isso ocorreu é diferente. Enquanto a cafeína estimula metabolicamente a atividade enzimática mitocondrial, o ácido clorogênico protege essa organela dos danos oxidativos, promovendo boas condições para o desempenho de suas funções. Penã et al. (2003) também observaram efeito benéfico da adição de antioxidantes no potencial de membrana mitocondrial, do sêmen suíno descongelado, sendo que esses autores, juntamente com Cummins et al. (1994), indicam as mitocôndrias como uma das mais sensíveis estruturas da célula aos danos oxidativos, sendo que os antioxidantes exercem um efeito protetor a essa estrutura.

De forma geral, os dados indicam que a adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico no diluidor seminal e de 8 mM de cafeína no momento da reativação espermática, influencia positivamente a qualidade do sêmen suíno armazenado. O ácido clorogênico, devido a sua atividade antioxidante, protege a célula espermática do estresse oxidativo, reduzindo os danos as estruturas celulares. Consequentemente, devido a maior integridade estrutural espermática, o espermatozóide desempenha melhor suas funções, resultando em melhores parâmetros seminais. Diferentemente, a cafeína influencia a atividade metabólica celular, agindo principalmente sobre a motilidade espermática e a atividade mitocondrial. A ação da cafeína ocorre através da inibição da fosfodiesterase, promovendo um aumento intracelular de AMPc, o qual está

envolvido em várias vias de fosforilação protéica que regulam a atividade celular.

CONCLUSÃO

A adição de 4,5 mg/ml de ácido clorogênico durante o processamento de doses inseminantes de suínos diluídos em BTS[®], associado ao uso de cafeína a 8 mM durante o reaquecimento seminal, melhora a qualidade seminal do sêmen suíno armazenado por até 72 horas a 15°C.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Capes (PNPD Institucional), Fapemig (PPM-00460-12), Minitub do Brasil, Fazenda São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFLA pelo apoio concedido.

REFERÊNCIAS

Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R., and Manfredi, G. 2009. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 3:265-276.

Aitken, R.J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 7:659–668.

Aitken, R.J., and Curry, B.J. 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal.* 14:367–381.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 41:183–197.

Aitken, R.J., Gibb, Z., Mitchell, L.A., Lambourne, S.R., Connaughton, H.S., and De Iuliis, G.N. 2012. Sperm Motility Is Lost In Vitro as a Consequence of Mitochondrial Free Radical Production and the Generation of Electrophilic Aldehydes but Can Be Significantly Rescued by the Presence of Nucleophilic Thiols. *Biology of Reproduction.* 87:1–11.

Albarracín, J.L., Fernández-Novell, J.M., Ballester, J., Rauch, M.C., Quintero-Moreno, A., Peña, A., Mogas, T., Rigau, T., Yañez, A., Guinovart, J.J., Slebe, J.C., Concha, I.I., and Rodríguez-Gil, J.E. 2004. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biology of Reproduction,* 71:1437–1445.

Barkal, J. Zuckerman, H., Sklan, D., and Gordon, S. 1997. Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fertility and Sterility.* 28:175-177.

Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., and Ball, B.A. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 57:1025-1033.

Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., and Sirad, M.A. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology.* 57:1105-1122.

Blom, E. 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*. 1:176 -177.

Boe-Hansen, G.B., Christensen, P., Vibjerg, D., Nielsen, M.B., and Hedeboe, A.M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69:728-36.

Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. and Noble, R. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 58:99–111.

Chatterjee, S., and Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*. 59:451-458.

Clifford, M.N., Knight, S., and Kuhnert, N. 2005. Discriminating between the

six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem*. 53:3821–

3832.

Cummins, J.M., Jequier, A.M., and Kan, R. 1994. Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Reprod*. 37:345–362.

Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. and Samali, A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2010/214074>.

Funahashi, H., and Sano, T. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*. 63:1605–16.

Henkel, R. R. The impact of oxidants on sperm function. 2005. *Andrologia*, 37:205-206.

Hrudka, F. 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology*. 10:809-828.

Lamirande, E., and Gagnon, C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl*. 13:379–386.

Li, J.C., Yamaguchi, S., Kondo, Y., and Funahashi, H. 2011. Caffeine, dibutyl cyclic-AMP and heparin affect the chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils for boar sperm in vitro. *Theriogenology*. 75:1336-1345.

López, F.J., and Alvarino, J.M.R. 2000. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Reproduction Science, Amsterdam*, 58:147-154.

Maia, M.S., Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Sicherle, C.C., Sousa, D.B., and Rodello, L. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res*. 85:85-90.

Mammoto, A., Masumoto, N., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M., Tasaka, K., and Miyake A. 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod.* 55:1063–1068.

Marques, A., Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C., Gobesso, A.A.O., and Neves Neto, J.R. 2002. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved sêmen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology.* 58:257-260.

Martin-Hidalgo, D. Llera, A.H., Henning, H., Wallner, U., Waberski, D., Bragado1, M.J., Gill, M.C., and Garcia-Marin, L.J. 2013. The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C. *Journal of Agricultural Science.* 5:2013.

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

Michael, A.J., Alexopoulos, C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina, D.J., Saratsis, P., Ververidis, H.N., and Boscós, C.M. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 112:119–135.

Milani, C., Fontbonne, A., Sellem, E., Stelletta, C., Gérard, O., and Romagnoli S. 2010. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. ***Theriogenology***, 74:2010.

Nabavi, N., Todehdehghan, F., and Shiravi, A. 2013. Effect of caffeine on motility and vitality of sperm and in vitro fertilization of outbred mouse in T6 and M16 media. *J Reprod Med.* 11:741–746.

Nunes, M.B. 2013. Adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado e descongelado. 2012. PhD Diss. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science.* 78:85–98.

Pope, C.E., Zhang, Y.Z. and Dresser, B.L. 1991. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 22:87-95.

Qu, F., Ying, X., Guo, W., Guo, Q., Chen, G., Liu, Y., and Ding, Z. 2007. The role of Zn-a2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. *Reproduction.* 134:569–576.

Ramió-Lluch, L., Yeste, M., Fernández-Novell, J.M., Efrén, E., Rocha, L., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Concha, I.I., Ramírez, A., and Rodríguez-Gil, J.E. 2013. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. *Reproduction, Fertility and Development*, <http://dx.doi.org/10.1071/RD13145>.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933–956.

Roca, J., Vázquez, J.M., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Martínez, E.A. 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim*, 41:43–53.

Schulte, R.T., Ohl, D.A., Sigman, M. and Smit, G.D. 2010. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 27:3–12.

Schoff, P.K., Lardy, H.A. 1987. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 37:1037-1046.

Sevanian, A., Wratten, M.L., McLeod, L.L., and Kim, E. 1988. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim Biophys Acta*. 961:316–327.

Sikka, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. 1996. *Frontiers in Bioscience*, 1:78-86.

Wittayarat, M., Ito, A., Kimura, T., Namula, Z., Luu, V.V., Do, L.T., Sato, Y., Taniguchi, M., and Otoi, T. 2013. Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5 °C. *Reproductive Biology*, v.13, n.3, p.251–254.

Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badía, E., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Casas, I. and Bonet, S. 2008. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 degrees C. *Anim Reprod Sci*, 109:236–250.

Tabela 1 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.

Tempo de Incubação	Ácido clorogênico	Cafeína		SEM	P =		
		sem	Com		CF	AC	CF x AC
- <i>Motilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	81,0 *	82,5 *	1,03	0,23	<0,0 1	0,24
	com	82,0 *	84,5 *				
2 horas	sem	72,5 A	71,0 A				
	com	79,0 B	81,0 B				
- <i>Viabilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	92,8	92,7	0,74	0,14	0,22	0,28
	com	93,6	94,3				
2 horas	sem	93,2	91,4				
	com	93,3	92,3				
- <i>Integridade de acrossoma (%)</i> -							
10 minutos	sem	97,1 a	96,0 Ab	0,32	0,79	<0,0 1	<0,01
	com	97,8 *	98,3 B				
2 horas	sem	96,3	95,4 A				
	com	96,8 b	98,0 Ba				
- <i>Mitocôndrias em atividade máxima (%)</i> -							
10 minutos	sem	38,6 Aa*	40,7 b*	0,40	<0,01	<0,0 1	0,59
	com	40,2 B*	41,2				
2 horas	sem	36,5 Aa	38,5 Ab				
	com	38,5 Ba	40,8 Bb				

* Período de incubação difere pelo teste F (P<0,05)

^{a,b} Dentro de cada tempo de incubação, médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste F (P<0,05)

Tabela 2 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 35 °C.

Tempo de Incubação	Ácido clorogênico	Cafeína		SEM	P =		
		sem	com		CF	AC	CF x AC
- <i>Motilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	72,5 A*	73,5 A*	1,40	0,37	<0,01	0,90
	com	78,5 B*	79,0 B*				
2 horas	sem	61,5 A	59,0 A				
	com	73,5 B	71,0 B				
- <i>Viabilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	89,4 A*	88,6 A*	0,70	0,41	<0,01	0,01
	com	93,1 B*	91,2 B*				
2 horas	sem	81,4 Aa	83,7 Ab				
	com	90,0 B	89,1 B				
- <i>Integridade de acrossoma (%)</i> -							
10 minutos	sem	93,8	95,3 *	0,62	0,07	<0,01	0,04
	com	95,0 *	95,8				
2 horas	sem	92,7	91,0 A				
	com	92,5 a	94,3 Bb				
- <i>Mitocôndrias em atividade máxima (%)</i> -							
10 minutos	sem	38,4 Aa	40,9 Ab*	0,49	<0,01	<0,01	0,88
	com	41,2 Ba*	43,2 Bb*				
2 horas	sem	37,6 A	38,7 A				
	com	39,6 B	41,0 B				

* Período de incubação difere pelo teste F (P<0,05)

^{a,b} Dentro de cada tempo de incubação, médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste F (P<0,05)

Tabela 3 – Qualidade de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 35 °C.

Tempo de Incubação	Ácido clorogênico	Cafeína		SEM	P =		
		sem	com		CF	AC	CF x AC
- <i>Motilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	57,5 Aa*	61,5 Ab*	1,00	0,34	<0,01	<0,01
	com	70,5 Ba*	67,0 Bb*				
2 horas	sem	47,5 A	46,5 A				
	com	64,0 B	61,5 B				
- <i>Viabilidade espermática (%)</i> -							
10 minutos	sem	81,6 a*	76,7 Ab*	0,81	<0,01	<0,01	<0,01
	com	83,4	83,8 B*				
2 horas	sem	76,2 Aa	73,7 Ab				
	com	81,4 B	80,9 B				
- <i>Integridade de acrossoma (%)</i> -							
10 minutos	sem	89,8 A*	90,4 A*	0,41	0,15	<0,01	0,18
	com	92,3 B*	91,8 B*				
2 horas	sem	88,5 Aa	85,8 Ab				
	com	90,2 B	90,6 B				
- <i>Mitocôndrias em atividade máxima (%)</i> -							
10 minutos	sem	35,4 Aa*	37,4 Ab*	0,47	<0,01	<0,01	0,49
	com	37,8 B	39,1 B				
2 horas	sem	33,1 Aa	35,5 Ab				
	com	36,6 Ba	38,6 Bb				

* Período de incubação difere pelo teste F (P<0,05)

^{a,b} Dentro de cada tempo de incubação, médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste F (P<0,05)

Tabela 4 – Vigor espermático de doses inseminantes de suínos adicionadas de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico, avaliado após diferentes tempos de armazenamento e em diferentes tempos de incubação a 35 °C.

Tempo de armazenamento a 15 °C	Tempo de incubação	Controle	Cafeína	Ácido Clorogênico	C+A	P =
Antes	10 minutos	4,00	4,70 a	3,90	4,60 a	<0,01
	2 horas	3,00	2,80 b	3,00	2,80 b	
24 horas	10 minutos	3,00	4,20 a	3,00	4,10 a	<0,01
	2 horas	2,60	2,00 b	2,80	2,30 b	
72 horas	10 minutos	2,60	3,60 a	2,80	3,50 a	<0,01
	2 horas	2,00	1,90 b	2,10	1,90 b	

^{a,b} Dentro de cada tempo de armazenamento, médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste de Friedman (P<0,01).

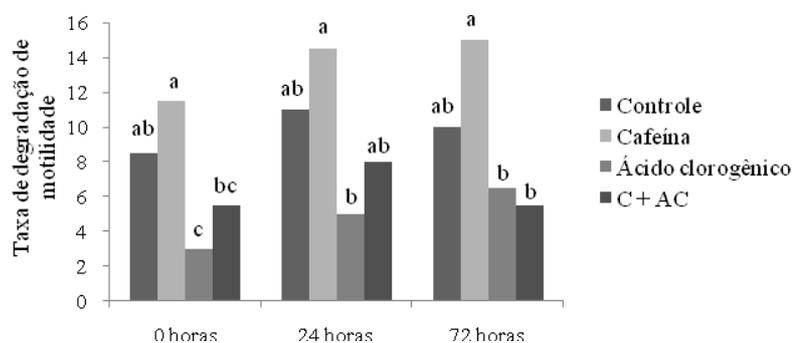


Figura 1 – Taxa de degradação da motilidade do sêmen suíno adicionado de cafeína (C) ou ácido clorogênico (AC) após diferentes tempos de armazenamento. Colunas seguidas de letras diferentes dentro do tempo diferem pelo teste de Friedman (P<0,05)

Tabela 5 – Peroxidação lipídica do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico em diferentes tempos de armazenamento.

Ácido clorogênico	Cafeína		SEM	P =		
	sem	com		CF	AC	CF x AC
<i>Antes do Armazenamento</i>						
sem	2,27	2,05	0,0978	0,68	0,88	0,55
com	2,1	2,15				
<i>Depois do Armazenamento</i>						
sem	5,17 bA	5,93 aA	0,1494	0,01	<0,01	0,66
com	4,33 B	4,88 B				

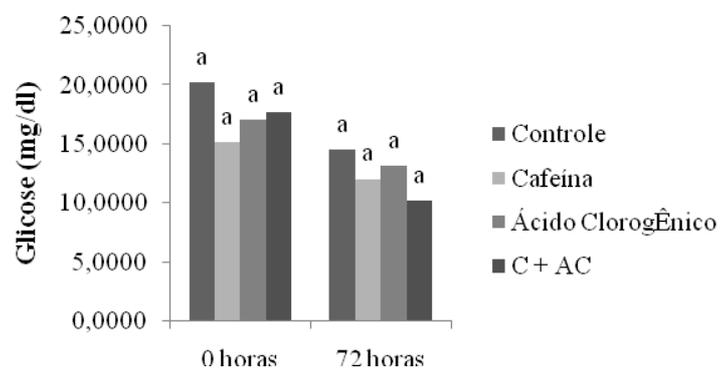


Figura 2 – Consumo de glicose (mg/dL) antes e depois de 72 horas de armazenamento após adição de cafeína (C) e ácido clorogênico.(AC). Colunas seguidas de letras iguais dentro do tempo não diferem pelo teste de Friedman (P<0,05)

(VERSÃO PRELIMINAR)

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	75
Tabela 2	A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	76
Tabela 3	A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77
Tabela 4	A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77
Tabela 5	A Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77
Tabela 6	A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	75

Tabela 7	A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	76
Tabela 8	A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77
Tabela 9	A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77
Tabela 10	A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	75
Tabela 11	A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	76
Tabela 12	A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C.	77

- Tabela 13 A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C. 77
- Tabela 14 A Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C. 77

ANEXO A

Tabela 1A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	4862,8125	540,3125	30,977	82,349
Cafeína	1	25,3125	25,3125	1,451	1,436
Ácido Clorogênico	1	475,3125	475,3125	27,251	21,371
Caf*AC	1	25,3125	25,3125	1,451	0,733
Erro 1	27	470,9375	17,4421		
Incubação	1	877,8125	877,8125	82,349	0,0000
Incub*Caf	1	15,3125	15,3125	1,436	0,2385
Incub*AC	1	227,8125	227,8125	21,371	0,0000
Incub*Caf*AC	1	7,8125	7,8125	0,733	0,3976
Erro 2	36	383,7500	10,6597		

CV 1(%)= 5,27

CV 2(%)= 4,12

Tabela 2A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	34,5500	3,8388	1,449	0,2173
Cafeína	1	6,0500	6,0500	2,283	0,1424
Ácido Clorogênico	1	4,4500	4,4500	1,453	0,2221
Caf*AC	1	3,2000	3,2000	1,208	0,2815
Erro 1	27	71,5500	2,6500		
Incubação	1	12,8000	14,4500	2,278	0,1400
Incub*Caf	1	14,4500	12,8000	2,571	0,1175
Incub*AC	1	2,4500	2,4500	0,436	0,5133
Incub*Caf*AC	1	5,6843	5,6843	2,134	0,1678
Erro 2	36	202,3000	5,6194		

CV 1(%) = 1,72

CV 2(%) = 2,25

Tabela 3A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	38,0125	4,2236	2,613	0,0258
Cafeína	1	0,1125	0,1125	0,070	0,7939
Ácido Clorogênico	1	46,5125	46,5125	28,779	0,0000
Caf*AC	1	17,1125	17,1125	10,588	0,0031
Erro 1	27	43,6375	1,6162		
Incubação	1	9,1125	9,1125	8,854	0,0052
Incub*Caf	1	1,0125	1,0125	0,984	0,3279
Incub*AC	1	0,0125	0,0125	0,012	0,9129
Incub*Caf*AC	1	0,3125	0,3125	0,304	0,5850
Erro 2	36	37,0500	1,0291		

CV 1(%)= 1,31

CV 2(%)= 1,05

Tabela 4A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	14,0000	1,5555	0,597	0,7877
Cafeína	1	68,4500	68,4500	26,289	0,0000
Ácido Clorogênico	1	51,2000	51,2000	19,664	0,0001
Caf*AC	1	0,8000	0,8000	0,307	0,5839
Erro 1	27	70,3000	2,6037		
Incubação	1	51,2000	51,2000	31,508	0,0000
Incub*Caf	1	1,8000	1,8000	1,108	0,2996
Incub*AC	1	6,0500	6,0500	3,723	0,0616
Incub*Caf*AC	1	2,4500	2,4500	1,508	0,2275
Erro 2	36	58,5000	1,6250		

CV 1(%)= 4,10

CV 2(%)= 3,24

Tabela 5A Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após o processamento, avaliadas em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	11	1.8183	0.1653	0.287	0.9841
Cafeína	1	0.0940	0.0940	0.163	0.6886
Ácido Clorogênico	1	0.0117	0.0117	0.020	0.8874
Caf*AC	1	0.2034	0.2034	0.353	0.5562
Erro 1	33	18.9934	0.5755		

CV 1(%) = 35,44

Tabela 6A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	5631,5625	625,7291	33,811	0,0000
Cafeína	1	15,3125	15,3125	0,827	0,3711
Ácido Clorogênico	1	1575,3125	1575,3125	85,120	0,0000
Caf*AC	1	0,3125	0,3125	0,017	0,8976
Erro 1	27	499,6875	18,5069		
Incubação	1	1852,8125	1852,8125	93,780	0,0000
Incub*Caf	1	52,8125	52,8125	2,673	0,1108
Incub*AC	1	195,3125	195,3125	9,886	0,0033
Incub*Caf*AC	1	0,3125	0,3125	0,016	0,9006
Erro 2	36	711,2500	19,7569		

CV 1(%)= 6,05

CV 2(%)= 6,25

Tabela 7A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	22.8125	2.5347	0.829	0.5956
Cafeína	1	2.1125	2.1125	0.691	0.4131
Ácido Clorogênico	1	515.1125	515.1125	168.506	0.0000
Caf*AC	1	23.1125	23.1125	7.561	0.0105
Erro 1	27	82.5375	3.0569		
Incubação	1	409.5125	409.5125	84.074	0.0000
Incub*Caf	1	21.0125	21.0125	4.314	0.0450
Incub*AC	1	74.1125	74.1125	15.216	0.0004
Incub*Caf*AC	1	5.5125	5.5125	1.132	0.2945
Erro 2	36	175.3500	4,87083		

CV 1(%) = 1,98

CV 2(%) = 2,50

Tabela 8A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37°C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	25.5500	2.8388	1.382	0.2444
Cafeína	1	7.2000	7.2000	3.506	0.0720
Ácido Clorogênico	1	28.8000	28.8000	14.023	0.0009
Caf*AC	1	9.8000	9.8000	4.772	0.0378
Erro 1	27	55.4500	2.0537		
Incubação	1	110.4500	110.4500	28.606	0.0000
Incub*Caf	1	6.0500	6.0500	1.567	0.2187
Incub*AC	1	2.4500	2.4500	0.635	0.4309
Incub*Caf*AC	1	22.0500	22.0500	5.711	0.0222
Erro 2	36	139.0000	3,3611		

CV 1(%)= 1,53

CV 2(%)= 2,09

Tabela 9A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 24 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	4,8000	0,5333	0,229	0,9873
Cafeína	1	61,2500	61,2500	26,250	0,0000
Ácido Clorogênico	1	110,4500	110,4500	47,336	0,0000
Caf*AC	1	0,0500	0,0500	0,021	0,8847
Erro 1	27	63,0000	2,3333		
Incubação	1	57,8000	57,8000	23,753	0,0000
Incub*Caf	1	5,0000	5,0000	2,055	0,1604
Incub*AC	1	0,8000	0,8000	0,329	0,5700
Incub*Caf*AC	1	0,8000	0,8000	0,329	0,5700
Erro 2	36	87,6000	2,4333		

CV 1(%)= 3,81

CV 2(%)= 3,89

Tabela 10A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	2561,2500	284,5833	23,196	0,0000
Cafeína	1	11,2500	11,2500	0,917	0,3468
Ácido Clorogênico	1	3125,0000	3125,0000	254,717	0,0000
Caf*AC	1	101,2500	101,2500	8,253	0,0078
Erro 1	27	331,2500	12,2685		
Incubação	1	1711,2500	1711,2500	169,945	0,0000
Incub*Caf	1	20,0000	20,0000	1,986	0,1673
Incub*AC	1	211,2500	211,2500	20,979	0,0001
Incub*Caf*AC	1	45,0000	45,0000	4,469	0,0415
Erro 2	36	362,5000	10,0694		

CV 1(%)= 5,89

CV 2(%)= 5,33

Tabela 11A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	45,0125	5,0013	2,220	0,0529
Cafeína	1	70,3125	70,3125	31,205	0,0000
Ácido Clorogênico	1	567,1125	567,1125	251,687	0,0000
Caf*AC	1	66,6125	66,6125	29,563	0,0000
Erro 1	27	60,8375	2,2532		
Incubação	1	221,1125	221,1125	33,779	0,0000
Incub*Caf	1	2,8125	2,8125	0,430	0,5163
Incub*AC	1	15,3125	15,3125	2,339	0,1349
Incub*Caf*AC	1	13,6125	13,6125	2,080	0,1579
Erro 2	36	235,6500	6,5458		

CV 1(%) = 1,88

CV 2(%) = 3,21

Tabela 12A Análise de variância para integridade de acrossoma do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37°C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	77,3000	8,5888	3,134	0,0103
Cafeína	1	6,0500	6,0500	2,207	0,1489
Ácido Clorogênico	1	135,2000	135,2000	49,330	0,0000
Caf*AC	1	5,0000	5,0000	1,824	0,1880
Erro 1	27	74,0000	2,7407		
Incubação	1	105,8000	105,8000	62,955	0,0000
Incub*Caf	1	7,2000	7,2000	4,284	0,0457
Incub*AC	1	8,4500	8,4500	5,028	0,0312
Incub*Caf*AC	1	22,0500	22,0500	13,121	0,0009
Erro 2	36	60,5000	1,6805		

CV 1(%)= 1,84

CV 2(%)= 1,44

Tabela 13A Análise de variância para mitocôndrias em atividade máxima do sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	9	50,0625	5,5625	1,749	0,1260
Cafeína	1	74,1125	74,1125	23,298	0,0000
Ácido Clorogênico	1	143,1125	143,1125	44,990	0,0000
Caf*AC	1	1,5125	1,5125	0,475	0,4964
Erro 1	27	85,8875	3,181019		
Incubação	1	43,5125	43,5125	19,691	0,0001
Incub*Caf	1	1,5125	1,5125	0,684	0,4135
Incub*AC	1	7,8125	7,8125	3,536	0,0682
Incub*Caf*AC	1	0,1125	0,1125	0,051	0,8228
Erro 2	36	79,5500	2,2097		

CV 1(%)= 4,86

CV 2(%)= 4,05

Tabela 14A Análise de variância para concentração de MDA no sêmen suíno adicionado de diferentes combinações de cafeína e ácido clorogênico após 72 horas de armazenamento, avaliada em diferentes tempos de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor de P
Bloco	11	9,11132	0,8283	1,082	0,4042
Cafeína	1	5,16796	5,1679	6,753	0,0139
Ácido Clorogênico	1	10,66438	10,6643	13,936	0,0007
Caf*AC	1	0,14355	0,1435	0,188	0,6677
Erro 1	33	25,25260	0,7652		

CV 1(%) = 17,23