

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

RICARDO OLIMPIO SCHENATTO

USO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO

PORTO ALEGRE, RS

2017

RICARDO OLIMPIO SCHENATTO

USO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin.

PORTO ALEGRE, RS

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Schenatto, Ricardo Olimpio
Uso da N-acetil-L-cisteína no resfriamento de
sêmen equino / Ricardo Olimpio Schenatto. -- 2017.
46 f.
Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. garanhão. 2. sêmen. 3. N-acetil-L-cisteína. 4.
antioxidante. 5. viabilidade. I. Rubin, Mara Iolanda
Batistella, orient. II. Título.

RICARDO OLIMPIO SCHENATTO

USO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin.

Porto Alegre, 21 de dezembro de 2017.

Prof^ª. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dra. Adriana Pires Neves
Membro da comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da comissão

Prof^ª. Dra. Mari Lourdes Bernardi
Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida por sempre me acompanhar na conquista de grandes desafios e por ter colocado em minha vida pessoas fundamentais.

Aos meus pais, Odemir e Terezinha, ao meu irmão e sua família pelo apoio incondicional.

À Professora e orientadora Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade, pelos ensinamentos, suporte, incentivo e amizade durante todos esses anos.

À minha namorada Mariane Ceretta Sonego pelo carinho, amizade, compreensão e total apoio, te amo.

Aos colegas de Pós-Graduação Janislene Mach Trentin, Ana Paula Martini, Eliana Burtet Parmeggiani, Fabiano Trevisan da Rocha, Laurence Boligon de Araujo, Luis Augusto Machado Centeno, Mariani Farias Fiorenza e Rômulo Oliveira Fernandes da Silva por terem contribuído no meu aprendizado profissional.

Aos estagiários do EMBRYOLAB/UFSM pela amizade e colaboração fundamental na realização do experimento.

Ao Professor Dr. Flávio De La Corte e à Professora Dra. Karin Érica Brass pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos pela oportunidade.

Aos demais verdadeiros amigos, que de uma forma ou de outra contribuíram para que esta etapa fosse alcançada.

Muito obrigado!

RESUMO

USO DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO RESFRIAMENTO DE SÊMEN EQUINO

Autor: Ricardo Olimpio Schenatto

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da N-acetil-L-cisteína (NAC), adicionada ao diluente composto de leite em pó desnatado, sobre a viabilidade espermática e o estresse oxidativo do sêmen equino resfriado a 5°C. Ejaculados de 8 pôneis da raça Brasileira foram coletados em triplicata resultando em 24 ejaculados. O sêmen foi distribuído em 4 grupos: Equidil® + 0,00 mM (controle), 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de NAC. As amostras foram armazenadas em tubos de 15mL e mantidas em caixas de transporte de sêmen BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu-SP, Brasil). Parâmetros como motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor, pH, resposta ao teste hiposmótico (HOST) e atividade mitocondrial (MTT) foram avaliados nas 24 e 48 h, bem como no sêmen fresco, após a diluição. O vigor, MT e MP foram também avaliados após teste de termorresistência (TTR), na ausência e presença de peróxido. A MT, a MP, o vigor espermático e a MTT foram similares ($P > 0,05$) entre as concentrações de NAC, nas 24 e 48 h. A resposta ao HOST foi semelhante entre as concentrações de NAC ($P > 0,05$) nas 24 h de resfriamento, porém nas 48 h ocorreu diminuição da funcionalidade da membrana no grupo NAC 2,5 mM em comparação ao grupo EQUIDIL, sem adição de NAC. A MT, a MP e vigor, das amostras resfriadas por 24 h e submetidas ao TTR, diferiu entre sem e com peróxido ($P < 0,05$) nos grupos Equidil, 0,5 mM e 1,0 mM, mas foi similar na concentração de 2,5 mM de NAC. Quando o sêmen foi resfriado por 48 h, houve diferença no vigor e MT entre amostras com e sem peróxido ($P < 0,05$), em todos os grupos testados, mas a MP foi similar entre amostras com e sem peróxido, na concentração 2,5 mM. O pH do diluente Equidil® foi o maior e os grupos Equidil + 0,5 mM e 1,0 mM tiveram valores intermediários, enquanto a concentração de 2,5 mM de NAC gerou valores mais baixos, nos três momentos avaliados ($P < 0,05$). Não houve variação significativa de pH entre os momentos 0 e 24 h ($P = 0,7075$) e entre 0 e 48 h ($P = 0,4617$), em todos os grupos testados. As concentrações de NAC testadas não melhoraram a motilidade, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e resposta ao HOST de espermatozoides equinos resfriados a 5°C e armazenados por 48 h. Após TTR, as concentrações de NAC testadas não evitaram a diminuição da motilidade e vigor espermático, na presença de peróxido.

Palavras-chave: Garanhão; Sêmen; Motilidade; N-acetil-L-cisteína.

ABSTRACT**USE OF N-ACETYL-L-CYSTEINE ON THE COOLED EQUINE SEMEN**

Author: Ricardo Olimpio Schenatto

Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin

The aim of this study was to evaluate the effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) based on skim milk powder extender on sperm viability and oxidative stress of equine semen cooled to 5°C. Ejaculate of 8 ponies of the Brazilian breed were collected in triplicate, resulting in 24 ejaculates, distributed in 4 groups: Equidil® extender + 0.00mM (control), 0.5mM, 1.0mM and 2.5mM of NAC with the semen samples were The samples were stored in 15mL tubes and kept in BotuFLEX® semen transport boxes (Botupharm, Botucatu/SP/Brazil). Parameters, such as motility, vigor, pH, osmolarity, HOST, and MTT were evaluated at 24 and 48 h of cooling also in fresh semen. Vigor, total (TM) and progressive motility (PM) were also evaluated after thermoresistance test (TTR), in the absence and presence of peroxide. TM, PM, sperm vigor and MTT were similar ($P > 0.05$) between NAC concentrations at 24 and 48 h. The response to HOST was similar between NAC concentrations ($P > 0.05$) at 24 h cooling, but at 48 h there was a decreased in membrane functionality in 2.5mM NAC group compared to the EQUIDIL group. TM, PM, and vigor of the samples cooled by 24 h and submitted to TTR differed between without and with peroxide ($P < 0.05$) in the EQUIDIL, 0.5mM and 1.0mM groups, but was similar in 2.5mM NAC. After cooling for 48 h, there was difference in vigor and TM between samples with and without peroxide ($P < 0.05$) in all groups tested, but the PM was similar between samples with and without peroxide at concentration 2.5mM of NAC. The pH of the EQUIDIL extender was higher and the EQUIDIL + 0.5mM and 1.0mM groups had intermediate values, while the 2.5mM NAC concentration generated lower values in the three evaluated periods ($P < 0.05$). There was no significant variation of pH between 0 and 24 h ($P=0.7075$) and between 0 and 48 h ($P=0.4617$) in all groups tested. The concentrations of NAC tested did not improve motility, plasma membrane integrity, mitochondrial activity and response to HOST equine spermatozoa cooled to 5°C and stored for 48 h. After TTR, the concentrations of NAC tested did not prevent the decrease of motility and sperm vigor in the presence of peroxide.

Keywords: Stallion; Semen; Motility; N-acetyl-l-cysteine

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias e desvio padrão de motilidade total e progressiva do sêmen de pôneis da raça Brasileira nos grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína, avaliado a fresco (0h), 24 h e 48 h resfriado a 5°C.....	29
Tabela 2	Médias e desvios padrão do vigor, teste hiposmótico e atividade mitocondrial no sêmen de pôneis da raça brasileira dos grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína, avaliados a fresco, 24 h e 48 h resfriado a 5°C.....	30
Tabela 3	Motilidade espermática total e progressiva de pôneis da raça Brasileira em diluente à base de leite em pó desnatado (Equidil®) com 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de N-acetil-L-cisteína com e sem peróxido resfriado a 5°C e incubados em banho-maria a 37°C por 4 h.....	32

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Valores de pH durante o resfriamento de sêmen de pôneis da raça Brasileira em diluente à base de leite em pó desnatado (Equidil) no grupo controle e grupos com 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína (NAC) , avaliado a fresco (0 h) e resfriado por 24 ou 48 h a 5°C. a,b,c indicam diferença entre as concentrações de NAC, nos diferentes momentos de avaliação (P < 0,05)..... **31**
- FIGURA 2** Valores de vigor após teste de termorresistência por 4 h a 37°C com diferentes concentrações de N-Acetil-L-cisteína (NAC) das amostras resfriadas a 5°C por 24 e 48 h do sêmen de pôneis da raça Brasileira. a,b indicam diferença entre sem e com peróxido, dentro de cada concentração de NAC (P < 0,05)..... **31**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mM	Milimolar
NAC	N-Acetil-L-Cisteina
°C	Graus Celsius
MTT	Atividade mitocondrial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
pH	Potencial de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
h	Hora
%	Porcentagem
mOsm/L	Miliosmois por litro
10⁶	Milhões
°C/m	Graus Celsius por minuto
ROS	Reactive oxygen species
AV	Artificial vagina
g	Gramas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
M	Mol
HOST	Teste hiposmótico
TM	Total motility
PM	Progressive motility
SP	Seminal plasma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Inseminação Artificial.....	14
2.2 Espermatozoides e membrana plasmática.....	15
2.3 Plasma seminal.....	15
2.4 Diluentes de sêmen.....	16
2.5 Temperatura e curva de resfriamento.....	17
2.6 Motilidade e vigor.....	18
2.7 pH e osmolaridade do sêmen.....	19
2.8 Funcionalidade da membrana – Teste hiposmótico.....	20
2.9 Atividade mitocondrial – Teste de MTT.....	20
2.10 Antioxidantes utilizados na refrigeração.....	21
2.11 Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs)	21
2.12 Uso de N-Acetil-L-Cisteína.....	22
3 ARTIGO.....	23
4 COMITÊ DE ÉTICA.....	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O uso da inseminação artificial (IA) em equinos e o transporte de sêmen equino aumentou em todo o mundo nos anos de 1970 e 80, embora ainda existam algumas associações de raças que não registram potros resultantes de inseminações com sêmen transportado (KATILA, 1997). Diferente de outras espécies animais, os equinos são selecionados para se tornar reprodutores após terem tido uma carreira vitoriosa, terem sido campeões em grandes prêmios, independentemente se seu sêmen é adequado para o resfriamento e congelamento ou até mesmo se o sêmen é fértil. Sabe-se que nem todos os garanhões podem ser utilizados para a produção de sêmen com o intuito de resfriamento, já que a fertilidade terá um decréscimo quando o seu sêmen é processado, resfriado e transportado. Isto está relacionado com a composição do plasma seminal (BRINSKO et al., 2000).

Segundo Jasko et al. (1992), a fertilidade do sêmen resfriado se mantém por 24 a 48 h sem perdas significativas. O próprio garanhão é um dos principais fatores que afetam a longevidade dos espermatozoides durante o armazenamento e o transporte. Os garanhões são classificados em bons ou ruins conforme a adequação de seu sêmen para o processo de refrigeração e transporte (BRINSKO et al., 2000). Além disso, a qualidade do sêmen, da composição do plasma seminal e da membrana espermática (AURICH, 2005) são parâmetros essenciais para categorizá-los.

Nos últimos anos, a cisteína e precursores de glutatona foram objeto de estudo como antioxidantes para prevenir perdas da motilidade espermática de mamíferos (FUNAHASHI e SANO, 2005; MICHAEL et al., 2007). A N-acetil-L-cisteína (NAC) foi suplementada ao sêmen de aves com melhoria dos parâmetros espermáticos em armazenamento por 24 e 48 h a 5°C na concentração de 15 mM (PARTYKA et al., 2015). A adição de NAC revelou resultados satisfatórios nas concentrações 0,5 mM e 1,0 mM, respectivamente, no sêmen canino (MICHAEL et al., 2010) e suíno (WHITAKER et al., 2012), enquanto que em equinos não apresentou melhora na integridade da membrana e na motilidade com concentrações que variaram entre 0,209 e 20,0 mM, mantendo 10% de plasma seminal (PS) (PAGL et al., 2006) e com a total remoção do PS, (REGHINI et al., 2011).

Em pesquisa recente, Rodrigues et al. (2016) adicionaram as concentrações 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM de NAC ao diluente, mantendo 50% de plasma seminal com o objetivo de avaliar o efeito da NAC sobre a motilidade progressiva, funcionalidade da membrana

e dispersão da cromatina espermática. Nas avaliações a fresco (0), 24 e 48 h refrigerado a 5°C não foram verificados resultados positivos sobre os referidos parâmetros.

Estudos sobre a concentração ideal a ser adicionada ao sêmen equino para manter a qualidade seminal e a proteção ao estresse oxidativo durante o resfriamento ainda são escassos e resta esclarecer sua eficiência. O presente estudo foi conduzido para avaliar, se mantendo 20% de PS o efeito de diferentes concentrações da NAC sobre a viabilidade espermática e estresse oxidativo do sêmen equino resfriado a 5°C é positivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A tecnologia de resfriamento de sêmen teve grande impacto sobre a indústria da reprodução equina, especialmente ao longo dos últimos anos, com a aceitação do uso de sêmen resfriado pela maioria das raças equinas (LOOMIS, 2006). A taxa de fertilidade do sêmen refrigerado pode ser alterada por fatores incluindo diferenças inerentes não só à variação individual entre garanhões, mas também à metodologia de processamento e refrigeração do sêmen, além do diluente de sêmen utilizado (AURICH, 2008; NUNES et al., 2008).

2.1 Inseminação artificial

A inseminação artificial (IA) é uma prática utilizada em todo o mundo, em todas as espécies de animais e vem aumentando o seu uso em animais de companhia e animais selvagens (AURICH, 2012). A IA é uma técnica básica e essencial para outras biotecnologias, desde transferência de embriões até clones.

Os primeiros programas de IA foram iniciados no final do século 19 na Rússia, pioneira em conduzir IA em animais domésticos. O cientista Elia Iwanoff não foi o pioneiro a realizar a IA em equinos, mas foi o primeiro a conduzir experimentos controlados nos quais as éguas eram inseminadas com pipetas de borracha e seringas (AURICH, 2012).

Nas décadas de 60 e 70, houve uma modificação no uso dos animais, ou seja, animais até então utilizados somente no campo passaram a ser utilizados na modalidade esportiva. Naquele período ocorreu importante aumento da aplicação da IA e os avanços do uso de sêmen bovino foram utilizados para aprimorar o uso de sêmen equino (AURICH, 2012). Em muitos países, o aumento drástico do uso de IA em equinos se deu nos anos de 1980. Na Alemanha e França, a IA em equinos se tornou possível aos criadores pela oferta dos serviços estatais ainda disponíveis (AURICH e AURICH, 2006) na atualidade.

Segundo Alvarenga et al. (2003), estima-se que somente 30 a 40% dos garanhões produzem sêmen de boa qualidade para o processo de congelamento. Tendo em vista que pequena porcentagem de garanhões toleram o congelamento de sêmen, o resfriamento vem sendo a principal alternativa para a sua conservação. Apesar de apresentar curto

tempo de conservação quando comparado com o congelamento, o sêmen resfriado tem uma maior viabilidade no trato uterino e conseqüentemente maior taxa da fertilidade.

2.2 Espermatozoide e membrana plasmática

Os espermatozoides são células altamente especializadas em armazenar e transportar material genético, que tem habilidades de motilidade e fertilização do óvulo (AURICH, 2005). Qualquer dano à membrana plasmática é irreversível e causa um decréscimo na motilidade e na capacidade de fertilização. Na ejaculação e no trato genital feminino os espermatozoides estão sujeitos a danos de membrana e até morte celular, sendo que dos bilhões do ejaculado, apenas algumas centenas chegarão ao oviduto (MORRIS et al., 2000). A membrana plasmática do espermatozoide é heterogênea e consiste em cinco áreas específicas: acrossoma, segmento equatorial, região basal, parte intermediária e a cauda (LADHA, 1998). As diferenças entre essas regiões estão diretamente ligadas a sua função fisiológica especializada. Antes e depois da ejaculação a membrana plasmática passa várias mudanças (GADELLA et al., 2001).

Segundo Jasko et al. (1992), o simples processamento do sêmen para armazenamento e inseminação artificial pode danificar a membrana plasmática do espermatozoide. O sêmen armazenado a 5°C por 24 h tem a mesma eficiência que o sêmen fresco. No entanto, o sêmen com mais tempo de armazenamento diminui drasticamente a taxa de motilidade e fertilidade. Os processos de peroxidação lipídica da membrana plasmática do esperma podem causar a perda da motilidade e da capacidade de fertilização (AITKEN, 1994; STOREY, 1997).

2.3 Plasma seminal

O plasma seminal (PS) é uma mistura de fluidos provenientes dos testículos epidídimos e principalmente das glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e glândula bulbouretral). Embora muitos estudos bioquímicos já tenham sido publicados sobre PS, ainda não é totalmente compreendido a sua real função fisiológica (KARESKOSKI e KATILA, 2008). Em um ejaculado, um garanhão pode ter de seis a nove frações de sêmen, sendo que as três primeiras contêm 70% do total de espermatozoides (KOSINIAK, 1975). A composição do PS varia em cada fração, pois as glândulas acessórias liberam seus fluidos em uma ordem específica.

O plasma seminal contém vários antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, a total remoção pode aumentar a suscetibilidade dos espermatozoides as EROs devido a remoção de antioxidantes presentes no PS (WAHEED et al., 2013). O estudo desenvolvido por Brinsko et al. (2000) revelou que após centrifugação e remoção parcial do plasma seminal, a motilidade progressiva aumentou e limitou a redução da mesma de ganhões com dificuldade de resfriamento, após 48 h de resfriamento e armazenamento.

Sob condições fisiológicas em monta natural, o sêmen é ejaculado diretamente no lúmen uterino e a exposição do espermatozoide ao plasma seminal é bem menor após coleta de sêmen com vagina artificial (WALTON, 1960 apud AURICH, 2008). Sabe-se que altas concentrações de plasma seminal em sêmen equino resfriado /armazenado é deteriorante para a motilidade e fertilidade (JASKO et al., 1992). Por outro lado, com diluente a remoção completa do plasma seminal não melhora a sua vida útil, mas existem indicativos consistentes de que 5% a 20% de plasma seminal deve ser mantido após a centrifugação (JASKO et al., 1992; LOOMIS, 2006).

Pesquisas na linha humana revelaram o potencial do plasma seminal através do aumento das taxas de prenhez em programas de fertilização *in vitro* e em ICSI (VON WOLFF et al., 2009). Muitas moléculas presentes no plasma seminal podem se ligar a receptores específicos em células localizadas no trato reprodutivo da fêmea e ativar mudanças em expressão gênica, levando a uma modificação na composição celular, estruturas e funções nos tecidos locais até mesmo em tecidos distantes do útero, por exemplo, ovário. A composição do plasma seminal pode influenciar na estabilidade da membrana, mas estudos do efeito dos compostos do plasma seminal na função do sêmen são contraditórios (PICKETT et al., 1975; BAAS et al., 1983; VARNER et al., 1987; JASKO et al., 1992).

2.4 Diluentes de sêmen

O uso do diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozoide equino durante seu armazenamento (BATELLIER et al., 1997). Os esforços para melhorar a preservação do sêmen equino resfriado têm sido centrados na alteração dos diluentes, bem como na inclusão de componentes específicos adicionados para manter a integridade da membrana, prevenir o estresse oxidativo ou preservar a motilidade dos espermatozoides (SAMPER, 2000).

Não é possível preservar sêmen por mais de duas horas sem a adição de diluente. Os diluentes prolongam a vida dos espermatozoides pela estabilização dos sistemas enzimáticos mantendo a integridade da membrana, protegem o espermatozoide do meio ambiente desfavorável, choques de temperatura, efeitos do plasma seminal, dos produtos tóxicos produzidos pelo próprio espermatozoide, previne o crescimento de micro organismos e aumenta o volume da dose inseminante (PICKETT e AMANN, 1987). Os diluentes devem ser aquecidos e adicionados ao sêmen imediatamente após a coleta do ejaculado e entre 3 a 5 minutos após a coleta para avaliação da concentração e da motilidade (BRINSKO e VARNER, 1992 apud KATILA, 1997).

A maioria dos diluentes de sêmen para diluição, centrifugação, resfriamento e armazenamento são à base de leite ou de gema de ovo (VARNER et al., 1989; JASKO et al., 1992). Além de diluir o plasma seminal, um efeito positivo do diluente é controlar o pH e osmolaridade e fornecimento de energia (PAGL et al., 2006). Os diluentes de sêmen deveriam ter uma pressão osmótica compatível com a do sêmen e um pH próximo de neutro. A osmolaridade do plasma seminal equino é aproximadamente 300 mOsm/L (PICKETT et al., 1976). A ótima osmolaridade de um diluente depende da combinação dos reagentes e da proporção de eletrólitos (PICKETT e AMANN, 1987). Os diluentes disponíveis comercialmente tem osmolaridade entre 250 e 400 mOsm/L (KATILA, 1997). Valores de osmolaridade abaixo de 200 e acima de 400 mOsm/L são deletérios aos espermatozoides. O pH espermático varia de 7,4 a 7,6 e um pouco acima no segundo ejaculado coletado uma hora após o primeiro. A maioria dos diluentes à base de leite tem um pH de 6,6, podendo variar de 6,5 a 7,0 (PICKETT e AMANN, 1987).

Os diluentes mais utilizados na conservação de sêmen refrigerado são os que contêm leite, principalmente o leite em pó desnatado (KENNEY et al., 1975) pela sua praticidade. O diluente desenvolvido com proteínas purificadas do leite compostas com sais de Hank (INRA96) resultaram em melhores taxas de prenhez quando o sêmen foi mantido a 15°C. A vantagem atribuída a esses resultados foram que a purificação das proteínas eliminou as que causam danos aos espermatozoides, principalmente as que agem em temperaturas mais altas de armazenamento (BATELLIER et al., 1998).

2.5 Temperatura e curvas de resfriamento

O resfriamento do sêmen equino para o transporte e subsequente inseminação artificial, tornou-se generalizado na indústria equina. Durante o resfriamento os

espermatozoides passam por uma rápida mudança de temperatura e passam pelo chamado “choque térmico pelo frio” (WATSON et al., 1987). Isso ocorre quando alguns lípidos específicos da membrana plasmática passam por mudanças estruturais devido à redução da temperatura (QUIN, 1985; QUIN, 1989 e PARKS e LYNCH, 1992 apud MORAN et al., 1992). Jasko (1994) recomenda que padrões mínimos sejam definidos para o ejaculado ser submetido à refrigeração, como concentração espermática maior que 60×10^6 espermatozoides/ml e motilidade progressiva maior que 40% após a diluição.

O espermatozoide equino pode sofrer danos irreversíveis durante o resfriamento rápido, similar aos já citados em outras espécies (JASKO et al., 1992); esses danos são conhecidos como “choque térmico pelo frio” e incluem o decréscimo da motilidade, metabolismo e perdas da proteína intracelular e enzimas. A adição de gema de ovo ao sêmen tem mostrado um efeito protetor contra o choque térmico pelo frio.

O Equitainer® (Hamilton-Thorn) é o equipamento mais utilizado mundialmente para transporte de sêmen. O sistema oferece uma média de resfriamento menor que $0,03^\circ\text{C}/\text{m}$ e a temperatura fica entre 4 e 6°C , que pode ser mantida por mais de 36 h (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). Os referidos pesquisadores demonstraram a possibilidade da remessa de sêmen em Equitainer® com obtenção de alta taxa (91%) de concepção.

O estudo realizado por Katila (1997) com sêmen equino evidenciou que os espermatozoides ficam mais susceptíveis à faixa de temperatura entre 19 e 8°C , pois coincidem com a mudança do estado físico de diversos ácidos graxos presentes na membrana plasmática (AMANN e GRAHAM, 1993). O controle gradual de temperatura necessária deve obedecer à redução de temperatura $< 1,0^\circ\text{C}/\text{min}$ e, preferencialmente, $-0,03$ a $-0,05^\circ\text{C}/\text{min}$, entre 20 e 5°C , parece ser a mais indicada por minimizar as alterações físico-químicas e estruturais da membrana plasmática causadas pelo frio (KAYSER et al., 1992).

2.6 Motilidade e Vigor

A motilidade espermática é importante porque é prontamente avaliada e reflete vários aspectos essenciais do metabolismo espermático e deve ser avaliada em conjunto com outros parâmetros ao estimar o potencial de fertilização dos espermatozoides (KATILA, 2001).

A avaliação espermática convencional em microscópio óptico avalia a motilidade (progressiva e local), morfologia espermática e, também, a velocidade de movimento dos espermatozoides (VARNER, 2008). A avaliação da motilidade espermática pode ser realizada com sêmen puro ou previamente diluído, sendo considerada um teste laboratorial fundamental para estimar/julgar a provável capacidade fertilizante deste ejaculado. A avaliação do sêmen puro mostra a real funcionalidade do sêmen em seu próprio fluido, mas por outro lado pode ser de difícil avaliação pela alta concentração espermática causando aglutinação. É de fundamental importância o uso de uma platina aquecedora para lâminas acoplada ao microscópio para ter um resultado fidedigno. Nesta avaliação se estima a porcentagem da motilidade total e motilidade progressiva e o vigor (velocidade de movimento).

A motilidade do sêmen é extremamente suscetível a condições ambientais, tais como excesso de frio ou calor, lubrificantes, luz, desinfetantes e também à osmolaridade e ao pH do diluente utilizado no sêmen. Por esses motivos, é necessário proteger o sêmen do efeito de tais fatores antes da análise (VARNER, 2008).

2.7 pH e osmolaridade do sêmen

O pH do ejaculado equino varia entre 7,4 e 7,6 (PICKETT e AMANN, 1987). O pH de diluente nesta faixa é tolerado sem efeitos prejudiciais. Durante o armazenamento, bactérias e contaminantes que podem estar no sêmen podem produzir metabólitos que vão causar uma mudança no pH do diluente. O pH interno do espermatozoide está diretamente relacionado com o pH do diluente (GATTI et al., 1993; JONES e BAVISTER, 2000) e, novamente, correlacionado com a motilidade espermática (JONES e BAVISTER, 2000).

Quando o pH do sêmen é drasticamente reduzido, a motilidade e o metabolismo espermático por consequência também são reduzidos (GADEA, 2003). O principal metabólito responsável pela diminuição do pH do sêmen é o ácido lático (produzido pelo metabolismo glicolítico do esperma) que pode ser utilizado como indicador de qualidade do sêmen (RIGAU et al., 1996). A pesquisa conduzida por Wendt et al. (2002) com avaliação do pH em amostras de sêmen equino revelou que a motilidade média após 24 h tende a ser maior em pH 6,6-6,8 comparado com médias em pH 7,4-7,8 após armazenamento em Equitainer®.

O sêmen equino tem osmolaridade aproximada de 300 mOsm/L. A osmolaridade dos diluentes pode variar de 250 a 400 mOsm/L sem causar perdas significativas. Segundo Aurich (2011), diluentes com a osmolaridade próxima de 350 mOsm/L mostram melhores resultados de longevidade do sêmen. De acordo com a teoria osmótica, quando as condições se alteram, ocorre o movimento da água até a pressão osmótica do citoplasma se equilibrar com a pressão osmótica externa (SIEME et al., 2008). Pommer et al. (2002) mostraram que a viabilidade espermática pode cair abaixo de 60% quando o sêmen é exposto a um diluente com osmolaridade de 150 mOsm.kg⁻¹.

2.8 Funcionalidade da membrana – Teste hiposmótico

O teste hiposmótico foi desenvolvido inicialmente com a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides humanos (JEYENDRAN et al., 1984). Este teste verifica o percentual de células espermáticas que apresentam membrana funcional quando submetidas a uma solução hipotônica compreendida entre 25 e 150 mOsm/kg H₂O. Nesta condição ocorre edemaciamento do flagelo em células viáveis e, conseqüentemente, o dobramento da cauda. O método é simples e de fácil execução, sendo amplamente utilizado com sucesso nas avaliações rotineiras de sêmen equino (NIELD et al., 2000), continuando até a presente data por ser fidedigno.

A membrana plasmática do espermatozoide tem por característica permitir o transporte de moléculas de forma seletiva, o qual provoca aumento de volume ou edema do espermatozoide, visível na cauda (DREVIUS, 1972). Assim, a capacidade da cauda espermática enrolar na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando que a membrana está intacta (DREVIUS e ERIKSSON, 1966). Portanto, o enrolamento da cauda pode ser relacionado à funcionalidade da membrana da cabeça. A pesquisa de Jeyendran et al. (1984) evidenciou que há correlação positiva entre caudas enroladas e penetração em oócitos de hamsters.

2.9 Atividade mitocondrial – Teste de MTT

A viabilidade mitocondrial é avaliada em espermatozoides equinos através do Teste do 3- (4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; AZIZ et al., 2005). O MTT é um sal tetrazólio amarelo solúvel em água. Em mitocôndrias ativas,

o sistema de succinato desidrogenase converte o corante em uma forma insolúvel em água, por meio da clivagem redutora do seu anel de tetrazólio formando o cristal de formazan, de coloração púrpura (NASR-ESFAHANI et al., 2002). Assim, a quantidade de formazan formada pode ser determinada através de espectrofotômetro que fornece uma estimativa do número de mitocôndrias e, portanto, o número de células vivas na amostra (AZIZ et al., 2005; AZIZ, 2006).

2.10 Antioxidantes utilizados na refrigeração

Estudos conduzidos na década de 90 apontam que o uso de antioxidantes melhora a viabilidade espermática (BILODEAU et al., 2001; BALL et al., 2001; MICHAEL et al., 2009), enquanto em outros estudos não se obteve melhora na viabilidade espermática (PAGL et al., 2006; REGUINI et al., 2011).

Para prevenir a redução da motilidade do sêmen bovino congelado, com ou sem a indução do estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio, Bilodeau et al. (2001) avaliaram o efeito dos tióis cisteína, glutatona e β -mercaptoetanol, produtos que têm sido utilizados como antioxidantes em alguns estudos.

2.11 Efeito das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Em condições aeróbicas o espermatozoide produz EROs, na maioria das vezes originadas do metabolismo fisiológico das células. Dentre as EROs produzidas podem ser citadas algumas: anion superóxido, peróxido de hidrogênio, os radicais hidroxil, hidroperoxil, peroxil e alcoxil, e ainda, o ácido hipocloroso (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997). A centrifugação espermática utilizada para remover o plasma seminal e para concentrar os espermatozoides durante o congelamento remove antioxidantes presentes no sêmen, expondo os espermatozoides a danos excessivos de EROs (BALL, 2008)

No espermatozoide e plasma seminal existem enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante incluindo a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, redutase, vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina e hipotaurina (DE LAMIRANDE et al., 1997). As EROs atacam os fosfolipídios das membranas especificamente em regiões próximas às insaturações dos ácidos graxos poli-insaturados,

onde inicia uma cascata de peroxidação lipídica que, se não for interrompida, compromete a integridade da cromatina espermática (AITKEN e KRAUSZ, 2001).

2.12 Uso de N-Acetil-L-Cisteína

A N-Acetil-L-Cisteína é um tiol de baixo peso molecular (VAN ZANDWIJK, 1995) usado como agente mucolítico e, em casos de superdosagem de paracetamol, apresenta também ação antioxidante e há relatos que pode contribuir na prevenção de alguns tipos de câncer (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2005). Em pesquisa conduzida por nossa equipe (RODRIGUES et al., 2016) foram adicionados 0,0 mM, 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM de NAC ao diluente, com manutenção de 50% de plasma seminal com objetivo de avaliar o efeito de NAC e o plasma seminal na preservação de sêmen da espécie equina. O referido percentual de plasma, com ou sem NAC, não resultou em efeito positivo na avaliação a fresco (0), 24 e 48 h de resfriamento a 5°C nos parâmetros de motilidade progressiva, funcionalidade da membrana e dispersão da cromatina espermática.

Mesmo que a suplementação de NAC apresente resultados satisfatórios nas concentrações 0,5 mM e 1,0 mM, respectivamente no sêmen canino (MICHAEL et al., 2010) e suíno (WHITAKER et al., 2012), em equinos não apresentou melhora na integridade da membrana e na motilidade quando testadas as concentrações entre 0,209 e 20,0 mM (PAGL et al., 2006; REGHINI et al., 2011). Já em humanos, a adição de NAC intensificou o aparecimento de lesões no DNA espermático (HUGHES et al., 1998).

Com o objetivo de elucidar o efeito da NAC sobre a viabilidade espermática e o estresse oxidativo do sêmen de pôneis resfriado a 5°C, esta pesquisa foi desenvolvida com aproximadamente 20% de plasma seminal, percentual bem inferior ao utilizado por Rodrigues et al. (2016).

3 ARTIGO

USO DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO RESFRIAMENTO DO SÊMEN EQUINO

Ricardo Olimpio Schenatto*, Janislene Mach Trentin, Mariani Farias Fiorenza, Fabiano Trevisan da Rocha, Eliana Burtet Parmeggiani, Luis Augusto Machado Centeno, Mara Iolanda Batistella Rubin

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul – UFRGS
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

*autor para correspondência: 1schenatto@gmail.com

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da N-acetil-L-cisteína (NAC), adicionada ao diluente composto de leite em pó desnatado, sobre a viabilidade espermática e o estresse oxidativo do sêmen equino resfriado a 5°C. Ejaculados de 8 pôneis da raça Brasileira foram coletados em triplicata resultando em 24 ejaculados. O sêmen foi distribuído em 4 grupos: Equidil® + 0,00 mM (controle), 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de NAC. As amostras foram armazenadas em tubos de 15mL e mantidas em caixas de transporte de sêmen BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu-SP, Brasil). Parâmetros como motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), vigor, pH, resposta ao teste hiposmótico (HOST) e atividade mitocondrial (MTT) foram avaliados nas 24 e 48 h, bem como no sêmen fresco, após a diluição. O vigor, MT e MP foram também avaliados após teste de termorresistência (TTR), na ausência e presença de peróxido. A MT, a MP, o vigor espermático e a MTT foram similares ($P > 0,05$) entre as concentrações de NAC, nas 24 e 48 h. A resposta ao HOST foi semelhante entre as concentrações de NAC ($P > 0,05$) nas 24 h de resfriamento, porém nas 48 h ocorreu diminuição da funcionalidade da membrana no grupo NAC 2,5 mM em comparação ao grupo EQUIDIL, sem adição de NAC. A MT, a MP e vigor, das amostras resfriadas por 24 h e submetidas ao TTR, diferiu entre sem e com peróxido ($P < 0,05$) nos grupos Equidil, 0,5 mM e 1,0 mM, mas foi similar na concentração de 2,5 mM de NAC. Quando o sêmen foi resfriado por 48 h, houve diferença no vigor e MT entre amostras com e sem peróxido ($P < 0,05$), em todos os grupos testados, mas a MP foi similar entre amostras com e sem peróxido, na concentração 2,5 mM. O pH do diluente Equidil® foi o maior e os grupos Equidil + 0,5 mM e 1,0 mM tiveram valores intermediários, enquanto a concentração de 2,5 mM de NAC gerou valores mais baixos, nos três momentos avaliados ($P < 0,05$). Não houve variação significativa de pH entre os momentos 0 e 24 h ($P = 0,7075$) e entre 0 e 48 h ($P = 0,4617$), em todos os grupos testados. As concentrações de NAC testadas não melhoraram a motilidade, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e resposta ao HOST de espermatozoides equinos resfriados a 5°C e armazenados por 48 h. Após TTR, as concentrações de NAC testadas não evitaram a diminuição da motilidade e vigor espermático, na presença de peróxido.

Palavras-chave: Garanhão; Sêmen; Motilidade; N-acetil-L-cisteína.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) based on skim milk powder extender on sperm viability and oxidative stress of equine semen cooled to 5°C. Ejaculate of 8 ponies of the Brazilian breed were collected in triplicate, resulting in 24 ejaculates, distributed in 4 groups: Equidil® extender + 0.00mM (control), 0.5mM, 1.0mM and 2.5mM of NAC with the semen samples were The samples were stored in 15mL tubes and kept in BotuFLEX® semen transport boxes (Botupharm, Botucatu/SP/Brazil). Parameters, such as motility, vigor, pH, osmolarity, HOST, and MTT were evaluated at 24 and 48 h of cooling also in fresh semen. Vigor, total (TM) and progressive motility (PM) were also evaluated after thermoresistance test (TTR), in the absence and presence of peroxide. TM, PM, sperm vigor and MTT were similar ($P > 0.05$) between NAC concentrations at 24 and 48 h. The response to HOST was similar between NAC concentrations ($P > 0.05$) at 24 h cooling, but at 48 h there was a decreased in membrane functionality in 2.5mM NAC group compared to the EQUIDIL group. TM, PM, and vigor of the samples cooled by 24 h and submitted to TTR differed between without and with peroxide ($P < 0.05$) in the EQUIDIL, 0.5mM and 1.0mM groups, but was similar in 2.5mM NAC. After cooling for 48 h, there was difference in vigor and TM between samples with and without peroxide ($P < 0.05$) in all groups tested, but the PM was similar between samples with and without peroxide at concentration 2.5mM of NAC. The pH of the EQUIDIL extender was higher and the EQUIDIL + 0.5mM and 1.0mM groups had intermediate values, while the 2.5mM NAC concentration generated lower values in the three evaluated periods ($P < 0.05$). There was no significant variation of pH between 0 and 24 h ($P=0.7075$) and between 0 and 48 h ($P=0.4617$) in all groups tested. The concentrations of NAC tested did not improve motility, plasma membrane integrity, mitochondrial activity and response to HOST equine spermatozoa cooled to 5°C and stored for 48 h. After TTR, the concentrations of NAC tested did not prevent the decrease of motility and sperm vigor in the presence of peroxide.

Keywords: Stallion; Semen; Motility; N-acetyl-l-cysteine

Introdução

O uso da inseminação artificial e o transporte de sêmen equino teve aumento significativo nas décadas de 1970 e 1980, embora ainda algumas associações de raça não registrem potros provenientes de sêmen transportado (KATILA, 1997; LOOMIS, 2006). A inseminação artificial é uma ferramenta que, se utilizada corretamente, permitirá a máxima eficiência reprodutiva e melhoria no progresso genético (PICKETT e SHINER, 1994).

O uso apropriado do diluente é essencial para a proteção dos espermatozoides equinos durante o resfriamento e armazenamento (BATELLIER et al., 1997). Os esforços para melhorar a preservação do sêmen equino resfriado foram focados nos diluentes, bem como a adição de componentes específicos para manter a integridade da membrana, prevenir o estresse oxidativo ou preservar a motilidade do espermatozoide.

O oxigênio é essencial para a sobrevivência, mas o metabolismo oxidativo das moléculas biológicas pode ser potencialmente tóxico, devido à alta formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem alterar a função celular ou sua viabilidade (BAUMBER et al., 2000). O estresse oxidativo denota uma condição associada ao aumento dos níveis de danos celulares, induzindo a produção de ROS (SIKKA et al., 1995). A mudança de antioxidante para oxidante pode ocorrer devido ao aumento da produção de ROS, à diminuição da capacidade antioxidante ou, possivelmente, à combinação de ambos (BAUMBER et al., 2000).

A N-acetil-cisteína (NAC) é um tiol de baixo peso molecular (VAN ZANDWIJK, 1995) utilizado como agente mucolítico. Nos casos de sobredosagem de acetaminofeno, também tem ação antioxidante e já foi relatada na literatura que pode prevenir alguns tipos de câncer (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2005). Embora a suplementação de NAC apresenta resultados satisfatórios em concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM, respectivamente em sêmen canino (MICHAEL et al., 2010) e suíno (WHITAKER et al., 2012), em equino não houve melhora da integridade e motilidade da membrana, quando concentrações entre 0,209 mM e 20,0 mM (PAGL et al., 2006; REGHINI et al., 2011) foram testadas. Nos seres humanos, a adição de NAC aumentou as lesões do DNA espermático (HUGHES et al., 1998).

O teste hipoosmótico foi inicialmente desenvolvido com o objetivo de avaliar a funcionalidade da membrana espermática humana (JEYENDRAN et al., 1984). A

membrana espermática pode permitir o transporte de algumas moléculas de forma seletiva aumentando seu volume ou causando edema visível na cauda do espermatozoide (DREVIUS, 1972). Assim, a habilidade da cauda espermática em enrolar-se, na presença de uma solução hipoosmótica, significa que está ocorrendo transporte de água na membrana, indicando que a membrana está intacta (DREVIUS e ERIKSSON, 1966). Assim sendo, o enrolamento da cauda pode estar relacionado com a funcionalidade da membrana e esta proposição foi formulada em função da correlação entre o enrolamento da cauda e a penetração espermática em oócitos de hamster (JEYENDRAN et al., 1984)

Considerando que ainda não está esclarecida a concentração ideal de NAC para o sêmen equino, para manter a qualidade seminal e conferir proteção ao estresse oxidativo durante o armazenamento e refrigeração, o presente estudo foi delineado para avaliar o efeito de diferentes concentrações de NAC sobre a viabilidade espermática e o estresse oxidativo do sêmen equino resfriado a 5°C.

Materiais e Métodos

Este estudo foi conduzido de março de 2016 a outubro de 2017 durante a estação reprodutiva no hemisfério sul (29°41'-03° Sul, 53°48'-25° Oeste) no Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab) da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, localizado no Hospital Veterinário Universitário (HVU), em Santa Maria - RS, Brasil.

Oito garanhões saudáveis da raça pônei Brasileira com fertilidade previamente comprovada e entre 10 e 16 anos de idade foram utilizados. Os animais foram mantidos em poteiros com pastagem nativa, acesso a pastagem cultivada e água *ad libitum*. Esta pesquisa fez parte de um projeto registrado e aprovado no Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM sob número 1318280916. Como manequim, uma fêmea previamente treinada serviu para procedimentos de coleta de sêmen. Esta fêmea foi mantida em pastagem nativa com água *ad libitum*. Os ejaculados foram coletados com vagina artificial Hannover (Hannover Model; Minitube, Tiefenbach, Germany). Os procedimentos para coleta do sêmen foram adaptados de Klug e Sieme (KLUG e SIEME, 2003).

Para compor o estudo, três ejaculados de cada um dos garanhões foram obtidos totalizando 24 ejaculados. Os machos foram submetidos à coleta de sêmen a cada três dias. Uma vez por semana, uma amostra de sêmen foi utilizada para o experimento e as outras para o esgotamento das reserva espermática gonadal. A temperatura da vagina

artificial durante a coleta foi mantida entre 42°C e 45°C. Para a coleta, o copo coletor foi preparado com um filtro de nylon para separar a fração gel do ejaculado.

Imediatamente após a coleta foi realizada avaliação macroscópica do ejaculado para registrar o aspecto, coloração e volume. Imediatamente após, uma amostra foi retirada para verificar o pH e a osmolaridade do sêmen puro. O restante do sêmen de cada pônei foi diluído a 1:1 (sêmen:diluyente) com diluyente à base de leite em pó desnatado (Equidil® -Embryolab/UFSM, Santa Maria/RS, Brasil) e centrifugado a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e a concentração foi ajustada para 50×10^6 espermatozoides/ml e distribuídos em 4 tubos para adicionar diferentes concentrações de N-Acetil-L-cisteína (NAC; A9165, Sigma-Aldrich). O plasma seminal que permaneceu junto ao pellet foi de aproximadamente 20%. O Equidil®, utilizado no experimento é uma modificação do diluyente Kenney (KENNEY et al., 1975), composto por 4,9g de glicose (Merck 1.08337.1000), leite em pó desnatado (2,4g) e 95ml de água ultrapura, sem o uso de antibióticos. As quatro diferentes concentrações de NAC (0,0 mM; 0,5 mM; 1,0 mM ou 2,5 mM) foram adicionadas ao diluyente assim que o mesmo foi preparado.

Imediatamente após a diluição, as amostras de sêmen foram submetidas à avaliação do vigor, motilidade (total e progressiva), pH, concentração, funcionalidade da membrana plasmática (teste hiposmótico - HOST) e atividade mitocondrial (MTT).

Imediatamente após a primeira análise do sêmen a fresco, as amostras de sêmen foram acondicionadas em tubos corning e armazenadas em caixas de transporte de sêmen BotuFlex® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) que mantêm temperatura de 5°C durante 24 h. No momento da retirada das amostras para a segunda análise (24 h), o gelo reciclável foi trocado, mantendo a temperatura ideal por mais 24 h, quando foi conduzida a terceira análise das amostras. Nas 24 e 48 h, uma amostra de cada concentração testada e suficiente para as avaliações foi retirada com rapidez para evitar a exposição à luz e à temperatura ambiente por longo período de tempo. As amostras para avaliação nas 24 h e 48 h foram mantidas por 5 minutos em mesa térmica previamente ajustada a 37°C.

A concentração espermática foi determinada com uma amostra de 50µl de sêmen puro adicionada a 9,95ml de citrato de formaldeído. A amostra diluída e depositada em dois retículos de uma câmara de Neubauer permitiu a determinação da concentração espermática. A avaliação da motilidade espermática foi realizada com microscópio de contraste de fase (Olympus BX Japan) com aumento de 200x e 400x como preconizado por Varner et al. (1989).

O protocolo para avaliar a integridade da membrana plasmática, descrito por Lagares et al. (2000), foi conduzido neste estudo. O pH foi verificado no sêmen a fresco, após diluição e, também, com 24 e 48 h de resfriamento (medidor de pH Tec-2, Tecnal, Brasil). A análise da atividade mitocondrial foi efetuada com uma amostra de cada concentração submetida à centrifugação a 600 x g por 10 minutos, ajustando-se a concentração para 100×10^6 espermatozoides/ml. Duas alíquotas da amostra contendo 100×10^6 células/ml foram depositadas em tubos de 2 ml em banho-maria a 37°C. Em seguida, adicionou-se a estes tubos 20 µl da solução de Tetrazolium (5 mg/ml de brometo de tetrazólio azul de Thiocolyl (M2128, Sigma-Aldrich) em PBS salino, incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Na sequência, as amostras receberam 200µl de solução de 0,04 M de HCl em isopropanol. Cada alíquota foi homogeneizada e centrifugada a 12000 x g durante 5 minutos. Imediatamente após, a partir do sobrenadante, foi determinada a atividade mitocondrial em espectrofotometria de luz visível com um comprimento de onda de 540 nm.

Para o teste de termorresistência, duas amostras de 200 µl de sêmen de cada concentração testada foram adicionadas a tubos de 2 ml. Em uma das amostras foi adicionado também peróxido de hidrogênio (10 µl de uma solução de PBS salina + 0,60 mM de peróxido de hidrogênio). Na sequência, as duas amostras de cada tratamento foram incubadas em banho-maria a 37°C por 4 h e, após este período, foram avaliados novamente o vigor, motilidade total e progressiva de amostras resfriadas por 24 e 48 h.

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias de motilidade, vigor, pH, osmolaridade, MTT, HOST foi efetuada utilizando o teste de Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando P foi menor ou igual a 0,05.

Resultados

O volume médio do ejaculado dos oito pôneis foi de $17,65 \pm 10,35$ ml e a concentração total média foi de $218,20 \pm 86,54 \times 10^6$ espermatozoides/ml. A motilidade total e progressiva foram similares ($P > 0,05$) entre os grupos testados Equidil®, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM de NAC nas 48 h de resfriamento (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvio padrão de motilidade total e progressiva do sêmen de pôneis da raça Brasileira nos grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína, avaliado a fresco (0h), 24 h e 48 h resfriado a 5°C.

Diluyente	0 h	24 h	48 h
Motilidade total			
EQUIDIL®	70,00±6,42	59,37±8,11	52,70±8,07
0,5 mM	70,20±6,99	60,62±7,70	54,16±8,55
1,0 mM	69,37±6,30	58,33±6,53	52,70±6,91
2,5 mM	70,00±8,34	58,75±9,35	52,91±9,31
P	0,9794	0,7712	0,9144
Motilidade progressiva			
EQUIDIL®	59,37±7,41	48,95±8,20	41,87±8,44
0,5 mM	59,37±7,98	49,37±8,76	43,95±8,72
1,0 mM	59,16±6,37	47,91±6,74	42,50±6,91
2,5 mM	59,16±9,16	47,91±10,09	42,91±9,31
P	0,9994	0,9090	0,8533

ANOVA (P > 0,05)

O vigor seminal foi similar entre os grupos testados (Tabela 2). A análise do teste hiposmótico que permitiu determinar a integridade e funcionalidade da membrana plasmática revelou que houve similaridade (P > 0,05) nos resultados do sêmen a fresco (0 h) e após 24 h de resfriamento, porém nas 48 h ocorreu diminuição da funcionalidade da membrana no grupo NAC 2,5 mM em comparação ao grupo EQUIDIL, sem adição de NAC (Tabela 2).

Quanto à atividade mitocondrial, as diferentes concentrações de NAC avaliadas no sêmen fresco, 24 e 48 h foram similares (P > 0,05) nos tempos avaliados (Tabela 2).

O pH diferiu (P < 0,05) entre os grupos testados a fresco (0 h), 24 h e 48 h. O pH do diluyente Equidil® foi maior e os grupos Equidil + 0,5 mM e 1,0 mM tiveram valores intermediários, enquanto a concentração de 2,5 mM de NAC gerou valores mais baixos nos três momentos avaliados (Figura 1). Não houve variação significativa de pH entre os momentos 0 e 24 h (P = 0,7075) e entre 0 e 48 h (P = 0,4617), em todos os grupos testados. No geral, a variação de pH foi 0,028 e -0,015 em 24 e 48 h de armazenamento, respectivamente.

Tabela 2. Médias e desvios padrão do vigor, teste hiposmótico e atividade mitocondrial no sêmen de pôneis da raça brasileira dos grupos controle, 0,5 mM, 1,0 mM e 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína, avaliados a fresco (0 h), 24 h e 48 h resfriado a 5°C.

Diluyente	0 h	24 h	48 h
	Vigor		
EQUIDIL®	3,70±0,46	3,08±0,40	2,91±0,40
0,5 mM	3,70±0,46	3,16±0,48	3,00±0,41
1,0 mM	3,75±0,44	3,04±0,46	3,00±0,29
2,5 mM	3,75±0,44	3,12±0,53	2,91±0,28
P	0,9770	0,8196	0,7263
	Teste hiposmótico (HOST)		
EQUIDIL®	60,62±12,38	36,08±10,72	32,95±8,93 ^a
0,5 mM	60,08±9,24	37,66±11,78	28,37±9,99 ^{ab}
1,0 mM	61,91±10,72	35,00±11,54	28,29±12,87 ^{ab}
2,5 mM	62,20±12,43	33,25±14,90	23,79±10,55 ^b
P	0,8992	0,6539	0,0372
	Atividade mitocondrial (MTT)		
EQUIDIL®	278,54±69,28	304,67±91,72	278,35±73,70
0,5 mM	296,19±110,34	268,00±75,78	268,00±86,90
1,0 mM	298,06±78,22	290,48±80,33	306,46±78,97
2,5 mM	302,29±81,57	271,31±67,29	276,73±88,33
P	0,7866	0,3423	0,4019

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$).

O vigor das amostras resfriadas por 24 h e seguidas de incubação durante 4 h, em banho-maria a 37°C, diferiu entre sem e com peróxido ($P < 0,05$) nos grupos Equidil, 0,5 mM e 1,0 mM, mas foi similar para o sêmen resfriado com a concentração de 2,5 mM de NAC. Houve diferença entre amostras com e sem peróxido ($P < 0,05$) em todos os grupos testados, quando o sêmen foi resfriado por 48 h (Figura 2).

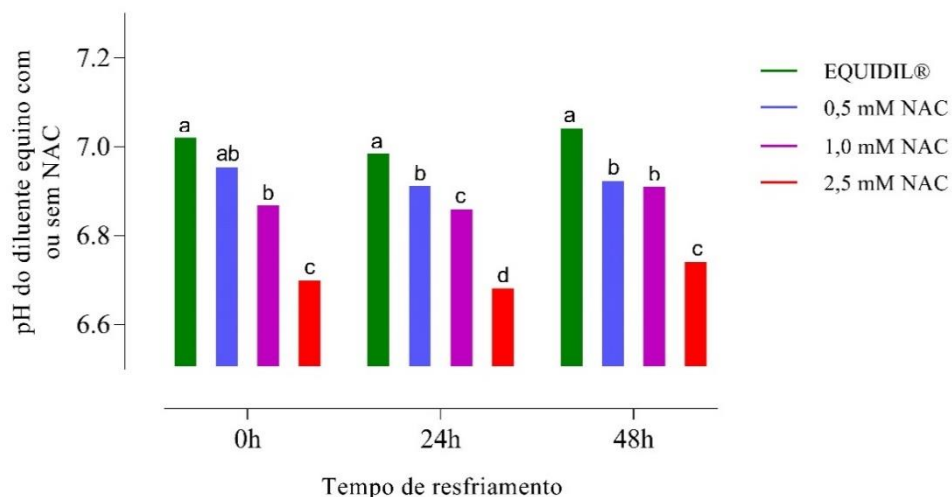


Figura 1- Valores de pH durante o resfriamento de sêmen de pôneis da raça Brasileira em diluente à base de leite em pó desnatado (Equidil) no grupo controle e grupos com 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de N-Acetil-L-cisteína (NAC), avaliado a fresco (0 h) e resfriado por 24 ou 48 h a 5°C. a,b,c indicam diferença entre as concentrações de NAC, nos diferentes momentos de avaliação ($P < 0,05$).

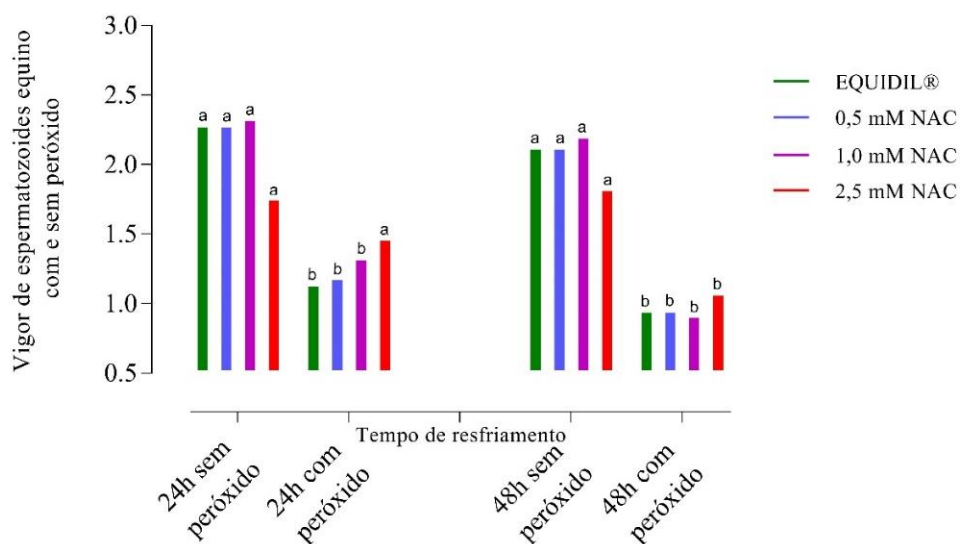


Figura 2- Valores de vigor após teste de termorresistência por 4 h a 37°C com diferentes concentrações de N-Acetil-L-cisteína (NAC) das amostras resfriadas a 5°C por 24 e 48 h do sêmen de pôneis da raça Brasileira. a,b indicam diferença entre sem e com peróxido, dentro de cada concentração de NAC ($P < 0,05$).

No sêmen resfriado por 24 e 48 h, a motilidade total e a motilidade progressiva, após o teste de termorresistência, foram maiores ($P < 0,05$) nas amostras sem do que na presença de peróxido, nos grupos Equidil, 0,5 mM e 1,0 mM. Não houve diferença na motilidade total e progressiva, entre amostras com e sem peróxido, no sêmen resfriado por 24 h com 2,5 mM de NAC, mas a motilidade total foi maior nas amostras sem peróxido do que com peróxido, no sêmen resfriado por 48 h (Tabela 3).

Tabela 3. Motilidade espermática total e progressiva de pôneis da raça Brasileira em diluente à base de leite em pó desnatado (Equidil®) com 0,5 mM, 1,0 mM ou 2,5 mM de N-acetil-L-cisteína com e sem peróxido resfriado a 5°C e incubados em banho-maria a 37°C por 4 h.

Diluente	Sem Peróxido	Com Peróxido	P
Motilidade total - 24 h			
Equidil	31,90±13,91 ^a	15,00±13,22 ^b	0,0002
0,5 mM	33,33±14,86 ^a	15,00±14,23 ^b	0,0002
1,0 mM	32,38±14,19 ^a	17,62±15,46 ^b	0,0025
2,5 mM	20,95±14,54 ^a	17,62±13,65 ^a	0,4484
Motilidade total - 48 h			
Equidil	25,83±11,19 ^a	9,58±10,72 ^b	<0,0001
0,5 mM	26,04±10,93 ^a	10,83±12,90 ^b	<0,0001
1,0 mM	26,46±9,72 ^a	10,00±10,73 ^b	<0,0001
2,5 mM	19,58±8,06 ^a	12,7±12,15 ^b	0,0255
Motilidade progressiva - 24 h			
Equidil	20,00±12,54 ^a	5,95±8,15 ^b	0,0001
0,5 mM	21,43±14,67 ^a	6,43±9,37 ^b	0,0003
1,0 mM	20,48±11,50 ^a	7,62±10,44 ^b	0,0005
2,5 mM	11,90±12,09 ^a	9,77±8,87 ^a	0,5163
Motilidade progressiva - 48 h			
Equidil	14,58±9,77 ^a	3,83±6,08 ^b	<0,0001
0,5 mM	16,25±10,45 ^a	5,21±8,53 ^b	0,0002
1,0 mM	15,83±9,28 ^a	4,17±6,70 ^b	<0,0001
2,5 mM	9,37±6,64 ^a	5,42±7,50 ^a	0,0592

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$).

Discussão

O sêmen da maioria dos ganhos sobrevive ao resfriamento lento até 4°C, mantendo bom índice de fertilidade até 48 e 72 h se a temperatura for mantida (BATELLIER et al., 2001). No presente experimento, o sêmen foi mantido a 5°C por 48 h para mimetizar o tempo de envio que é mais comumente realizado a campo durante transporte.

No presente trabalho, após a centrifugação para o ajuste da concentração, as amostras foram mantidas com aproximadamente 20% do plasma seminal. O estudo de Katila (1997) mostrou que altas proporções (> 20%) do plasma seminal são deletérias para a motilidade do sêmen durante longo período de resfriamento (PICKETT et al., 1975; JASKO et al., 1992). No entanto, a remoção completa do plasma seminal é prejudicial para a motilidade após 24 h de resfriamento. A recomendação é que 5 a 20% do plasma seminal deve ser incluído no diluente (JASKO et al., 1992). No estudo desenvolvido por Kawai et al. (2017), em que as amostras de sêmen foram tratadas com malondialdeído, maiores motilidade e integridade de membrana foram observadas no grupo com plasma seminal (32,69% e 51,07%) do que no grupo sem plasma seminal (5,76% e 7,84%). É importante enfatizar que a concentração dos componentes do plasma seminal difere entre ganhos. Quando a proporção de plasma seminal é reduzida para $\leq 5\%$, a manutenção da motilidade dos espermatozoides é maior em comparação com concentrações elevadas (> 30%), tanto durante o resfriamento quanto no congelamento (JASKO et al., 1991; ALGHAMDI et al., 2002).

A perda de qualidade seminal no resfriamento pode ser reduzida por centrifugação e retirada do plasma seminal ou diluição de 1:2 ou mais (AURICH, 2005). Deve-se levar em consideração que a centrifugação em si é crítica para a membrana plasmática dos espermatozoides e pode levar à peroxidação lipídica (PARINAUD et al., 1997). Especialmente em ganhos com baixa qualidade seminal após o resfriamento e armazenamento, a remoção parcial do plasma seminal por centrifugação pode resultar em melhor qualidade seminal durante o resfriamento (BRINSKO et al., 2000).

Em nosso estudo, o pH já foi mais baixo nos grupos com 1,0 e 2,5 mM de NAC, logo após a diluição, e a diferença entre os grupos foi mantida ao longo do armazenamento. Essa redução de pH pode ser explicada pelo fato de que o pH de uma solução com NAC é baixo (OEDA et al., 1997) e sua adição nessas concentrações contribuiu para alterar o pH.

A N-acetil-L-cisteína atua como um antioxidante (GRESSION et al., 1994) e fornece tióis que podem prevenir danos oxidativos à membrana plasmática de sêmen durante o armazenamento (BAKER et al., 1996; BILODEAU et al., 2001). As diferentes concentrações testadas no presente estudo não foram capazes de melhorar a qualidade do sêmen armazenado no diluente EQUIDIL. Em outro estudo, também não houve efeito de diferentes concentrações de NAC (de 1,0 mM até 20,0 mM) na motilidade total, motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática em sêmen equino refrigerado por 24 h a 5°C ou 15°C (REGHINI et al., 2011).

No teste de termorresistência, a NAC não melhorou a motilidade, independentemente da concentração utilizada. O decréscimo do vigor e da motilidade observados com a adição de peróxido e NAC, por 4 h, mostra que as concentrações utilizadas não foram suficientes para evitar danos aos espermatozoides decorrentes da oxidação pelo peróxido. Em equinos, não houve melhora na integridade e motilidade da membrana quando testada em concentrações entre 0,209 e 20,0 mM (PAGL et al., 2006; REGHINI et al., 2011), mesmo quando adicionadas a diluentes diferentes do utilizado no presente estudo. Nos seres humanos, a adição de NAC intensificou o aparecimento de lesões no DNA no espermatozoide (HUGHES et al., 1998). Se consideradas em conjunto com os resultados do nosso estudo, as observações indicam que o uso de NAC não é eficaz para proteger os espermatozoides equinos durante o resfriamento a 5°C, apesar de ser uma molécula com propriedades antioxidantes. De acordo com Pagl et al. (2006), apesar da peroxidação lipídica ocorrer ao longo do armazenamento de sêmen equino resfriado, seu dano sobre a membrana espermática parece não ser a causa predominante da queda de motilidade. Considerando que o efeito antioxidativo da NAC foi dependente do ajuste do pH, sobretudo quando maiores concentrações de NAC (5 vs 1 mg/ml) foram adicionadas ao sêmen humano (OEDA, et al., 1997), pode ser especulado que a ausência de efeito protetor da NAC, no presente estudo, também possa ter sido influenciada pela alteração de pH observada após sua adição ao sêmen.

Conclusão

As concentrações de NAC testadas (0,5, 1,0 e 2,5 mM) não melhoraram a motilidade, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e resposta ao teste hiposmótico de espermatozoides equinos resfriados a 5°C e armazenados por 48 h.

Após teste de termorresistência, as concentrações de NAC testadas não evitaram a diminuição da motilidade e vigor espermático, na presença de peróxido.

Referências

ALGHAMDI AS, TROEDSSON MH, XUE JL, CRABO BG. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 880–885, 2002.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

BAKER HWG, BRINDLE J, IRVINE DS, AITKEN RJ. Protective effects of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**, v. 65, p. 411-419, 1996.

BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E. Effect of Milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, p.391-410, 1997.

BATELLIER F, VIDAMENT M, FAUQUANT J, DUCHAMP G, ARNAUD G, YVON IM et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.181-190, 2001.

BAUMBER J, BALL BA, GRAVANCE CG, MEDINA V, DAVIES-MOREL MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BILODEAU JF, BLANCHETTE S, GAGNON C, SIRARD MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss on sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.

BRINSKO SP, CROCKETT EC, SQUIRES EI. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

DREVIUS LO, ERIKSSON H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, n. 11, p. 36-56, 1966.

DREVIUS LO. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of

spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, n. 1, p. 41-54, 1972.

GRESSIER B, CABANIS A, LEBEQUE S, BRUNET C, DINE T, LUYCKX M, et al. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generation by stimulating human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs. **Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 9-13, 1994.

HUGHES CM, LEWIS SEM, McKELVEY-MARTIN VJ, THOMPSON W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v.13, n. 5, p. 1240 – 1247, 1998.

JASKO DJ, HATHAWAY JA, SCHALTENBRAND VL, SIMPER WD, SQUIRES El. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1992.

JASKO, DJ, MORAN DM, FARLIN ME, SQUIRES EL. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059–1067, 1991.

JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

KATILA T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KAWAI GKV, GURGEL JRC, LOSANO JDA, DALMAZZO A, ROCHA CC, TSUNODA RH, GÓES PAA, RUI BR, ANGRIMANI DSR, ASSUMPCÃO MEOA, MENDES CM, BARNABE VH, NICHI M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2017, doi: 10.1016/j.jevs.2017.03.225.

KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: **Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, p.327-336, 1975.

KLUG E, SIEME H. **Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis**. Verlag M. & H. Shaper Alfeld, 5° völlig überarbeitete Auflage, Hannover, 2003.

LAGARES MA, MEIRELLES LS, WALD VB, GREGORY RM, MATTOS RC. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e

fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 7, n.3, p. 153-156, 2000.

LOOMIS PR. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 6663-6676, 2006.

MICHAEL AJ, ALEXOPOULOS C, PONTIKI EA, HADJIPAVLOU-LITINA DJ, SARATSIS P, VERVERIDIS HN, BOSCO CM. Effect of N-acetyl-L-Cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 45, n. 2, p. 201-207, 2010.

OEDA T, HENKEL R, OHMORI H, SCHILL WB. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? **Andrologia**, v. 29, p. 125-131, 1997.

PAGL R, AURICH C, KANKOFER M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of Veterinary Medicine A Physiol Pathol Clin Med**, v. 53, p. 486-489, 2006.

PARINAUD J, LELANNOU D, VIEITENZ G, GRIVEAU J-F, MILHET P, RICHAILLEY ZG. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 2434-2436, 1997.

PICKETT BW, SHINER KA. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science**, v. 40, p.31-36, 1994.

PICKETT BW, SULLIVAN JJ, BYERS WW, PACE MM, REMMENGA EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, p. 167-174, 1975.

REGHINI MFS, ULIANI RC, MONTEIRO GA, DELL'AQUA JUNIOR J, PAPA FO, ALVARENGA MA. Utilização da N-acetilcisteína na conservação do sêmen equino a 5°C e 15°C. In: **I Simpósio ABRAVEQ SUL 2011** (Gramado, Brazil). <http://www.itarget.com.br/newclients/abreveq2012/?p=2353>. [Acessado, outubro 2017].

SIKKA SC, RAJASEKARAN M, HELLSTROM WJG. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464-468, 1995.

VARNER DD, BLANCHARD TL, MEYERS PJ, MEYERS SA. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 degrees C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

VIEIRA JH, FATIBELLO-FILHO O. Determinação indireta de N-Acetil-L-Cisteína por injeção em fluxo empregando Ce (IV) e Ferroína. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 797-800, 2005.

WHITAKER BD, CASEY SJ, TAUPIER R. N-acetyl-l-cysteine supplementation improves boar spermatozoa characteristics and subsequent fertilization and embryonic development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 263-268, 2012.

4 COMITE DE ÉTICA

Esta pesquisa é parte do projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, cujo parecer está registrado sob o número CEUA nº. 1318280916.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As concentrações de NAC testadas (0,5, 1,0 e 2,5 mM) não melhoraram a motilidade, integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e resposta ao HOST de espermatozoides equinos resfriados a 5°C e armazenados por 48 h. Após TTR, as concentrações de NAC testadas não evitaram a diminuição da motilidade e vigor espermático, na presença de peróxido. Resta esclarecer em estudos futuros se a NAC poderá implementar a motilidade e integridade espermática fazendo uso de testes mais apurados como a avaliação da quantidade de EROs nas amostras após o resfriamento para avaliar se a diminuição da motilidade e integridade da membrana está relacionada ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

AITKEN RJ. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 19-24, 1994.

AITKEN RJ. Free radicals, lipid peroxidation and semen function. **Reproduction, Fertility and development**, v. 7, p. 659-68, 1995.

AITKEN RJ, KRAUSZ C. Oxidative stress DNA damage and they chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.

ALVARENGA MA, LEÃO KM, PAPA FO, LANDIM-ALVARENGA FC, MEDEIROS ASL, GOMES GM. The use of alternatives cryoprotectors for freezing stallion semen. **Proceedings of workshop on transporting gametas and embryos** 2ªEd., 5 de Outubro, 2003.

AMANN RP, GRAHAM JK. Spermatozoal function. In: McKINNON AO, VOSS JL (Ed.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. p. 715-745.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

AURICH C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, p. 107, p. 268-275, 2008.

AURICH C. Semen extenders for cooled semen (Europe). In McKINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD (Ed), **Equine Reproduction**. v. 1, 2nd ed. Wiley – Blackwell Chichester, United Kingdom, cap.131, p.1336-1340, 2011.

AURICH J. Artificial insemination in horses – More than a century of practice and research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 18, p. 458-463, 2012.

AURICH JE, AURICH C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 41 p. 275-279, 2006.

AZIZ DM. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 1-2, p. 1-8, 2006.

AZIZ DM, AHLWEDE L, ENBERGS H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64:6:1350-1356, 2005.

BASS JW, MOLAN PC and SHANNAON P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BALL BA, MEDINA V, GRAVANCE CG, BAUMBE J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.

BALL BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm junction and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.

BATELLIER F, MAGISTRINI M, FAUQUANT J, PALMER E. Effect of Milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 91-410, 1997.

BATELLIER F, DUCHAMP G, VIDAMENT M, ARNAUD G, PALMER E, MAGISTRINI M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, p. 229-236, 1998.

BILODEAU JF, BLANCHETTE S, GAGNON C, SIRARD MA. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss on sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.

BRINSKO SP, CROCKETT EC, SQUIRES EI. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

DE LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DREVIUS LO, ERIKSSON H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, n.11, p. 36-56, 1966.

DREVIUS LO. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, n. 1, p. 41-54, 1972.

DOUGLAS-HAMILTON DH, OSOL R, OSOL G, DRISCOLL D, NOBRE H. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291-304, 1984.

FUNAHASHI H, SANO T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, 63:1605–1616, 2005.

GADEA J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. Spanish. **Journal of Agricultural Reserch**, v. 1, p. 17-27, 2003.

GADELLA BM, RATHI R, BROUWERS JFHM, STOUT TAE, COLENBRANDER B. Capacitation and the acrosome reaction in equine eperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.

GATTI J, CHEVRIER C, PAQUINON M, DACHEUX J. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 98, p. 439-449, 1993.

HUGHES CM, LEWIS SEM, McKELVEY-MARTIN VJ, THOMPSON W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, n.5, p. 1240-1247, 1998.

JASKO DJ, HATHAWAY JA, SCHALTENBRAND VL, SIMPER WD, SQUIRES EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1992.

JASKO DJ. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v. 10, p. 156-170, 1994.

JEYENDRAN RS, VAN DER VEN HH, PEREZ-PELAEZ M, CRABO BG, ZANEVELD LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JONES J, BAVISTER B. Acidification of the intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 616-624, 2000.

KATILA T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KATILA T. In vitro Evaluation of frozen thawed stallion semen: A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 201-217, 2001.

KARESKOSKI M, KATILA K. Components of stallion seminal plasma and the effect of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.

KAYSER IP, AMANN RP, SHIDELER RK, SQUIRES EL, JASKO DJ, PICKETT BW. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 601-614, 1992.

KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL. **Minimal contamination techniques and preliminary findings**. In: Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. p. 327-336, 1975.

KOSINIAK K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 59-61, 1975.

LADHA S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.

LOOMIS PR. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 6663-6676, 2006.

MICHAEL A, ALEXOPOULOS C, PONTIKI E, HADJIPAVLOU- LITINA D, SARATSIS P, BOSCOS C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and

reactive oxygen species of frozen- thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 204–212, 2007.

MICHAEL AJ, ALEXOPOULOS C, PONTIKI EA, HADJIPAVLOU-LITINA DJ, SARATSIS P, VERVERIDIS HN, BOSCOS CM. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 119-35, 2009.

MICHAEL AJ, ALEXOPOULOS C, PONTIKI EA, HADJIPAVLOU-LITINA DJ, SARATSIS P, VERVERIDIS HN, BOSCOS CM. Effect of the N-acetyl-Lcysteine supplementation in semen extenders on semen quality ad reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 201-207, 2010.

MORAN DM, JASKO DJ, SQUIRES EL, AMANN RP. Determination of temperature and cooling rate which induce cold Shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, 999-1012, 1992.

MORRIS LHA, HUNTER RHF, ALLEN WR. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 95-100, 2000.

NASR-ESFAHANI MH, ABOUTORABI R, ESFANDIARI E, MARDANI M. Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 19, n. 10, p. 477-482, 2002.

NUNES DB, ZORZATTO JR, COSTA E SILVA EV, ZUCCARI CESN. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 434-439, 2008.

PAGL R, AURICH C, KANKOFER M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 486-489, 2006.

PARTYKA A, NIZANSKI W, BRATKOWSKA M, MASHIKOWSKI P. Effect os N-acetyl-Lcysteine and catalase on the viability and motility of chicken sperm during liquid storage. **Reproductive Biology**, v. 15, n. 2, p. 126-129, 2015.

PICKETT BW, SULLIVAN JJ, BYERS WW, PACE MM, REMMENGA EE. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, p. 167-174, 1975.

PICKETT BW, FAULKNER LC, SEIDEL GE, BERNDTSON WE, VOSS JL. Reproductive physiology of stallion VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 617-625, 1976.

PICKETT BW, AMANN RP. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 289-302, 1987.

POMMER AC, RUTHANT J, MEYERS SA. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, v. 58, p. 1373-1384, 2002.

RAPHAEL CF. Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado.

Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REGHINI MFS, ULIANI RC, MONTEIRO GA, DELL'AQUA JUNIOR J, PAPA FO, ALVARENGA MA. Utilização da N-acetilcisteína na conservação do sêmen equino a 5°C e 15°C. In: **I Simpósio ABRAVEQ SUL 2011** (Gramado, Brazil). <http://www.itarget.com.br/newclients/abreveq2012/?p=2353>. [Acessado, outubro 2017].

RIGAU T, PIEDRAFITA J, REVERTER J, CANAL M, RODRÍGUEZ-GIL JE. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 43, p. 161-172, 1996.

RODRIGUES MF, TRENTIN JM, ARAUJO LB, CENTENO LAM, SCHENATTO RO, PESSOA GA, NEVES AP, RUBIN MIB. Seminal plasma: Effect on motility, membrane Functionality, and Spermatic Chromatin Dispersion of Equine Sperm Treated with N-acetyl-L-cysteine at 5°C. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1371, 2016.

SAMPER JC. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. W.B. Saunders Company. 2000. 306p.

SIEME H, HARRISON RAP, PETRUNKINA AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 276-292, 2008.

STOREY BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3:203-213, 1997.

VAN ZANDWIJK N. N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**. Suppl. v. 59, n. 22, p. 24-32, 1995.

VARNER DD, BLANCHARD TL, LOVE CC, GARCIA MC, KENNEY RM. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, p. 709-718, 1987.

VARNER DD, BLANCHARD TL, MEYERS PJ, MEYERS SA. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 degrees C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

VARNER DD. Development in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, p. 448-462, 2008.

VIEIRA JH, FATIBELLO-FILHO O. Determinação indireta de N-Acetil-L-Cisteína por injeção em fluxo empregando Ce (IV) e Ferroína. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 797-800, 2005.

VON WOLFF M, ROSNER S, THONE C, PINHEIRO RM, JAUSCKUS J, BRUCKNER T, BIOLCHIV, ALIA A, STROWITZKI T. Intravaginal and intracervical application of seminal plasma in in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection treatment cycles – a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 167-172, 2009.

WAHEED MM, EL-BAHR SM, AL-HAIDER AK. Influence of Seminal Plasma Antioxidants and Osteopontin on Fertility of the Arabian Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 705-709, 2013.

WATSON PE, PLUMMER JM, ALLEN WE. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 651-653, 1987.

WENDT KM, LOVE EC, BRINSKO SP, THOMPSON JA, BLANCHARD TL, VARNER DD. Effect of extender pH on motility characteristics of cooled-stored equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 321-324, 2002.

WHITAKER BD, CASEY SJ, TAUPIER R. N-acetyl-l-cysteine supplementation improves boar spermatozoa characteristics and subsequent fertilization and embryonic development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 263-268, 2012.