

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

Dissertação de Mestrado

Plasma Seminal: Efeito na motilidade, funcionalidade de membrana  
e dispersão da cromatina espermática do sêmen equino a 5°C e  
tratado com N-Acetil-L-Cisteína

MURILO FARIAS RODRIGUES

Porto Alegre, Maio de 2013

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

Plasma Seminal: Efeito na motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática do sêmen equino a 5°C e tratado com N-Acetil-L-Cisteína

MURILO FARIAS RODRIGUES

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção de grau de mestre em Medicina Animal: Equinos

Prof. Dr<sup>a</sup>. Mara Iolanda Batistella Rubin  
Orientadora

**Comissão Examinadora**

Prof. Dr. Alceu Mezzalira  
(CAV/UDESC)

Prof. Dr. Eduardo Malschitzki  
(ULBRA, PPGMAE)

Prof. Dr<sup>a</sup> Mari Lourdes Bernardi  
UFRGS

Porto Alegre, Maio de 2013

## CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Murilo Farias

Plasma Seminal: Efeito na motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática do sêmen equino a 5°C e tratado com N-Acetil-L-Cisteína / Murilo Farias Rodrigues. -- 2013. 67 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.  
Coorientadora: Adriana Pires Neves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Equino. 2. Sêmen. 3. Resfriamento. 4. N-Acetil-L-Cisteína. 5. Antioxidante. I. Rubin, Mara Iolanda Batistella, orient. II. Neves, Adriana Pires, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus pais, Lucas e Nair por sempre acreditarem em mim, nas minhas decisões, dando o incentivo e apoio necessário para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Mara Iolanda Batistella Rubin por depositar integralmente sua confiança e principalmente, o compartilhamento de sua vasta experiência não só profissional, mas também de vida. Certamente levarei comigo os seus ensinamentos para qualquer lugar onde for. Além disso, por batalhar por mim em momentos difíceis de sua carreira, por sempre me defender, e isto, com plena certeza a considero não só como minha orientadora, mas também uma amiga.

É claro que não posso deixar de mencionar os meus sinceros agradecimentos a minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Adriana Pires Neves e a seu esposo Sérgio, por darem suporte científico e infraestrutura para minha permanência em Porto Alegre. Adicionalmente, lutaram em momentos difíceis por mim, que agora felizmente fazem parte do passado. Sem o auxílio de vocês seguramente eu não conseguiria ultrapassar e alcançar esta jornada.

Ao professor Dr Rodrigo Costa Mattos pelo aprendizado e por ter aberto as portas do REPROLAB/UFRGS à minha disposição e ao estimado professor Dr Carlos Antônio Mondino Silva por ter passado sua vasta experiência de longos anos de pesquisa. Ele mostrou-me sempre a importância de como solucionar e responder os grandes desafios científicos para aplicar em favor do produtor.

Ao professor Dr. Paulo Bayard Gonçalves bem como toda equipe do Biorep-UFSM por disponibilizarem o equipamento de fluorescência.

Aos meus caros colegas e amigos de pós graduação Matheus Pedrotti de Cézaro, Paulo Antunes da Rosa, Gabriel de Oliveira Santos, Janislene Mach Trentin, Gilson Antônio Pessoa, Henrique de Boll de Araújo Bastos, Nicolas Casales Penino e Andréia Molard Bainy pelo companheirismo e por terem contribuído no meu aprendizado profissional, passando-me seus conhecimentos e apoiando-me de forma ímpar durante esta etapa de minha vida.

Aos estagiários do EMBRYOLAB/UFSM Karen G. Roehe, Luiz Augusto M. Centeno, Laurence Boligon de Araújo, Dionoceles Da Rosa Dotto, Diego Simões, Ricardo Schenatto, Karine de Vargas Aires, Alvaro Henrique G. Waihrich, Nairo S. Nascimento, Laura Kopstein, Priscila Ferreira, Thainá Minela, Manuelle L. Jardim, Diego T. Rodrigues entre outras pessoas que foram fundamentais na realização deste desafio.

Aos professores Dr Flávio De La Corte e a professora Dr<sup>a</sup> Karin Érica Brass pela solução de dúvidas e suporte no desenvolvimento da presente pesquisa.

A coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## RESUMO

### Plasma Seminal: Efeito na motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática do sêmen equino a 5°C e tratado com N-Acetil-L-Cisteína<sup>1</sup>

No presente estudo três concentrações de N-acetil-L-cisteína (NAC) foram avaliadas no diluente equino resfriado a 5°C através da motilidade do sêmen, integridade da cromatina espermática e choque hiposmótico sobre o ejaculado em diluente Kenney na proporção 1:2 com 50% de plasma seminal. No Experimento 1, nove ejaculados de nove garanhões foram diluídos na proporção 1:2 em meio com leite em pó desnatado e avaliados a fresco imediatamente (0h) e após 12, 24, 36 e 48h de resfriamento a 5°C. A área de dispersão da cromatina espermática na avaliação a fresco apresentou  $50,1\mu\text{M}^2$ , aumentando para  $67,6\mu\text{M}^2$  nas 24h de resfriamento. Entretanto, o teste hiposmótico revelou somente 32,4% ( $P<0,05$ ) das células com membrana funcional nas 12h de resfriamento, enquanto que o sêmen fresco (0h) foi de 53,5%. Já o percentual de células móveis reduziu nas 12 horas de resfriamento, de 38,9 para 19,7%, não havendo diferença entre 12 e 24h de resfriamento. Os testes de dispersão da cromatina espermática e hiposmótico revelaram similaridade entre os períodos de resfriamento das 24 até às 48h. No Experimento 2, o ejaculado de nove garanhões diluído na proporção 1:2 em meio Kenney foi dividido em 4 partes iguais e suplementado com 5,0, 2,5 e 0,5mM de NAC e um grupo não suplementado (0,0mM). As avaliações foram realizadas a fresco (0h), 24 e 48h de resfriamento. A análise de motilidade nos dois experimentos foi avaliada até às 24 horas. No experimento 2, a adição de 0,5 e 5,0mM de NAC resultou em áreas de dispersão da cromatina espermática similares ( $59,7$  e  $55,5\mu\text{M}^2$ , respectivamente). Entretanto, a área de dispersão da cromatina no grupo não suplementado ( $65,3\mu\text{M}^2$ ) e com 2,5mM de NAC ( $52,8\mu\text{M}^2$ ) apresentou diferença ( $P<0,05$ ). O percentual de células com membrana plasmática funcional foi similar entre o grupo não suplementado e o grupo suplementado com 0,5mM de NAC (39,7 e 39,8%, respectivamente), porém superior a NAC 2,5mM (34,5%) e 5,0mM (34,2%). A motilidade progressiva dos ejaculados suplementados com NAC foram similares entre si e somente o grupo NAC 0,5mM (35,2%) apresentou similaridade de células móveis com o grupo não suplementado (36,2%). Os maiores danos à cromatina espermática no sêmen equino diluído com 50% de plasma seminal mantido resfriado a 5°C ocorrem a partir de 24h de resfriamento. A adição de 2,5 e 5,0mM de NAC comprometem a motilidade e a funcionalidade de membrana espermática equina, mas não causa efeito deletério sobre a integridade do DNA.

**Palavras-chave:** Sêmen, equino, resfriado, N-Acetil-L-Cisteína

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Medicina Animal: Equinos – Área de Biotecnologia da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2013.

## ABSTRACT

Plasma Seminal: Efeito na motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática do sêmen equino refrigerado a 5°C e tratado com N-Acetil-L-Cisteína

### **Seminal Plasma: Effect on motility, membrane functionality, and sperm chromatin dispersion of equine semen treated with N-Acetyl-L-Cysteine at 5°C<sup>1</sup>**

*In this study, three concentrations of N-acetyl- l-cysteine (NAC) were evaluated by sperm motility, membrane functionality (hypo-osmotic test), and sperm chromatin integrity in equine semen diluted in a 1:2 ratio of Kenney extender containing 50% seminal plasma cooled to 5°C. In Experiment 1, nine ejaculates from nine stallions were diluted in the ratio 1:2 in medium with skimmed milk powder and assessed immediately (0h) and after 12, 24, 36 and 48h of cooling at 5°C. The area of the sperm chromatin dispersion in the fresh assessment (0h) presented 50.1 $\mu\text{M}^2$ , increasing to 67.6 $\mu\text{M}^2$  in 24h cooling. The hypo-osmotic test showed only 32.4% ( $P < 0.05$ ) of the cells having a functional membrane 12h into the cooling process, while the fresh semen (0h) was 53.5%. The percentage of motile cells decreased within 12h of cooling from 38.9 to 19.7%, with no difference between 12 and 24h of cooling. The tests of sperm chromatin dispersion and hypo-osmotic shock revealed similarities between the periods of cooling at 24 to 48h. In Experiment 2, the nine stallion ejaculates were divided into 4 equal parts, diluted in half with Kenney milk powder supplemented with 5.0, 2.5 and 0.5mM NAC and a group not supplemented (0.0mM). The evaluations were made fresh (0h), 24 and 48h after cooling. The analysis of motility was assessed in all experiments up to 24 hours. In experiment 2, the addition of 0.5 to 5.0mM NAC resulted in areas of similar sperm chromatin dispersion (59.7 and 55.5 $\mu\text{M}^2$ , respectively). However, the area of the chromatin dispersion between non-supplemented group=0.0mM (65.3 $\mu\text{M}^2$ ) and 2.5mM NAC (52.8 $\mu\text{M}^2$ ) differ ( $P < 0.05$ ). The percentage of cells with plasma membrane function were similar between the supplemented with 0.5mM NAC and non-supplemented (0.0mM) groups with (39.7 and 39.8%, respectively), but higher than 2.5mM (34.5%) and 5.0mM (34.2%). Progressive motility of ejaculates supplemented with NAC were similar, but only the group with 0.5mM NAC which resulted in 35.2% of mobile cells showed similarities with the non-supplemented group (36.2%). The greatest damage to sperm chromatin in equine semen diluted with 50% seminal plasma kept cooled to 5°C was due to 24h cooling. The addition of 2.5 and 5.0mM NAC inhibits the mobility and functionality of the equine sperm membrane, but does not cause a deleterious effect on the integrity of the DNA.*

**Key words:** Semen, equine, cooled, N-Acetyl-L-Cysteine

---

<sup>1</sup> Master Science Dissertation in Animal Medicine: Equine – Biotechnology of Reproduction, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. March, 2013.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.</b> .....	<b>15</b>
2.1. <b>Inseminação artificial.</b> .....	<b>15</b>
2.2. <b>Fatores que afetam a qualidade do sêmen equino mantido resfriado.</b> .....	<b>16</b>
2.2.1. Diluente. ....	<b>16</b>
2.2.2. Taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento. ....	<b>18</b>
2.2.3. Ação das espécies reativas de oxigênio. ....	<b>20</b>
2.3. <b>Antioxidantes na suplementação do sêmen refrigerado.</b> .....	<b>20</b>
2.4. <b>Plasma seminal: Criopreservação.</b> .....	<b>23</b>
2.5. <b>Técnicas de avaliação de sêmen .</b> .....	<b>24</b>
2.5.1. Motilidade espermática. ....	<b>24</b>
2.5.2. Funcionalidade de membrana – teste hiposmótico. ....	<b>25</b>
2.5.3. Avaliação da fragmentação do DNA. ....	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESES.</b> .....	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS.</b> .....	<b>29</b>
<b>5. CAPÍTULO 1.</b> .....	<b>30</b>
<b>6. CAPÍTULO 2.</b> .....	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÕES.</b> .....	<b>55</b>
<b>8. ANEXOS.</b> .....	<b>56</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> .....	<b>59</b>



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SDC). Amostra exposta em solução ácida de 0,08N de HCl realizada em sêmen humano. O maior halo corresponde ao DNA não fragmentado, enquanto que o pequeno ou ausência de halo significa DNA fragmentado (Adaptado de FERNÁNDEZ et al., 2005)..... 27

### Artigo 1.

**Figura 1.** Delineamento experimental dos procedimentos efetuados com o ejaculado de nove pôneis mestiços da raça Brasileira..... 5

### Artigo 2.

**Figura 1:** Teste de dispersão da cromatina espermática equina, corados com iodeto de propídeo (Kit Halomax® - *Equus caballus*. Madri/Espanha). Quanto maior o halo, maior dispersão da cromatina (Arquivo pessoal, MF Rodrigues, 2012)..... 6

**Figura 2:** Delineamento experimental dos procedimentos efetuados com o ejaculado de nove pôneis mestiços da raça Brasileira..... 7

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

**Tabela 1:** Valores médios e desvio-padrão de motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática em cada período de resfriamento do sêmen equino a 5°C. .... 6

### Artigo 2

**Tabela 1:** Área de dispersão da cromatina espermática, funcionalidade de membrana e motilidade progressiva de acordo com diferentes concentrações de N-Acetil-L-Cisteína (NAC) em sêmen equino resfriado a 5°C por diferentes períodos. .... 8

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NAC	N-Acetil-L-Cisteína
NAC5.0	Concentração de 5mM de N-Acetil-L-Cisteína
NAC2.5	Concentração de 2,5mM de N-Acetil-L-Cisteína
NAC0.5	Concentração de 0,5mM de N-Acetil-L-Cisteína
NAC0.0	Controle, sem suplementação de NAC
Mm	Milimolar
%	Porcentagem
pH	Potencial de Hidrogênio
mOsM	Miliosmóis
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
TUNEL	Técnica de terminal deoxynucleotidyl transferase mediate dUDP nick-end labeling para detecção de fragmentação do DNA espermático
SCSA	Teste de Avaliação da Estrutura da Cromatina Espermática
SDC	Teste de Dispersão da Cromatina Espermática
IA	Inseminação Artificial

## 1. INTRODUÇÃO

O sêmen resfriado vem sendo rotineiramente utilizado na reprodução equina, pois possibilita a redução da atividade metabólica dos espermatozóides e do crescimento microbiano, mantendo a viabilidade espermática por longos períodos (KATILA, 1997). Entretanto, a redução da temperatura causa danos diretos, como a ruptura das membranas e indiretos como as alterações das funções celulares do espermatozóides (SQUIRES et al., 1999), apresentando maior susceptibilidade na faixa de temperatura entre 19 e 8°C, devido à mudança do estado físico da membrana plasmática, que passa do líquido cristalino para o estado de gel (MEDEIROS et al., 2002). O controle gradual da temperatura a uma taxa de resfriamento de  $-0,03$  a  $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$  entre 20 a 5°C, poderá minimizar as alterações físico-químicas e estruturais da membrana plasmática causadas pelo frio (KAISER et al., 1992). A adição de lipídios e lipoproteínas nos diluentes de sêmen, como a gema do ovo ou do leite, respectivamente, reduzem o choque térmico contribuindo na manutenção da integridade da membrana plasmática (GRAHAM, 1996).

Contudo, mesmo com o controle gradual de temperatura e utilizando diluentes com protetores de membrana, ao resfriamento observa-se diminuição significativa da motilidade (JASKO et al., 1992), bem como na capacidade fecundante (STOREY, 1997), quando o sêmen é armazenado por mais de 24h a 5°C. Em parte, isto é atribuído à peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (STOREY, 1997), devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, tornando-os altamente susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, ou popularmente denominados de radicais livres, são átomos ou moléculas que apresentam elétrons desemparelhados no seu último nível da camada eletrônica, altamente reativos, podendo inclusive reagir entre si ou em moléculas que apresentam o seu último nível de elétrons emparelhados, a fim de tornar-se uma molécula

com todos os elétrons emparelhados (FORMAN, et al., 2004). Os íons hidroxila, radicais peróxidos e superperóxidos de hidrogênio são capazes sequestrar elétrons dos fosfolipídeos da membrana e de proteínas sulfuradas, tornando-as instáveis, ocasionando a alteração das funções celulares como, por exemplo, a perda seletiva e semipermeável da membrana plasmática.

No ejaculado, as EROs, embora em baixas concentrações, estão envolvidas na capacitação espermática, nos processos de hiperativação e da função cinética dos espermatozoides (AGARWAL et al., 2006), na ligação à zona pelúcida e à membrana do oócito (BLUMER et al., 2007). O desequilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs pode ser prejudicial ao espermatozoide. O plasma seminal apresenta na sua composição agentes antioxidantes não enzimáticos como a glutathiona, o piruvato e  $\alpha$ -tocoferol, bem como agentes enzimáticos representados principalmente pela superperóxido dismutase, catalase e pelo sistema glutathiona-peroxidase, os quais são responsáveis por promover o equilíbrio redox no ejaculado. A glutathiona é um antioxidante natural presente na célula responsável por doar elétrons para as EROs através das pontes de enxofre existente na cisteína, uma das moléculas que juntamente com a glicina e glutamina que compõe esta molécula.

A suplementação de agentes antioxidantes ao sêmen já foi amplamente estudada *in vitro* e *in vivo* em várias espécies, como humanos, suínos, bovinos, coelhos e equinos (ALVAREZ & STOREY, 1983; BECONI et al., 1993; KESSOPOULOU et al., 1995; BAKER et al., 1996; DONNELLY et al., 1999; BALL et al., 2001; BILODEAU et al., 2001; PEÑA et al., 2003) apresentando resultados favoráveis, ou questionáveis quanto ao uso de determinadas moléculas. Os tióis de baixo peso molecular como, por exemplo, a N-Acetil Cisteína, Cisteamina,  $\beta$ -Mercaptoetanol e a glutathiona (antioxidante natural) têm sido pesquisados nos diluentes de sêmen para avaliar o grau de proteção promovido pelos tióis ou como os tióis evitam o dano oxidativo (BILODEAU et al., 2001; PAGL et al., 2006; WHITAKER et al., 2012).

A N-Acetil-L-cisteína (NAC) é um composto tiólico que contém um composto sulfidril ( $C_5H_9NO_3$ ) que possui baixo peso molecular (163,2), com

ação antioxidante e amplamente utilizada na clínica médica humana (ZIMENT, 1988) como mucolítico. Sua primeira aplicação foi efetuada para combater doenças obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. Adicionalmente foi utilizada como antídoto na intoxicação por paracetamol. A N-Acetil Cisteína, assim como os demais tióis, apresenta pontes de enxofre capazes de doar elétrons às EROs, atuando como antioxidantes externos à célula. Além disso, preserva o aminoácido cisteína presente no meio extracelular que atua não apenas como antioxidante externo, mas também como antioxidante interno favorecendo na formação de glutathione. A cisteína, um dos aminoácidos que compõe a glutathione, entra na célula através de receptores específicos que a reconhecem para formar a glutathione, porém caso ela seja oxidada no meio extracelular, se transformando em cistina, ela acaba não sendo reconhecida por estes receptores e, portanto ocorrerá uma diminuição na síntese de glutathione.

Embora, a N-acetil Cisteína apresente a capacidade de promover a proteção contra as EROs, algumas pesquisas desenvolvidas com equinos relatam que este antioxidante não protegeu a integridade de membrana, nem preservou a motilidade espermática (PAGL et al., 2006; REGHINI et al., 2011). Na espécie humana, HUGHES *et al* (1998) verificaram que a N-Acetil cisteína intensificou o aparecimento de lesões no DNA espermático quando amostras de sêmen foram submetidos a irradiação por raio X, enquanto outros antioxidantes como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e urato promoveu a proteção deste.

No ejaculado, em baixas concentrações, as EROs estão envolvidas na capacitação espermática, e nos processos de hiperativação e da função cinética dos espermatozoides (AGARWAL et al., 2006) e, também, na ligação à zona pelúcida do oócito (BLUMER et al., 2007). Apesar dos efeitos benéficos na fisiologia do espermatozoide, o desequilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs pode ser prejudicial ao mesmo.

O plasma seminal apresenta em sua constituição agentes antioxidantes não enzimáticos como a glutathione, piruvato e  $\alpha$ -tocoferol, além dos enzimáticos como a superperóxido dismutase, catalase e sistema

glutathiona peroxidase entre outros, responsáveis por promover o equilíbrio redox no ejaculado. Contudo, a diluição de sêmen é necessária por auxiliar na manutenção espermática durante o resfriamento, o que contribui na redução dos antioxidantes naturais presentes no plasma seminal. Além disso, este desequilíbrio torna-se pronunciado por resíduos mitocondriais derivados do metabolismo espermático (ADRABI, 2007) e por contaminantes bacterianos, além de ser intensificado quando há leucócitos presentes no ejaculado (PASQUALOTO et al., 2003).

Sabe-se que na espécie equina, o plasma seminal é rico em proteínas sulfuradas, o que pode comprometer a viabilidade espermática. Como as pesquisas que evidenciam o efeito da NAC sobre o sêmen diluído e teores acima de 20% de plasma seminal são escassas, neste estudo avaliou-se através da motilidade progressiva, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática, o efeito de 50% de plasma seminal em diluente Kenney (1:2) (Experimento 1) e com três concentrações de NAC (Experimento 2) sobre o sêmen equino resfriado a 5°C.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Inseminação artificial

A inseminação artificial (IA) bem sucedida em éguas foi relatada no final do século 19 na Hungria, Rússia e Polônia (VON CHELCHOWSKI, 1894 apud AURICH, 2012). Contudo, a popularização da técnica da IA em equinos ocorreu a partir da década de 1930, através de programas de inseminação artificial realizados na Rússia e China (BRINSKO & VARNER, 1992). Após a segunda guerra mundial, apesar do número de éguas inseminadas ter decrescido, a inseminação artificial teve um papel diferente do período de guerra, sendo destinada para a produção de animais de esportes (AURICH, 2012). O uso da IA e do transporte de sêmen de garanhões aumentou em todo mundo a partir da década de 70. Embora existam relatos do nascimento de animais provenientes de IA, muitos potros não foram registrados nas associações de raça (KATILA, 1997).

Nas últimas quatro décadas, vários estudos foram conduzidos a fim de avaliar as taxas de prenhez com monta natural e inseminação artificial, bem como a inseminação artificial com sêmen preservado refrigerado e congelado. Um exemplo é a pesquisa de Hugues & Loy (1970) que compararam a monta natural (64%) e a IA com sêmen puro (76%) observando similaridade nos índices de gestação. Keller *et al.*, (2001) compararam índices de prenhez ao inseminar éguas com sêmen fresco e refrigerado a 5°C por 24h, obtendo 71,4 e 83%, respectivamente ( $P>0,05$ ). Jasko *et al.* (1992) ao comparar o índice de prenhez entre o sêmen resfriado e congelado verificaram que no primeiro ciclo as taxas foram de 65 e 56%, respectivamente.

Na espécie equina estima-se que apenas 30 a 40% dos garanhões produzam sêmen de boa qualidade para o processo de congelamento (ALVARENGA *et al.*, 2003), ou seja, acima de 50% dos garanhões não toleram este processo de criopreservação. Isto se deve a diferenças na proporção entre ácidos graxos insaturados e saturados presentes na membrana espermática,



sendo os insaturados os que apresentam maior permeabilidade de membrana e, conseqüentemente, conferem melhor congelabilidade. Estes garanhões são considerados “good freezers” (GARCIA et al., 2011). Em função da pequena população de cavalos tolerarem o processo de congelamento, a refrigeração de sêmen vem sendo a principal alternativa na preservação do sêmen equino, pois apresenta a vantagem de maior viabilidade no trato uterino e, conseqüentemente, maior índice de fertilidade. Apesar disso, a refrigeração de sêmen apresenta limitações, sendo que o principal entrave é o curto tempo de conservação, quando comparado ao sêmen congelado. Este fato limita para a maioria dos garanhões a conservação do sêmen por 24 a 48h e varia de acordo com a temperatura de resfriamento.

## **2.2. Fatores que afetam a qualidade do sêmen equino resfriado**

### **2.2.1. Diluente.**

O uso de diluentes de sêmen é fundamental para prolongar a sobrevivência espermática, pois estabiliza a atividade enzimática, promovendo a manutenção da integridade de membrana, além de protegê-lo contra as condições desfavoráveis como o choque térmico, efeitos deletérios do plasma seminal, bem como produtos tóxicos derivados do metabolismo espermático e diminuindo a proliferação microbiana (KATILA, 1997).

A composição dos diluentes de sêmen equino obedecem algumas características seminais específicas da espécie, como a osmolaridade próxima de  $300 \text{ mOsm.Kg H}_2\text{O}^{-1}$  (PICKETT et al., 1976) e pH neutro. A combinação de reagentes eletrólitos e não eletrólitos diferem nos variados tipos de diluentes disponíveis comercialmente, apresentando osmolaridades entre 250 a 400  $\text{mOsm.Kg H}_2\text{O}^{-1}$  (KATILA, 1997). Os espermatozoides equinos apresentam limitada tolerância osmótica, quando comparados aos de outras espécies de mamíferos, podendo reduzir em até 50% a motilidade, quando expostos em

osmolaridades abaixo de 200 e mais de 400 mOsm.Kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> (GAO et al., 1995). González-Fernández e colaboradores (2012) submetem espermatozoides equinos a diferentes gradientes de osmolaridade e verificaram que a célula, quando colocada novamente em condição isosmolar, retornava ao seu volume isotônico, no entanto apresentava danos irreparáveis sobre o plasmalema e mitocôndrias.

Alguns lipídeos da gema de ovo, determinados tipos de lipoproteínas do leite, albumina sérica bovina, álcool polivinílico e lipossomos são alguns dos componentes utilizados nos diluentes para resfriamento de sêmen. Estas substâncias auxiliam a reduzir os impactos causados pelo frio sobre a membrana plasmática, principalmente contra as mudanças bruscas de temperatura. Os diluentes que contêm leite são os mais utilizados na manutenção do sêmen refrigerado, principalmente o leite em pó desnatado (KENNEY et al., 1975), devido a sua praticidade. O leite é um fluido biológico de complexa constituição, que contém componentes benéficos e prejudiciais aos espermatozoides (BATELLIER et al., 1998). Segundo Mies Filho (1987), um dos componentes prejudiciais aos espermatozóides é a lactenina, um agente enzimático anti-estreptococos. Para inativar esta proteína são necessários 10 minutos de aquecimento a 95°C. Entretanto, Meirelles e colaboradores (1998) verificaram que a inativação das proteínas do leite não é necessária, desde que o leite já seja tratado pela ultra-alta temperatura (UHT). Apesar de algumas pesquisas mostrarem que o tratamento térmico proporciona melhores condições para a manutenção espermática, o diluente com leite em pó desnatado com 5% de glicose (KENNEY et al., 1975) apresentou melhores taxas de prenhez (52%), quando comparado ao leite fluido desnatado com tratamento térmico (40%) (PICKETT & AMANN, 1987). Dentre as proteínas presentes no leite, as lactoglobulinas do tipo  $\beta$ , que possuem elevada solubilidade no leite apresentaram melhor efeito protetor do espermatozoide equino contra as variações de temperatura, enquanto outros tipos de proteínas (lactoglobulinas do tipo  $\alpha$ ) foram tóxicas (BATELLIER et al., 1998). Estes mesmos autores desenvolveram um diluente com proteínas purificadas do leite, compostas com sais Hank's (INRA96) e verificaram melhores taxas de prenhez

quando o sêmen foi mantido a 15°C. A sua vantagem foi atribuída à purificação das proteínas, o que eliminou aquelas que causam danos aos espermatozoides, as quais agem principalmente em temperaturas mais altas de armazenamento (BATELLIER et al., 1998).

### **2.2.2. Taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento**

A redução do metabolismo espermático pela diminuição da temperatura é fundamental para a preservação do ejaculado por longos períodos, pois auxilia na manutenção espermática, chegando a redução da atividade metabólica em até 90% quando armazenado a 5°C. Além disso, proporciona a redução da proliferação microbiana, contribuindo em maior viabilidade do sêmen. Varner *et al.* (1989) inseminaram éguas distribuídas em três grupos distintos, com sêmen fresco, refrigerado por 24h a 20°C e outro a 5°C também por 24h verificando que as taxas de prenhez foram similares entre os grupos. MAGISTRINI *et al.* (1992) compararam temperaturas de resfriamento de 15 e 5°C e observaram que a temperatura maior apresentou maiores taxas de prenhez, corroborando com a pesquisa conduzida anteriormente por PROVINCE *et al.* (1984). Entretanto, estudos ao longo das três últimas décadas tornaram evidente que o armazenamento do sêmen por períodos acima de 24h, a temperatura de resfriamento próxima a 5°C é a que proporciona a manutenção da qualidade do sêmen (KATILA et al., 1997), principalmente por resultar em menores índices de marcadores apoptóticos (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2013).

Contudo, a redução da temperatura causa danos diretos, como a ruptura das membranas e indiretos, como alteração da função celular (SQUIRES et al., 1999). A membrana plasmática é uma bicamada lipídica semipermeável que exerce a seleção de nutrientes específicos e o equilíbrio do gradiente osmótico, servindo como uma barreira física entre o meio intra- e extracelular. As alterações causadas pelo frio promovem mudanças do estado físico da membrana, do estado líquido cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos são desorganizadas, para o estado de gel, onde as cadeias de ácidos graxos tornam-se paralelas e rígidas (MEDEIROS et al., 2002). As alterações

na integridade física da membrana exercem impactos negativos sobre a capacidade da regulação osmolar, na seleção de metabólitos, contribuindo na redução do limiar de tolerância ao resfriamento.

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

No mercado internacional, existem diversos modelos de equipamentos que servem para a manutenção e transporte do sêmen refrigerado, os quais se diferenciam de acordo com a capacidade de manter determinada temperatura, conforme o tempo necessário para o armazenamento. O modelo mais conhecido mundialmente é o Equitainer®, que mantém a temperatura em 5°C por até 72h. O estudo conduzido por Brinsko *et al.* (2000) comparou seis tipos de recipientes para transporte de sêmen (Equitainer I, Equitainer II, Equitainer III, Expectafoal, Bio-Flite, Lane STS e Equine Express) e identificou que praticamente todos proporcionaram bons resultados de motilidade progressiva, não havendo diferença entre eles. Porém, o Equitainer II® foi o que revelou capacidade de manter a temperatura de 5°C por período maior de tempo. No Brasil, vários modelos vêm sendo desenvolvidos e muitos se encontram disponíveis, como o Botutainer®, que mantém a temperatura em 5°C e o Botubox® em aproximadamente 15°C. Todos os modelos para resfriamento de sêmen são equipados com gelo reciclável e são capazes de promover uma curva de resfriamento adequada, principalmente na faixa crítica de temperatura onde ocorre a mudança do estado físico da membrana.

### **2.2.3. Ação das espécies reativas de oxigênio - EROs**

Uma diminuição significativa da motilidade e da capacidade fecundante do espermatozóide é observada, mesmo fazendo o controle gradual de temperatura e utilizando diluentes que apresentam componentes protetores de membrana (JASKO et al., 1992; STOREY, 1997). Em parte, isto é atribuído à peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides (STOREY, 1997), devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e das baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu pequeno citoplasma (NICHI, 2009), o que os torna altamente susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs).

As EROs atacam os fosfolípidos da membrana, especificamente em regiões próximas às insaturações dos ácidos graxos poli-insaturados, onde iniciam uma cascata de peroxidação lipídica que, se não for interrompida, comprometem a integridade da cromatina espermática (AITKEN & KRAUSZ, 2001). Os íons hidroxila  $\text{OH}^-$  desempenham danos importantes sobre o DNA, podendo alterar a estrutura das purinas e pirimidinas nas cadeias de ácidos nucleicos além de desestruturar poli-nucleotídeos, interferindo assim, na informação genética (URREGO et al., 2008).

### **2.3. Antioxidantes na suplementação do sêmen refrigerado**

O processo de criopreservação, seja congelamento, ou refrigeração, predispõe ao estresse oxidativo e a adição de antioxidantes aos meios de criopreservação vem sendo muito utilizada para promover o equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes. A suplementação do sêmen com agentes antioxidantes vem sendo uma alternativa que vem sendo muito estudada nestas últimas décadas em várias espécies, como humanos, suínos, bovinos, coelhos e equinos (ALVAREZ & STOREY, 1983; BECONI et al., 1993; KESSOPOULOU et al., 1995; BAKER et al., 1996; AURICH et al., 1997a; DONNELLY et al., 1999; BALL et al., 2001; BILODEAU et al., 2001; PEÑA et al., 2003), apresentando resultados favoráveis ou questionáveis quanto ao uso de determinadas moléculas. Em algumas pesquisas, os resultados 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 não se obteve melhora na viabilidade espermática (REGHINI et al., 2011; PGAL et al., 2006).. As EROs são combatidas pelos antioxidantes através da doação de elétrons para último nível da camada eletrônica, o que antes, os radicais livres apresentavam elétrons desemparelhados. A síntese de glutathione, um antioxidante natural presente na célula, poderá ser aumentada através da proteção do aminoácido cisteína presente no extracelular. A cisteína é a parte funcional da glutathione em doar elétrons para as EROs, caso este aminoácido seja oxidado no meio extracelular, se transformando em cistina a forma oxidada, acaba não sendo reconhecida pelos receptores responsáveis por sua captação para o interior da célula.

Aurich *et al.* (1996) suplementaram dois diluentes de sêmen, o leite desnatado em pó e glicina com os antioxidantes ácido ascórbico e a catalase e, e observaram que a adição de ácido ascórbico proporcionou uma maior percentagem de espermatozoides com membrana íntegra, em ambos diluentes, enquanto que a adição de catalase não melhorou a integridade de membrana. Bilodeau *et al.* (2001) avaliaram o efeito dos tióis cisteína, glutathione e  $\beta$ -mercaptoetanol na prevenção da diminuição da motilidade do sêmen bovino congelado com ou sem a indução do estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio. Estes autores constataram que na ausência do peróxido de hidrogênio exógeno, todos os tióis, na concentração de 0,5mM, proporcionaram a manutenção da motilidade por até seis horas. No entanto, com a adição do peróxido de hidrogênio, verificaram que são necessários 1mM de cada tiól na preservação da motilidade por até seis horas. Estas conclusões corroboram com as observações de Ball *et al.* (2001) no sêmen de garanhões, determinando que com a baixa concentração de antioxidantes ou pela alta concentração de neutrófilos no plasma seminal, o estresse oxidativo poderá ser minimizado no sêmen equino suplementado com antioxidante.

Os tióis de baixo peso molecular como, por exemplo, a N-Acetil Cisteína, Cisteamina,  $\beta$ -Mercaptoetanol e a glutathione (antioxidante natural) pertencem a uma grande classe de agentes antioxidantes, sendo pesquisados

em diluentes de sêmen para evitar o dano oxidativo (BILODEAU et al., 2001; PAGL et al., 2006; WHITAKER et al., 2012). Embora, a N-Acetil-L-Cisteína apresente resultados satisfatórios nas concentrações de 0,5mM e 1mM, respectivamente, na suplementação do sêmen canino (MICHAEL et al., 2009) e do suíno (WHITAKER et al., 2012). Em equinos não apresentou melhora na integridade de membrana e na motilidade quando utilizadas em concentrações entre 0,209 e 20mM (PGAL et al., 2006; REGHINI et al., 2011), enquanto que em humanos intensificou o aparecimento de lesões no DNA espermático (HUGHES et al., 1998). Estes resultados variam de acordo com as concentrações utilizadas e variações individuais, o que poderá, com o mesmo antioxidante combater as EROs, mas também poderá apresentar nenhum efeito ou até mesmo lesionar partes específicas da célula.

Hughes *et al.* (1998), verificando os efeitos da suplementação com antioxidantes, durante preparações com gradiente Percoll, na integridade do DNA espermático em humanos, perceberam que, logo após induzir danos ao DNA por irradiação de raio-X, os tratamentos com ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e urato promoveram a proteção contra a irradiação, porém a acetil-cisteína intensificou os danos ao DNA com o decréscimo da percentagem de DNA na população de espermatozoides.

Os Tióis apresentam em sua estrutura um radical tiól, que os torna capazes de desnaturar proteínas devido à habilidade de clivar pontes de enxofre presentes principalmente em proteínas terciárias e quaternárias (DAVID et al., 2005). A estrutura compacta da cromatina é mantida por pontes de dissulfeto entre o DNA e as protaminas, sendo a protamina a que promove uma maior proteção do DNA contra danos (FRASER & STRZEZEK, 2004). Nos testes que avaliam as lesões de DNA como, por exemplo, o Cometa e o de Dispersão da Cromatina Espermática, o  $\beta$ -mercaptoetanol e o Ditioneitol são os tióis utilizados para clivar as pontes de enxofre entre o DNA e as protaminas, além de promover a desnaturação proteica de enzimas como as ribonucleases (DAVID et al., 2005), usualmente em concentrações entre 2,0 a 10% da solução de lise.

## 2.4. Plasma seminal: Criopreservação

A criopreservação de sêmen causa alterações na membrana plasmática o que contribui na formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são responsáveis por induzir à capacitação espermática, fenômeno similar ao que acontece em condições naturais no útero (POMER & MEYERS, 2002). Este processo oxidativo gera o aumento de cAMP capaz de induzir a fosforilação de resíduos de tirosina através da estimulação da proteína Kinase A (AITKEN, et al., 1995). A capacitação artificial causada pela criopreservação aumenta a demanda celular por energia, resultando em um esgotamento das reservas energéticas, o que compromete a fecundação do oócito.

A adição de plasma seminal ao sêmen resfriado e congelado-descongelado vem sendo muito estudada com o objetivo de preservar a viabilidade do sêmen criopreservado (AURICH et al., 1996; KARESKOSKI & KATILA, 2008; ALGHAMDI et al., 2002; LOVE, 2005). A presença de antioxidantes no plasma seminal é uma das justificativas para seu uso no sêmen criopreservado, pois o plasma tem em sua constituição ascorbato, urato, grupos tióis, glutatona,  $\alpha$ -tocoferol, além de enzimas antioxidantes como catalases, superperóxido-dismutase, glutatona-redutase (Li, 1975).

Contudo, as técnicas de criopreservação preconizam a retirada do plasma seminal, uma vez que a presença do mesmo também promove um efeito deletério sobre a preservação das células espermática (KARESKOSKI & KATILA, 2008). Sabe-se que, no sêmen, volumes superiores a 20% de plasma seminal reduzem o percentual de células móveis bem como a fecundidade dos espermatozoides (KATILA, 1997), porém a remoção total do plasma também compromete a motilidade espermática (ALGHAMDI et al., 2002). LOVE *et al.* (2005) verificaram que a remoção prévia do plasma seminal do sêmen equino refrigerado por 24 e 48 horas conferiu proteção à integridade do DNA espermático, mas quando se adicionava plasma seminal observavam maiores danos ao DNA. Entretanto, AURICH *et al.* (1996) verificaram que, quando se adicionava ao sêmen de garanhões de baixa congelabilidade o plasma seminal



dos animais de alta congelabilidade, observaram uma melhora na viabilidade espermática.

O plasma seminal apresenta em sua constituição grandes concentrações de proteínas sulfuradas as denominadas CRISPs, principalmente a CRISP-3 (SCHAMBONY et al., 1998). Estas proteínas são produzidas principalmente na ampola e nos vasos diferentes, o que contribui com altas concentrações destas no plasma seminal. As CRISPs são proteínas que apresentam 16 resíduos de cisteína ligados a pontes de dissulfeto (GUO et al., 2005). Elas desempenham diferentes funções como a participação da fusão espermática com a superfície do oócito, de ligar-se a superfície espermática durante o transito epididimal além de estar participando da capacitação espermática (DA ROS et al., 2004). O uso de antioxidantes sulfurados como a cisteína vem sendo muito estudada na suplementação de sêmen, pois a diluição de sêmen reduz a quantidade dos antioxidantes naturalmente presentes no sêmen. Em contraste, altas concentrações de plasma seminal (>20%) utilizando antioxidantes a base de cisteína poderá comprometer a viabilidade espermática, pois, como se sabe, o plasma é rico em proteínas sulfuradas.

## **2.5. Técnicas de avaliação de sêmen**

### **2.5.1. Motilidade Espermática**

Esta avaliação consiste na determinação percentual de espermatozóides móveis no ejaculado. A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação de sêmen, o que constitui um dos mais importantes parâmetros na estimativa da viabilidade espermática (PICKETT, 1993). Apesar de ser um componente indispensável no processo de fertilização, o uso deste método de avaliação não apresenta uma absoluta correlação com a fertilidade (MATTOS, 1995). A motilidade é uma das características seminais que melhor apresenta correlação com dados de fertilidade (JASKO et al., 1992). Os tipos de movimento observados nesta avaliação poderão ser diferenciados em motilidade progressiva, circular, e

derivações dos dois primeiros; a motilidade total consiste na soma de todos os outros tipos. Na motilidade progressiva os espermatozoides se movimentam em uma trajetória praticamente linear, enquanto a circular os espermatozoides se movimentam em círculos amplos. Os movimentos circulares amplos na espécie equina são bastante observados, devido à implantação abaxial do colo.

As análises de motilidade por Análise Computadorizada é um método objetivo preciso que vem sendo utilizados em muitos estudos com sêmen equino. No entanto, o método subjetivo de exame visual, utilizando microscópio de contraste de fase e platina térmica aquecida, é aceitável, quando realizado por um observador experiente (VARNER, 1992).

### **2.5.2. Funcionalidade da Membrana – Teste Hiposmótico**

Este teste verifica o percentual de células que apresentam membrana funcional quando submetidos a uma solução hipotônica compreendida geralmente entre 25 e 150mOsm.Kg H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>. A célula viável, neste teste, apresenta edemaciamento do flagelo o que leva com que a cauda se dobre e, por vezes, o edemaciamento na região da peça intermediária, enquanto a célula com membrana não funcional não apresenta nenhuma destas características (NEILD et al., 2000). É um método simples e de fácil execução, que tem sido utilizado com bastante sucesso nas avaliações rotineiras de sêmen equino (NEILD et al., 2000).

As soluções utilizadas nesta avaliação usualmente são à base de frutose, lactose, sacarose e citrato de sódio. Neild *et al.* (1999) verificaram que as correlações entre o teste hiposmótico e motilidade progressiva ou com espermatozoides morfológicamente normais foram de  $r=0,75$  e  $r=0,51$  e  $r=0,26$  e  $r= -0,22$ , respectivamente, para o sêmen a fresco e congelado. Já a correlação com espermatozoides com membrana intacta na fluorescência foi de  $r=0,32$ .

Lomeo & Giambérsio (1991) avaliaram a funcionalidade de membrana com diferentes soluções e com água destilada no sêmen em humanos e verificaram que a água destilada pode ser utilizada (Water test). Em

equinos, o uso da água destilada na avaliação da funcionalidade de membrana foi adaptado por Lagares e colaboradores (2000), determinando a proporção de 1:3, ou seja, uma parte de sêmen e duas de água destilada, perfazendo a osmolaridade aproximada de  $100\text{mOsm.Kg H}_2\text{O}^{-1}$ . As amostras devem ser aquecidas a  $38^\circ\text{C}$  e, após a deposição da amostra em água destilada previamente aquecida, a avaliação é realizada em oito minutos em lâmina sob lamínula com auxílio de um microscópio com contraste de fase com aumento de 400x.

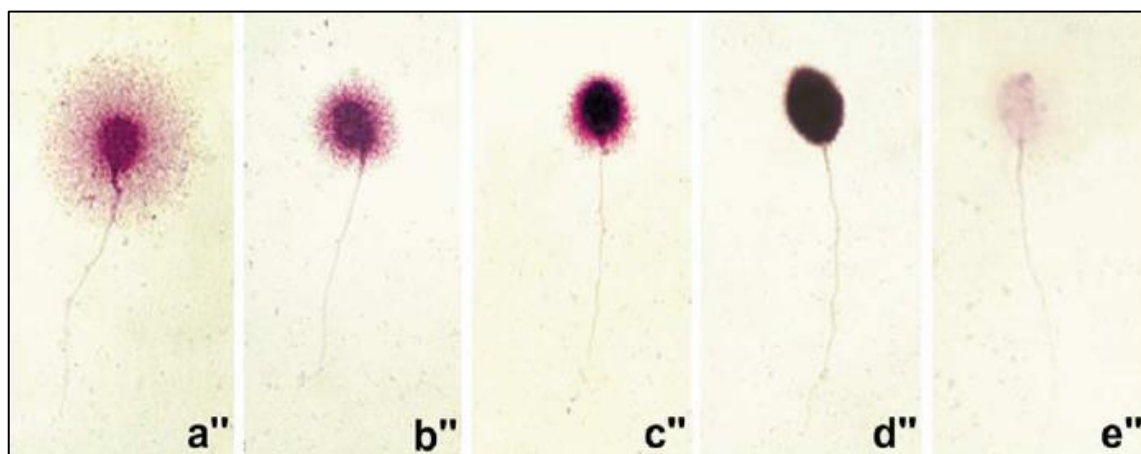
### **2.5.3. Avaliação da fragmentação do DNA**

A integridade da cromatina é atualmente vista como um importante fator para prever a fertilidade do macho até no desenvolvimento embrionário inicial (CARRETERO et al., 2012).

Segundo Córtez-Gutiérrez *et al.* (2009), as técnicas de avaliação da fragmentação do DNA são divididas em dois grupos. O primeiro utiliza a metodologia para marcar a fita simples ou dupla de partes danificadas do DNA, por exemplo, o uso de um processo enzimático que incorpora nucleotídeos marcados *in situ* como na técnica de TUNEL através da ação da Deoxiuridil transferase terminal ou através da Translation Nick *in situ* (ISNT). O segundo consiste de técnicas que mensuram a habilidade de desnaturar o DNA após o tratamento, como, por exemplo, o teste de Avaliação da Integridade da Cromatina Espermática (SCSA), onde partes do DNA danificado são identificadas por sondas fluorescentes, o teste Cometa, que é realizado com o preparo de micro-géis de agarose em eletroforese, e o teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SDC). A metodologia de SDC apresenta dois protocolos diferentes, sendo o primeiro com o uso de uma solução ácida, geralmente com ácido clorídrico a 0,08N e, posteriormente, as amostras são colocadas em solução de lise contendo detergentes, além de conter um agente redutor capaz de clivar pontes de enxofre e de desnaturar as ribonucleases (DAVID et al., 2005). Este protocolo é muito utilizado para avaliar a fragmentação de espermatozoides em humanos (FERNÁNDEZ et al., 2003).

No segundo protocolo, as amostras são expostas apenas na solução de lise, que apresenta os mesmos componentes em relação ao primeiro. A interpretação dos resultados é diferente em ambos, sendo que no primeiro (Figura 1) o núcleo com DNA fragmentado não mostra um halo de dispersão da cromatina aparente (FERNÁNDEZ et al., 2005), enquanto no segundo (Figura 2) observa-se grandes halos de dispersão da fragmentação da cromatina em torno da cabeça espermática (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007).

Fernández e colaboradores (2005) descrevem que o SDC é um método simples, rápido, preciso e que apresenta alta reprodutibilidade para a análise de fragmentação do DNA espermático. Além disso, os mesmos autores correlacionaram o SDC com SCSA, determinando que o SDC apresenta forte correlação com SCSA ( $r=0,85$ ).



**Figura 1:** Teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SDC). Amostra exposta em solução ácida de 0,08N de HCL, realizada em sêmen humano. O maior halo corresponde ao DNA não fragmentado, enquanto que o pequeno ou ausência de halo significa DNA fragmentado (Adaptada de FERNÁNDEZ et al., 2005).

### 3. HIPÓTESES

1. A manutenção do sêmen equino com 50% do plasma seminal em diluente Kenney a 5°C pode comprometer, além da motilidade, a funcionalidade de membrana e a área de dispersão da cromatina espermática.
  
2. A manutenção do sêmen equino com 50% do plasma seminal em diluente Kenney a 5°C com 0,5; 2,5 e 5,0 mM de N-Acetil-L-Cisteína pode comprometer além da motilidade, a funcionalidade de membrana e a área de dispersão da cromatina espermática.

## 4. OBJETIVOS

1. Verificar o efeito de 50% de plasma seminal equino em diluente Kenney a 5°C sobre a motilidade, funcionalidade de membrana e integridade da cromatina espermática. .
2. Verificar o efeito de 50% do plasma seminal em diluente Kenney a 5°C com 0,5; 2,5 ou 5,0 mM de N-Acetil-L-Cisteína sobre a motilidade, a funcionalidade de membrana e a área de dispersão da cromatina espermática

## 5. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

*Acta Scientiae Veterinariae*

Murilo Farias Rodrigues, Janislene Mach Trentin, Gilson Antônio Pessoa,  
Adriana Pires Neves, Mara Iolanda Rubin Batistella Rubin

## Seminal Plasma: Sperm chromatin dispersion, motility and hypoosmotic test in equine semen cooled at 5°C

Murilo Farias Rodrigues<sup>1</sup>, Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>, Gilson Antônio Pessoa<sup>1</sup>,  
Adriana Pires Neves<sup>2</sup>, Mara Iolanda Rubin Batistella<sup>3</sup>

### Abstract

**Background:** The evaluation of DNA integrity is crucial to determine sperm viability of cooled semen, but there are few studies that characterize the impacts of high concentrations of seminal plasma during cooling on the chromatin integrity of equine semen diluted with high content seminal plasma. The aim of this study is to determine the impact of the high percentage of seminal plasma (50%) on motility, membrane functionality, and sperm chromatin integrity of equine semen cooled at 5°C.

**Material, Methods & Results:** Nine ejaculates from nine poney stallions diluted in a proportion 1:2 in skimmed milk powder solution were evaluated at 0h (fresh semen), 12, 24, 36 and at 48 hours of cooling. Motility was measured up to 24 hours. The area of the sperm chromatin dispersion assessment was  $50.1\mu\text{M}^2$  for fresh, increasing to  $67.6\mu\text{M}^2$  within 24h of cooling. However, the hypo-osmotic test showed a significant ( $P<0.05$ ) decrease (32.4%), in the percentage of cells with membrane functional at 12h of cooling compared to fresh semen (53.5%). The percentage of motile cells decreased within 12h of cooling from 38.9 to 19.7%, without difference between 12 and 24h of cooling. The sperm chromatin dispersion and hypo-osmotic test showed no differences from 24 to 48h of cooling.

**Discussion:** The greatest damage to chromatin occurred from the 24h however we observed that there was a reduction in the percentage of motile cells and membrane functional within 12h of cooling. The semen dilution volume which results greater than 20% of seminal plasma is implied because of damage to the sperm (AURICH et al., 1996), which was observed through the motility test and hyposmotic, whereas we used 50% of seminal plasma. On the other hand, this study shows that the high content of seminal plasma does not cause alterations in the integrity of sperm chromatin in the first 24h of cooling, keeping similar hyposmotic test, at 36 and 48h of cooling. We conclude that the greatest damage to the sperm chromatin using a 50% volume of seminal plasma occurs in semen cooled at 5°C up to 24h.

**Keywords:** semen, horse, cooling, plasma, DNA.

**Descritores:** sêmen, cavalo, resfriamento, plasma, DNA.

---

<sup>1</sup> Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal:Equinos/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9090 91.540-000 Porto Alegre/RS.

<sup>2</sup> Prof. Associada da Universidade Federal do Pampa, Campus de Dom Pedrito, Dom Pedrito/RS

<sup>3</sup> Prof. Titular, Embryolab, DCGA/CCR, Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-900 Santa Maria/RS



## INTRODUÇÃO

O plasma seminal é um componente do sêmen responsável por fornecer substratos metabolizáveis, tamponamento do pH e da osmolaridade, além de servir como veículo para o transporte dos espermatozoides. Além disso, é mediador da capacitação espermática e da resposta pós-coital no útero das éguas (TROEDSSON et al., 2003).

Embora o plasma seminal seja um componente natural presente no sêmen, concentrações superiores a 20% na diluição de sêmen causam efeitos deletérios aos espermatozoides como diminuição do percentual de móveis e a capacidade de fecundidade dos espermatozoides (KATILA, 1997). Sabe-se que altos percentuais de plasma seminal na diluição de sêmen causam maiores danos à integridade do DNA espermático do sêmen mantido resfriado (LOVE et al., 2005). As medidas para minimizar o efeito deletério do plasma seminal ao espermatozoide consistem em fazer uma diluição de sêmen resfriado com volumes entre 5 a 20% de plasma seminal (JASKO et al., 1992), ou uma diluição final de 25 milhões de espermatozoides por mililitro (VARNER et al., 1987).

O DNA íntegro é fundamental por desempenhar o gerenciamento de informações necessárias para o funcionamento celular. A criopreservação de sêmen aumenta a susceptibilidade a lesões ao DNA bem como danos à membrana plasmática, como a perda da capacidade seletiva e semipermeável da membrana conferindo em uma menor fertilidade do sêmen mantido resfriado. Na preservação do sêmen resfriado próximo a 5°C, os maiores danos causados pelo resfriamento ao espermatozoide são identificados pela motilidade a partir das 24 horas (JASKO et al., 1992). Contudo, sabendo do efeito deletério sobre a motilidade e integridade da membrana espermática determinado por grandes volumes de plasma seminal no resfriamento de sêmen equino (>20%) nas primeiras horas de resfriamento, se desconhece qual o comprometimento que ocorre no DNA espermático. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de 50% de plasma seminal em diluente Kenney

sobre a motilidade, funcionalidade da membrana e integridade da cromatina espermática no ejaculado equino resfriado a 5°C.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Local e Animais*

A presente pesquisa foi conduzida na temporada de monta do hemisfério sul nos meses de Setembro a Dezembro de 2012, no Laboratório de Embriologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria. Nove garanhões pôneis mestiços da raça Brasileira com a faixa etária entre 9 a 13 anos serviram para execução do experimento.

### *Coletas*

Os ejaculados foram obtidos com vagina artificial modelo Hannover (GÖETZ, 1949). As coletas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos por KLUG & SIEME (2003), sendo coletados três garanhões/dia durante 3 dias da semana, perfazendo duas repetições por garanhão.

### *Exame do sêmen*

As análises macroscópicas de cor, aspecto e volume do ejaculado foram efetuadas imediatamente após a coleta. O sêmen diluído em 2,4g leite em pó desnatado e 0,150g (14,42mM) de bicarbonato de sódio e 4,90g (272mM) de glicose (Kenney, 1975) foi submetido à avaliação da motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática.

### *Análises de motilidade e funcionalidade de membrana*

A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com VARNER (1989), em microscópio de contraste de fase (Olympus BX41- Japão) com aumento de 200X. O percentual de espermatozoides com movimento

progressivo (MP) foi avaliado no momento inicial imediatamente após a diluição (0h) e após resfriamento a 5°C às 12, 24 e 48h.

Na avaliação da funcionalidade de membrana espermática utilizou-se o protocolo descrito por Lagares *et al.* (1998), sob contraste de fase em aumento de 400X. A classificação das células espermática foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por NEILD (2000). Os produtos químicos, exceto onde citado provém da Sigma Aldrich.

#### *Análise de fragmentação*

O armazenamento e o preparo das lâminas com ejaculado diluído, não refrigerado (0h) e refrigerado por 24 e 48h foram efetuados conforme recomendação do fabricante do Kit Halomax – Equus caballus (Halotech, Madri/Espanha). As amostras foram analisadas em microscópio invertido digital com fluorescência e 1000X, sob óleo de imersão (Leica DMI 4000 B, Alemanha). Um banco de 20 imagens foi armazenado de cada garanhão, de cada grupo suplementado com NAC (0,5; 2,5 e 5,0mM) ou não suplementado, bem como cada período de resfriamento para mensuração das áreas de fragmentação da cromatina espermática no software (ImageJ-1,46) (Figura 1). O software foi calibrado com uma régua graduada impressa nas imagens da câmera do microscópio.

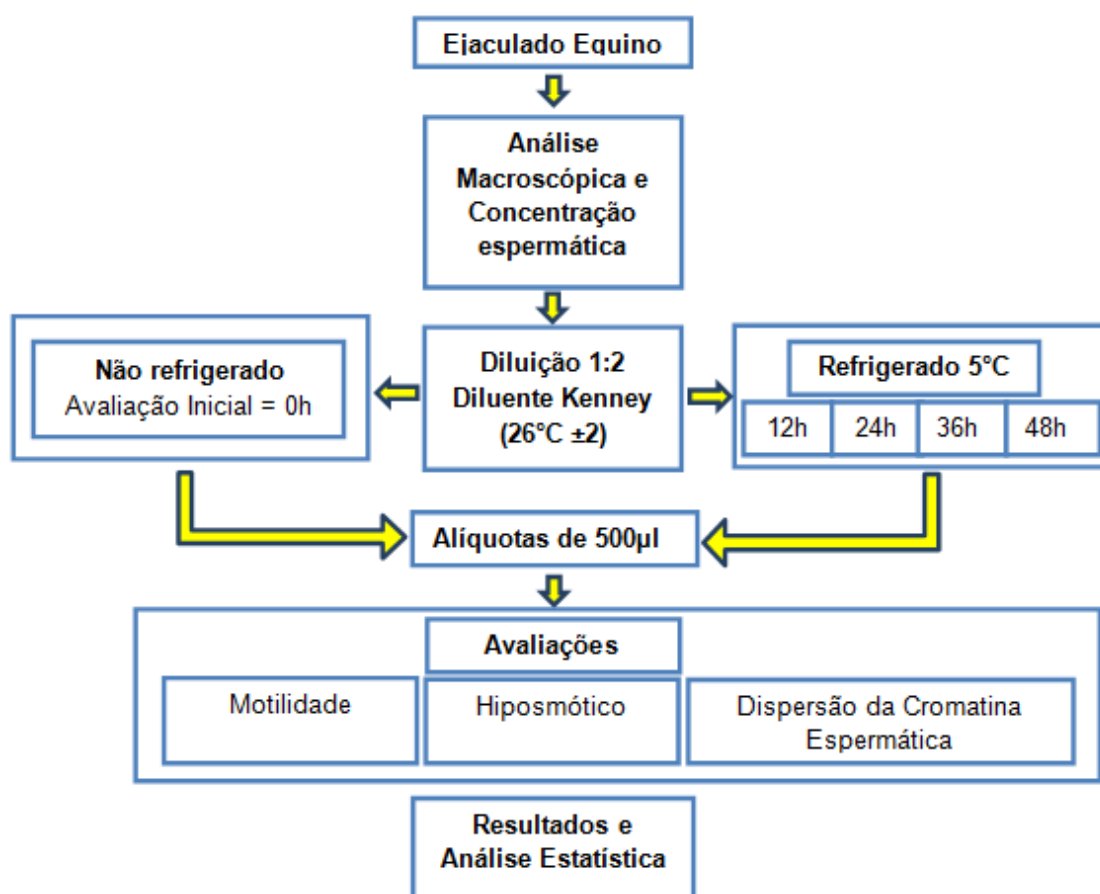
#### *Manutenção e Taxa de resfriamento do sêmen*

As amostras de sêmen diluídas foram mantidas inicialmente à temperatura ambiente (22±2°C) em tubos de 50mL (Corning) fechados, por 45 a 60 minutos. Na sequência, os tubos foram mantidos horizontalmente em geladeira regulada para 5 ± 1,6°C por 24 ou 48h. A velocidade de resfriamento em geladeira variou entre 0,6 a 0,8°C/minuto.

#### *Análise estatística*

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Neste estudo empregou-se o modelo de blocos ao acaso, sendo cada garanhão considerado um bloco. Na análise da

motilidade progressiva consideraram-se apenas os tempos zero, 12 e 24, pois na 48<sup>a</sup>h os ejaculados de alguns garanhões apresentaram grande número de amostras com valor zero. A análise da variância foi efetuada com o procedimento GLM e a comparação de m'edias foi efetuada através do teste Tukey.



**Figura 1.** Delineamento experimental dos procedimentos efetuados com o ejaculado de nove pôneis mestiços da raça Brasileira.

## RESULTADOS

A área de dispersão da cromatina espermática na avaliação inicial (0h) apresentou  $50,1\mu\text{M}^2$ , aumentando significativamente ( $P<0,05$ ) para  $67,6\mu\text{M}^2$  nas 24h de resfriamento. No teste de funcionalidade de membrana (hiposmótico) ocorreu diminuição ( $P<0,05$ ) no percentual de espermatozoides

com membrana funcional às 12h de resfriamento, comparado com o sêmen não resfriado (Tabela 1). A motilidade progressiva (MP) reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) de 38,9% no momento inicial para 19,7% após 12h de resfriamento e foi similar entre as 12 e 24h. Os testes de dispersão da cromatina espermática e hiposmótico revelaram que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os períodos de 24, 36 e 48h de resfriamento (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores médios e desvio-padrão dos testes de dispersão da cromatina espermática, funcionalidade de membrana (hiposmótico) e de motilidade progressiva em cada período de resfriamento do sêmen equino a 5°C com 50% de plasma seminal.

Períodos de Avaliação	Dispersão da Cromatina Espermática ( $\mu\text{m}^2$ )	Teste hiposmótico (%)	Motilidade Progressiva (%)
0h	50,1 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup>	53,5 $\pm$ 10,5 <sup>a</sup>	38,9 $\pm$ 16,7 <sup>a</sup>
12h	55,2 $\pm$ 13,8 <sup>a</sup>	32,4 $\pm$ 11,1 <sup>b</sup>	19,7 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>
24h	67,6 $\pm$ 14,6 <sup>b</sup>	22,4 $\pm$ 9,0 <sup>c</sup>	13,6 $\pm$ 5,9 <sup>b</sup>
36h	74,3 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	20,8 $\pm$ 10,0 <sup>c</sup>	-
48h	73,7 $\pm$ 9,4 <sup>b</sup>	18,6 $\pm$ 9,3 <sup>c</sup>	-

Letras diferentes entre períodos na mesma variável analisada indicam diferença ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O resfriamento de sêmen preserva a célula espermática na espécie equina, como nas demais espécies de grande porte, evita gastos com o transporte de animais, além de possibilitar maior aproveitamento do sêmen, quando comparado com o sêmen fresco. O frio diminui a proliferação microbiana e reduz a atividade energética dos espermatozoides, reduzindo o

catabolismo espermático, preservando o ejaculado por longos períodos (SQUIRES et al., 1999). Em nosso estudo observamos que nas primeiras 12h de resfriamento houve redução no percentual de espermatozoides com membrana funcional e diminuição da motilidade progressiva, quando comparada com a avaliação imediata (0h). Entretanto, Jasko *et al.* (1992) ao manter o sêmen resfriado a 5°C verificaram redução na motilidade espermática somente a partir das 24h utilizando <20% de plasma seminal. Entretanto, estes autores não adicionaram bicarbonato de sódio como tampão nos diluentes testados. Fica por esclarecer se a redução do percentual de células com membrana funcional, bem como da motilidade com 12h de resfriamento esteja relacionada aos 50% de plasma seminal que compunham os tratamentos, ou se o bicarbonato de sódio interferiu nos parâmetros avaliados. Neste sentido, é importante ressaltar que o pH do diluente foi de 7,45, determinado provavelmente pelos 14,4mM de bicarbonato de sódio.

Embora existam relatos de maior viabilidade espermática com o armazenamento do sêmen equino a 15°C por 24h que a 5°C (PROVINCE et al., 1985; BATELLIER et al., 2001), a maioria dos trabalhos verificaram maior motilidade espermática ao armazenar o sêmen a 5°C (VARNER et al., 1989; BALL et al., 1998), o que determinou a escolha desta temperatura neste estudo. Os ganhões da presente pesquisa apresentaram marcadas diferenças na tolerância do sêmen ao resfriamento, motivo pelo qual foi avaliada a motilidade progressiva somente até a 24<sup>a</sup> hora após resfriamento. A partir desse momento os mesmos apresentaram predominantemente motilidade local e células imóveis. Apesar disso, os outros dois métodos de avaliação não sofreram comprometimento, o que robustece a estimativa da fertilidade de um macho, pois se deve levar em conta mais de um parâmetro para efetuar o diagnóstico.

Embora, nos testes de avaliação de motilidade e hiposmótico tenha sido detectada redução da viabilidade espermática com 12h de resfriamento, no teste de dispersão da cromatina espermática o comprometimento da integridade da cromatina ocorreu somente a partir das 24h. LOVE et al (2005) avaliaram o sêmen equino diferentes volumes de plasma seminal (90, 10 e

20%) motilidade espermática e a qualidade do DNA através avaliação da estrutura da cromatina espermática. Neste caso, a interpretação consistiu em quatro graus de dispersão da cromatina determinando que a motilidade espermática não alterou após as 48h de resfriamento, porém houve declínio na qualidade do DNA. Isto evidencia que o uso de grandes volumes de plasma seminal poderá influenciar no comprometimento da qualidade do DNA o que não pode ser diagnosticado com o decréscimo da motilidade espermática (LOVE, 2005).

O plasma seminal apresenta diferenças em sua composição que influencia na congelabilidade. Aurich *et al.* (1996) observaram que ao adicionar o plasma seminal de animais de alta congelabilidade, ao sêmen de garanhões de baixa congelabilidade houve melhoria na viabilidade espermática. No estudo conduzido por Love *et al.* (2002), o sêmen foi resfriado a  $-5^{\circ}\text{C}$  por 48h. O DNA dos garanhões subfêrteis apresentaram lesões entre 20 e 31h, enquanto nos garanhões férteis essas lesões ocorreram a partir das 24h. Os garanhões da nossa pesquisa apresentaram tolerância diferenciada ao resfriamento, o que pode ter comprometimento da qualidade do DNA nas 24 horas. Apesar disso, acreditamos que neste estudo os 50% de plasma seminal e pH de 7,45 da solução possam ter sido os responsáveis pelos danos ao funcionamento celular inicial (motilidade e funcionalidade de membrana). Este fato comprometeria o uso do sêmen destinado ao transporte por período superior à 12h.

## **CONCLUSÃO**

Espermatozoides equinos submetidos ao resfriamento com 50% de plasma seminal e pH 7,45 a  $5^{\circ}\text{C}$  por 24h mantém integridade do DNA, enquanto que a funcionalidade de membrana e a motilidade progressiva declinam com 12h.

## REFERENCES

**Aurich, J.E., Kühne, A., Hoppe, H., Aurich, C. 1996.** Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, p.791-797.

**Ball, B.A. 1998.** Evaluation and use of transported equine semen. *In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, Proceedings in Reproduction, Davis*, p.18-24.

**Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M., Magistrini, M. 2001.** Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.181-190.

**Goetz, R. 1949.** Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Hannover: *Sharper Verlag*.

**Jasko, D.J., Hathaway, J.A., Schaltenbrand, V.L., Simper, W.D., Squires, E.L. 1992.** Effect of semen plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252.

**Kenney, R.M., Khaleel, S.A. 1975.** Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.23, p.357-358.

**Klug, E., Sieme, H. 2003.** Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis. *Verlag M. & H. Alfeld, 5<sup>o</sup> völlig überarbeitete Auflage, Hannover*.

**Krzyzosiak, J., Evenson, D., Pitt, C., Jost, L., Molan, P., Vishwanath, R. 2000.** Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reproduction Fertility Development*, v.12, p. 251–261.

**Lagares, M.A., Meirelles, L.S., Wald, V.B., Gregory, R.M., Mattos, R.C. 2000.** Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.7, n.3, p.153-156.

**Love, C.C. 2005.** The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.39–45.



**Love, C.C., Thompsom, J.A., Lowry, V.K., Varner, D. 2002.** Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142.

**Province, C.A., Squires, E.L., Pickett, B.W., Amann, R.P. 1985.** Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.23, p.925-934.

**Pruit, J.A., Arns M.J., Pool, K.C. 1993.** Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold-storage (5°C). *Theriogenology*, v.39, p.291.

**Squires, E.L., Pickett, B.W., Graham, J.K., Vanderwall, D.K., Mccue, P.M., Bruemmer, J.E. 1999.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory (Bulletin 9)*, p.1-38,

**Troedsson, M.H.T., Desvousges, A.S, Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C.A., Hayna, J. 2005.** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.171-186.

**Varner, D.D., Blanchard, T.L., Meyers, P.J., Meyers, S.A. 1989.** Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, v.32, p.515-525.

## **6. CAPÍTULO 2**

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

Theriogenology

Murilo Farias Rodrigues, Janislene Mach Trentin, Gilson Antônio Pessoa,  
Adriana Pires Neves, Mara Iolanda Batistella Rubin

2013

**Seminal plasma: Effect on motility, membrane functionality, and spermatic chromatin dispersion of equine sperm treated with N-Acetyl-L-Cysteine at 5°C**

Plasma seminal: Efeito sobre a motilidade, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática e do sêmen equino a 5°C tratado com N-Acetil-L-Cisteína

*Rodrigues, MF<sup>1</sup>, Mach, JT<sup>1</sup>, Pessoa, GA<sup>1</sup>, Neves, AP<sup>2</sup>, Rubin, MIB<sup>3\*</sup>*

<sup>1</sup>*Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal:Equinos/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, Porto Alegre/RS.*

<sup>2</sup>*Prof. Associada da Universidade Federal do Pampa, Campus de Dom Pedrito, Dom Pedrito/RS* <sup>3</sup>*Prof. Titular, Embryolab, DCGA/CCR, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS*

*\*Corresponding author*

Correspondence Address:

Dr. Mara I B Rubin, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Prédio 97, Bloco 4, Sala 428. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. CEP 97105-900- Santa Maria/RS. Telefone: +55 55 32208501  
e-mail: mararubin90@yahoo.com.br

### Abstract

N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) is a low molecular weight thiol which has been studied in the horse semen preservation. However, there are only a few studies that demonstrate its effect on semen diluted with over 20% of seminal plasma. This is important to evaluate because the equine plasma is rich in sulfur proteins (with cysteine residues), named CRISPs (CHAMBONY et al. 1998), which may impair sperm viability. This study aims to evaluate the effect of different concentrations of NAC by evaluating motility, membrane functionality and sperm chromatin integrity of equine semen with 50% seminal plasma diluted 1:2 in Kenney extender at 5°C. Nine ejaculates from 9 stallions were divided into four shares and diluted in the skimmed milk non-supplemented group (0.0mM) or supplemented with NAC concentrations of 5.0, 2.5 and 0.5 mM. The evaluations were made at 0h (0.0mM), 24 and 48h of cooling, except for motility which was evaluated only up to 24h. The concentrations of 0.5 and 5.0 mM NAC had areas of the sperm chromatin dispersion similar to each other (59.7  $\mu\text{M}^2$  and 55.5  $\mu\text{M}^2$ , respectively) and between all groups. However, the area of chromatin dispersion between the non-supplemented group and the group supplemented with 2.5 mM NAC showed statistical differences, with the non-supplemented group being higher 65.3  $\mu\text{M}^2$ . The percentage of cells with plasma membrane function was similar between the supplemented and non-supplemented (0.0mM) group with 0.5 mM NAC (39.7 and 39.8%, respectively), but higher compared to concentrations of 2.5 mM (34,5%) and 5.0 mM (34.2%). Progressive motility among all groups supplemented with NAC were similar. The group with 0.5 mM NAC had 35.2% of motile cells while the non-supplemented group had 36.2%. Although in our study we used 50% seminal plasma, N-Acetyl-L-Cysteine did not affect the integrity of sperm chromatin. We conclude that concentrations of 2.5 and 5.0 mM NAC undertake motility and membrane functionality of equine semen diluted with 50% seminal plasma kept cooled to 5°C, but not compromise the integrity of DNA before 24h cooling.

**Key-words:** N-Acetyl-L-Cysteine, equine, semen, cooling.

## 1. Introdução

O alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e as baixas concentrações de enzimas antioxidantes no pequeno citoplasma do espermatozoide torna-o uma célula altamente susceptível às espécies reativas de oxigênio (EROs) (NICHII, 2009). O estresse oxidativo nos espermatozoides é um importante componente citopatológico causado pelo armazenamento, seja na forma líquida ou congelada do sêmen (BALL, 2008).

As espécies reativas de oxigênio são átomos na forma de radicais livres que apresentam elétrons desemparelhados em seu último nível da camada eletrônica, o que os torna capazes de sequestrar elétrons de moléculas presentes na célula. As EROs lesionam aos fosfolípidos da membrana plasmática causando alteração na capacidade seletiva e semipermeável da membrana, além de danos sobre a integridade do DNA. A adição de antioxidantes ao sêmen é uma alternativa para minimizar o estresse oxidativo durante o resfriamento de sêmen.

A N-Acetil-L-Cisteína (NAC) é um tiól de baixo peso molecular com ação antioxidante. Os tióis são utilizados em testes diagnósticos que permitem avaliar integridade da cromatina espermática (FERNANDEZ et al., 2003; CARRETERO et al., 2012) através da exposição do DNA espermático. A cromatina íntegra é mantida pelas ligações das protaminas ao DNA e os tióis são capazes de rompê-las (DAVID et al., 2005). A adição de antioxidantes sulfurados ao sêmen refrigerado pode comprometer a integridade da cromatina, uma vez que os espermatozoides ficam expostos ao frio por longos períodos.

Pesquisas conduzidas com sêmen nas espécies canina e suína com NAC apresentaram resultados favoráveis (MICHAEL et al., 2009; WHITAKER et al., 2012), enquanto que na humana (HUGHES, 1998) foram desfavoráveis, pois a NAC intensificou o aparecimento de lesões quando os espermatozoides foram expostos à irradiação por raios X. O mesmo não ocorreu com o ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol.

O plasma seminal equino é rico em proteínas que contém 16 resíduos de cisteína ligados a pontes de enxofre (GUO et al., 2005). Estas proteínas participam da capacitação espermática e da ligação do espermatozoide à superfície do oócito (DA ROS et al., 2004).

Atualmente, não se conhece o efeito do plasma seminal equino associado a antioxidantes compostos por cisteína sobre sobrevivência espermática após o resfriamento. Assim, o presente estudo avaliou o efeito da N-Acetil-L-Cisteína sobre o sêmen equino com 50% de plasma seminal, diluído a 1:2 e resfriado a 5°C através da motilidade progressiva, funcionalidade de membrana e dispersão da cromatina espermática.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Local e Animais*

Este estudo foi realizado no laboratório de embriologia animal da Universidade Federal de Santa Maria nos meses de Setembro a Dezembro de 2012. Nove garanhões pôneis mestiços da raça Brasileira com a faixa etária entre 9 a 13 anos serviram para execução do experimento.

### *2.2. Coletas*

Com vagina artificial modelo Hannover (GÖETZ, 1949) foram realizadas dezoito coletas de nove garanhões. Cada garanhão foi coletado duas vezes durante o experimento. Três animais/dia foram avaliados durante 3 dias da semana. As coletas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos por Klug & Sieme (2003).

### *2.3. Exame do sêmen*

As análises macroscópicas de cor, aspecto e volume do ejaculado foram efetuadas no máximo em 10 minutos após a coleta. O sêmen foi diluído na proporção 1:2, uma parte de sêmen para outra de diluente, resultando em 50% de plasma seminal. O diluente foi preparado com 2,4g de leite em pó

desnatado, 14,42 mM de bicarbonato de sódio e 272 mM de glicose (Kenney, 1975), sendo adicionada a N-Acetil-L-Cisteína (grupos suplementados com NAC) ou não (não-suplementado). Os grupos suplementados com o antioxidante NAC foram preparados conforme a diluição (1:2), resultando nas concentrações finais de 0,5; 2,5 e 5,0 mM.

#### 2.4. *Análises de motilidade e funcionalidade de membrana*

A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com VARNER (1989), em microscópio de contraste de fase (Olympus BX41- Japão) com aumento de 200X. O percentual de espermatozoides com movimento progressivo (MP) foi avaliado no momento inicial imediatamente após a diluição (0h) e após resfriamento a 5°C às 24 e 48h.

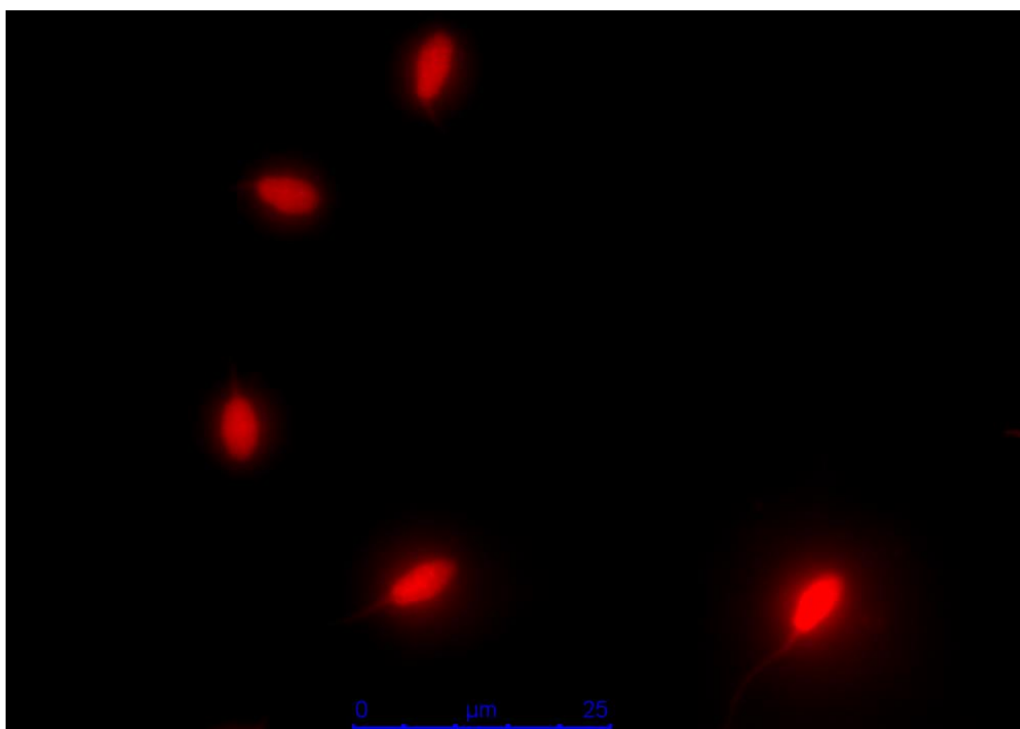
Na avaliação da funcionalidade de membrana espermática utilizou-se o protocolo descrito por Lagares *et al.* (1998), sob contraste de fase em aumento de 400X. A classificação das células espermática foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por NEILD (2000). Os produtos químicos, exceto onde citado provém da Sigma Aldrich.

#### 2.5. *Análise de fragmentação*

O armazenamento e o preparo das lâminas com ejaculado diluído, não refrigerado (0h) e refrigerado por 24 e 48h foram efetuados conforme recomendação do fabricante do Kit Halomax – Equus caballus (Halotech, Madri/Espanha). As amostras foram analisadas em microscópio invertido digital com fluorescência e 1000X, sob óleo de imersão (Leica DMI 4000 B, Alemanha). Um banco de 20 imagens foi armazenado de cada garanhão, de cada grupo suplementado com NAC (0,5; 2,5 e 5,0mM) ou não suplementado, bem como cada período de resfriamento para mensuração das áreas de fragmentação da cromatina espermática no software (ImageJ-1,46) (Figura 1). O software foi calibrado com uma régua graduada impressa nas imagens da câmera do microscópio.

## 2.6. Manutenção e Taxa de resfriamento do sêmen

As amostras de sêmen diluídas foram mantidas inicialmente à temperatura ambiente ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em tubos de 50mL (Corning) fechados, por 45 a 60 minutos. Na sequência, os tubos foram mantidos horizontalmente em geladeira regulada para  $5 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$  por 24 ou 48h. A velocidade de resfriamento em geladeira variou entre 0,6 a  $0,8^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ .

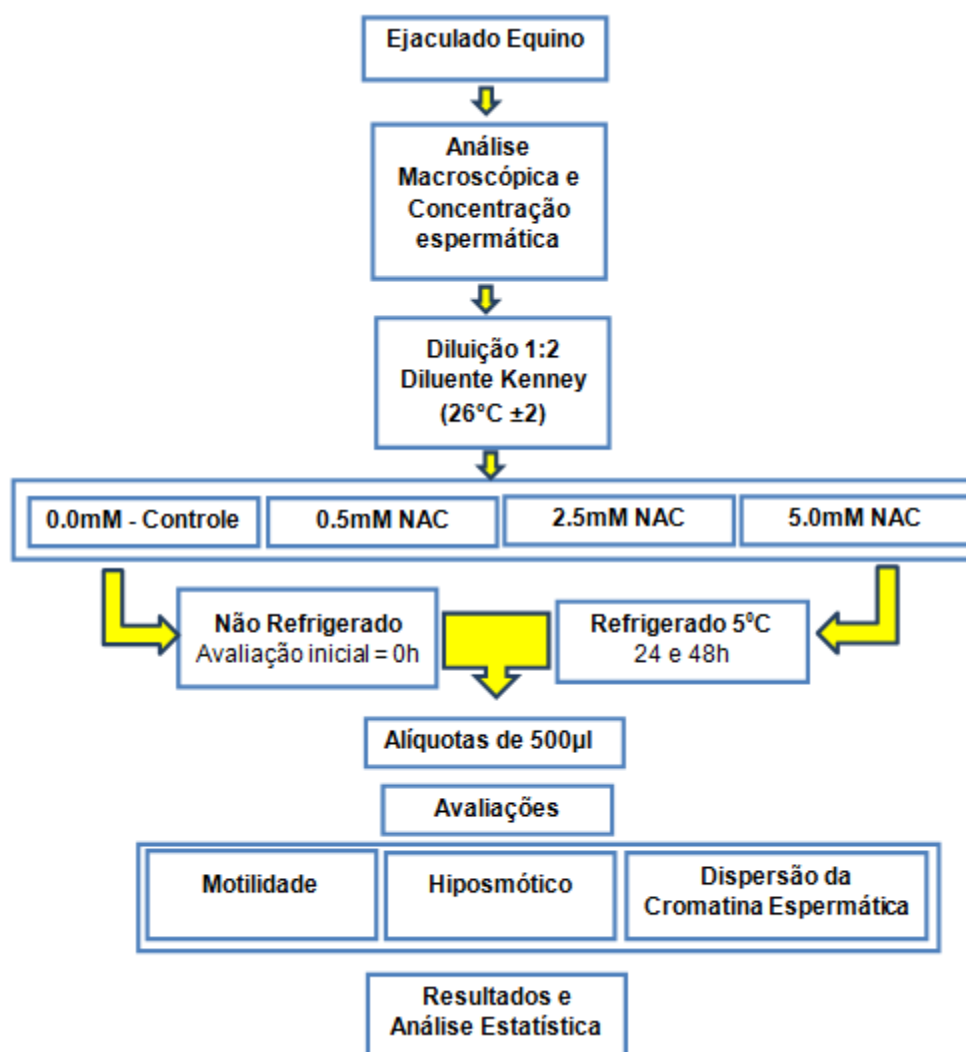


**Figura 1:** Teste de dispersão da cromatina espermática equina, corados com iodeto de propídeo (Kit Halomax® - *Equus caballus*. Madri/Espanha). Quanto maior o halo, maior dispersão da cromatina (Arquivo pessoal. MF Rodrigues, 2012).

## 2.7. Análise estatística

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para dos dados como medidas repetidas com uso de modelos mistos (procedimento MIXED) e inclusão dos efeitos de garanhão, concentração de NAC, período de resfriamento e interação entre os dois últimos fatores. Por não seguir uma distribuição normal, a motilidade progressiva foi analisada após transformação por raiz quadrada. A comparação das médias foi efetuada utilizando o teste Tukey-Kramer em nível de significância de 5%.





**Figura 2.** Delineamento experimental dos procedimentos efetuados com o ejaculado de nove pôneis mestiços da raça Brasileira.

### 3. Resultados

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da interação entre as concentrações de N-Acetil-L-Cisteína e os períodos de resfriamento em nenhuma das variáveis espermáticas avaliadas. O teste de dispersão da cromatina espermática revelou aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na área do halo de fragmentação entre 0 e 24h (Tabela 1), mas houve similaridade entre 24 e 48h de resfriamento. O teste hiposmótico revelou que o percentual de células funcionais diminuiu ( $P < 0,05$ ) a cada momento de avaliação.

**Tabela 1:** Área de dispersão da cromatina espermática, funcionalidade de membrana e motilidade progressiva de acordo com diferentes concentrações de N-Acetil-L-Cisteína (NAC) em sêmen equino resfriado a 5°C por diferentes períodos.

Períodos	Concentração de NAC				Média
	0,0 mM	0,5 mM	2,5 mM	5 mM	
<b>Dispersão da Cromatina Espermática (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>					
0	46,1 $\pm$ 10,1	47,6 $\pm$ 7,8	41,7 $\pm$ 5,8	42,8 $\pm$ 4,4	44,5 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>
24	76,1 $\pm$ 23,5	63,7 $\pm$ 16,6	59,2 $\pm$ 21,0	60,3 $\pm$ 16,6	64,8 $\pm$ 20,0 <sup>b</sup>
48	73,6 $\pm$ 14,2	67,8 $\pm$ 20,4	57,4 $\pm$ 10,5	63,4 $\pm$ 12,6	65,6 $\pm$ 15,4 <sup>b</sup>
Média	65,3 $\pm$ 21,3 <sup>a</sup>	59,7 $\pm$ 17,6 <sup>ab</sup>	52,8 $\pm$ 15,7 <sup>b</sup>	55,5 $\pm$ 15,0 <sup>ab</sup>	
<b>Funcionalidade de membrana (%) = Teste hiposmótico</b>					
0	55,9 $\pm$ 9,4	57,7 $\pm$ 9,4	53,2 $\pm$ 9,5	54,8 $\pm$ 10,0	55,4 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>
24	39,3 $\pm$ 8,5	36,3 $\pm$ 11,1	31,1 $\pm$ 8,9	28,3 $\pm$ 10,2	33,8 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>
48	23,9 $\pm$ 7,5	25,3 $\pm$ 8,6	19,2 $\pm$ 6,8	19,6 $\pm$ 7,3	22,0 $\pm$ 7,7 <sup>c</sup>
Média	39,7 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>	39,8 $\pm$ 16,6 <sup>a</sup>	34,5 $\pm$ 16,5 <sup>b</sup>	34,2 $\pm$ 17,8 <sup>b</sup>	
<b>Motilidade progressiva (%)</b>					
0	51,9 $\pm$ 7,1	51,1 $\pm$ 7,6	50,6 $\pm$ 7,7	50,5 $\pm$ 7,8	51,0 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>
24	20,5 $\pm$ 8,4	19,2 $\pm$ 8,7	17,4 $\pm$ 7,9	15,2 $\pm$ 5,8	18,1 $\pm$ 7,7 <sup>b</sup>
Média	36,2 $\pm$ 17,8	35,2 $\pm$ 18,3	34,0 $\pm$ 18,7	32,8 $\pm$ 19,3	

<sup>abc</sup> Letras diferentes nas colunas e linhas indicam diferença entre os períodos de avaliação e entre as concentrações de NAC, respectivamente (P<0,05).

A motilidade progressiva dos ejaculados foi menor (P<0,05) nas 24h em comparação ao momento zero. (Tabela 1). A motilidade progressiva média foi de 4% nas 48h, mas não foi analisada pelo fato do grande número de amostras com valor zero.

As concentrações de 0,5 e 5,0mM de NAC revelaram área de dispersão da cromatina espermática similar (Tabela 1). Entretanto, a área de dispersão da cromatina do sêmen não suplementado foi maior que o

suplementado com 2,5 mM de NAC. O percentual de células com membrana plasmática funcional foi similar entre o grupo não suplementado e o grupo com 0,5mM de N-Acetil-L-Cisteína (Tabela 1), porém ambos foram superiores ( $P < 0,05$ ) a NAC 2,5mM e 5,0mM. A motilidade progressiva não foi prejudicada ( $P > 0,05$ ) pela concentração de N-Acetil-L-Cisteína (Tabela 1).

#### 4. Discussão

O resfriamento de sêmen gera aumento na formação das espécies reativas de oxigênio, as quais também são responsáveis por comprometer a viabilidade espermática, justificando o uso de moléculas antioxidantes no sêmen criopreservado. A N-Acetil-L-Cisteína possui caráter antioxidante e é capaz de conferir a proteção celular contra as espécies reativas de oxigênio.

Em nossa pesquisa, os ejaculados com 2,5mM N-Acetil-L-Cisteína apresentaram menor área de dispersão da cromatina espermática comparado ao sêmen não tratado com NAC (Figura 1). David *et al.* (2005) relataram que os tióis de baixo peso molecular são capazes de romper as ligações existentes entre as protaminas e o DNA. Contudo, em nosso estudo, apesar de as células terem sido expostas a N-Acetil-L-Cisteína pelo período de 48h, as concentrações utilizadas não desestruturaram a cromatina espermática. Nos testes para avaliação da integridade da cromatina espermática são utilizadas altas concentrações de tióis (FERNANDÉZ, et al., 2003; FERNANDÉZ, et al., 2005) sendo até 100 vezes superiores à presente pesquisa.

No teste hiposmótico observamos que 2,5 e 5,0mM de N-Acetil-L-Cisteína comprometeram a funcionalidade de membrana, quando comparada a NAC 0,5mM e ao grupo não suplementado (0,0mM). Entretanto, Reghini et al. (2012) observaram similaridade entre 1 a 20mM de N-Acetil-cisteína utilizando os testes de CASA, motilidade progressiva e integridade de membrana detectada com carboxifluorocéina e iodeto de propídio. O percentual de plasma seminal em nosso estudo foi de 50% e o sêmen foi diluído na proporção de 1:2. Já Reghini et al. (2012) centrifugaram, removeram o sobrenadante e

ressuspenderam o sêmen em diluente com leite desnatado e diferentes concentrações de N-Acetil-Cisteína.

Sabe-se que percentuais de plasma seminal superiores a 20% diminuem a viabilidade do sêmen equino mantido resfriado a 5°C (KATILA et al., 1997). No entanto, no nosso estudo, a diluição foi igual para todos os grupos. Adicionalmente, ao teste hiposmótico, observamos que as concentrações de 2,5 e 5,0mM de N-Acetil-L-Cisteína comprometeram a funcionalidade da membrana espermática. A associação plasma seminal com 2,5 e 5,0mM N-Acetil-L-Cisteína poderá ter comprometido a funcionalidade de membrana, pois com a remoção do plasma e uso do antioxidante parece não causar danos à integridade da membrana plasmática (REGHINI et al., 2012). O plasma seminal é rico em proteínas contendo o aminoácido cisteína, as denominadas CRISPs (SCHAMBONY et al., 1998). Estas proteínas desempenham diferentes funções, como a participação da fusão espermática com a superfície do oócito e a ligação à superfície espermática durante o transito epididimal, além de participar da capacitação espermática (DA ROS et al., 2004).

## **5. Conclusão**

As concentrações de 2,5 e 5,0mM de N-Acetil-L-Cisteína comprometem a motilidade e a funcionalidade de membrana do sêmen equino diluídos com 50% de plasma seminal mantidos a 5°C, sem alterar a integridade do DNA durante o resfriamento.

## **6. Referências bibliográficas**

Ball BA Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 2008; 107: 257-67.

Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon IC, Sirard MA. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 2001; 56:275–86.

Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa C C, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science* 2012; 131: 63-71.

Da Ros VG, Munuce MJ, Cohen DJ, Marin-Briggiler CI, Busso D, Visconti PE, Cuasnicu PS. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 1325–32.

David NR, Lehninger AL, Cox M. *Lehninger principles of biochemistry*- New York 2005: 148.

Fernández J L, Muriel L, Rivero Mt, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez J G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology* 2003; 1:24.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility* 2004; 84: n.4.

Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-like fold. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 12405–12.

Hughes CM, Lewis SEM, Mckelvey-Martin, VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Human Reproduction* 1998; 13: n.5, 1240–47.

Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VI, Simper WD, Squires EL. Effect of semen plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 37: 1241-52.

Katila T. Procedures for Handling Fresh Stallion Semen. *Theriogenology* 1997; 48: 1217-27.

Kenney RM, Khaleel SA. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. **Journal of Reproduction and Fertility** 1975; 23:357-358.

Klug E, Sieme H. Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis. Verlag M. & H. Alfeld, 5<sup>o</sup> 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 Ciência Veterinária* 2000; 7: n.3, 153-56.

Love CC. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science* 2005; 89: 39–45.

Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscoc 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 Animals* 2010; 45: n.2, 201-07.

Nichi M. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas e epididimárias de touros. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo 2009; São Paulo. Disponível online: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-18012010-095928>>  
*Acessado em 15 de fevereiro de 2013.*

Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Agüerro A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000; 32: 351–55.

Pgal R, Aurich C, Kankofer M. Anti-oxidative Status and Semen Quality during Cooled Storage in Stallions. *Journal of Veterinary Medicine* 2006; 53: 486–89.

Reghini MFS, Uliani RC, Monteiro GA, Dell’acqua Junior J, Papa FO, Alvarenga, MA. Utilização da N-acetilcisteína na conservação do sêmen eqüino a 5°C e 15°C. I SIMPÓSIO ABRAVEQ SUL 2011; Artigos técnicos, Gramado - RS.

Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, T’Opfer-Petersen EA. Equine crisp-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1387: 206–16.

Urrego R, Rios A, Ángel MO, Camargo O. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias* 2008; 21: n.1 19-26.

Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, Meyers SA. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* 1989; 32: 515-25.

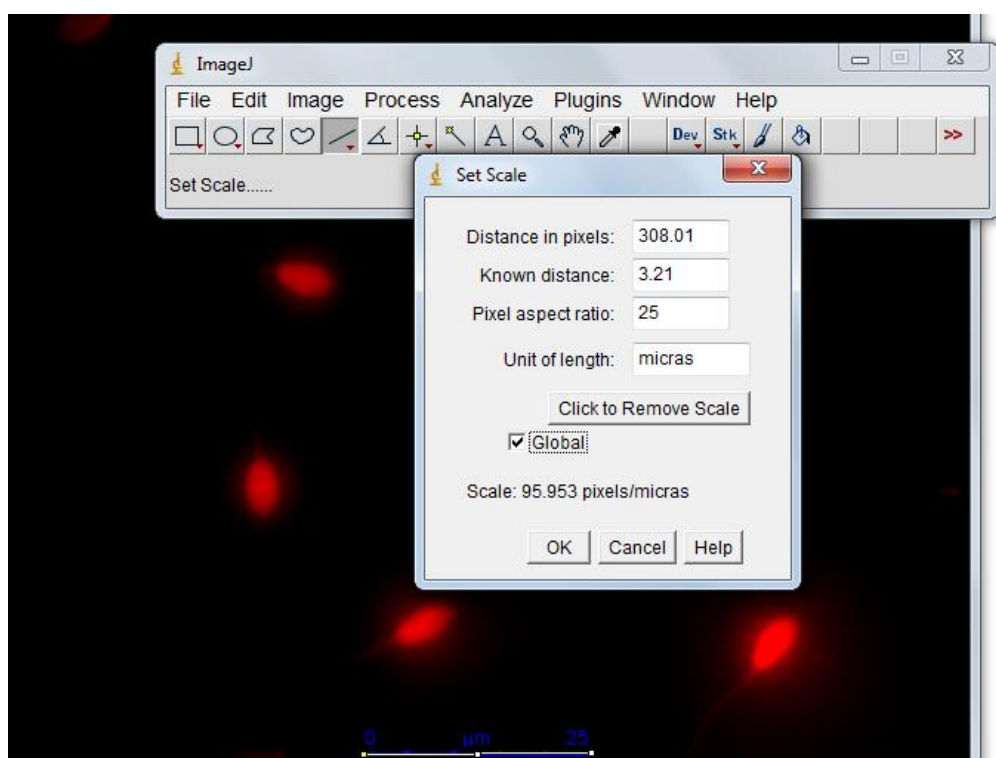
Whitaker BD, Casey SJ, Taupier R. N-acetyl-l-cysteine supplementation improves boar spermatozoa characteristics and subsequent fertilization and embryonic development. *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47: n.2, 263-68.

## 7. CONCLUSÕES

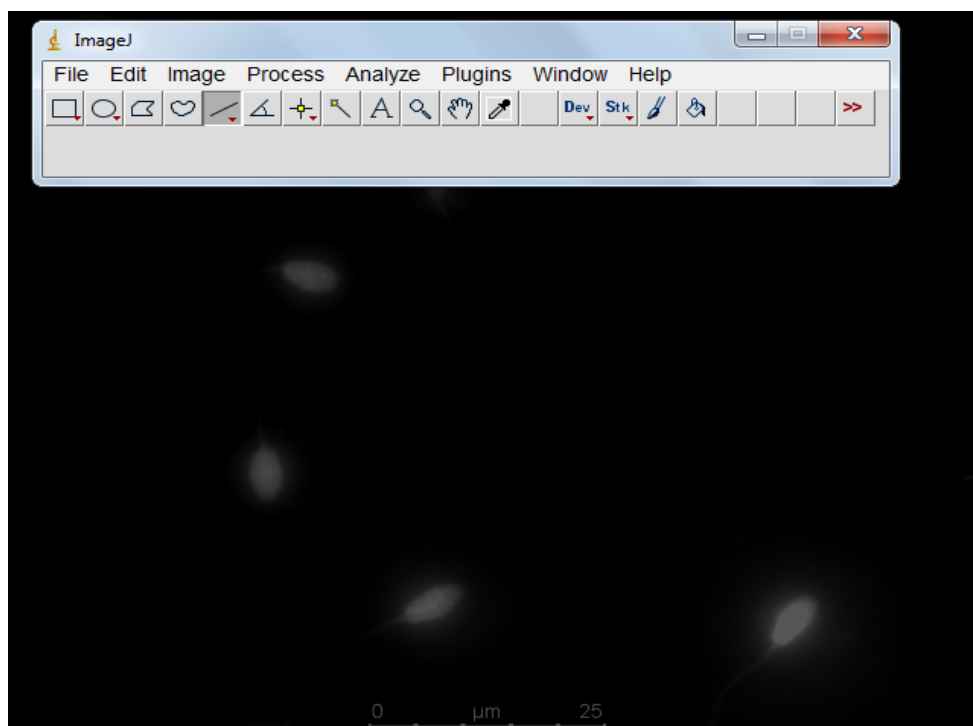
Conclui-se que os maiores danos ao DNA espermático no sêmen equino mantido refrigerado a 5°C ocorrem nas primeiras 24h mantendo-se estáveis até 48h, não havendo a necessidade de avaliação nos intervalos de 12 e 36h. A suplementação com NAC em concentrações >0,5mM intensifica os danos tanto ao DNA espermático quanto a motilidade e funcionalidade de membrana do sêmen equino mantido refrigerado a 5°C. Além disso, esta pesquisa indica que concentrações ≤0,5mM de NAC na suplementação do sêmen equino poderão diminuir os danos causados ao DNA espermático do sêmen equino a 5°C.



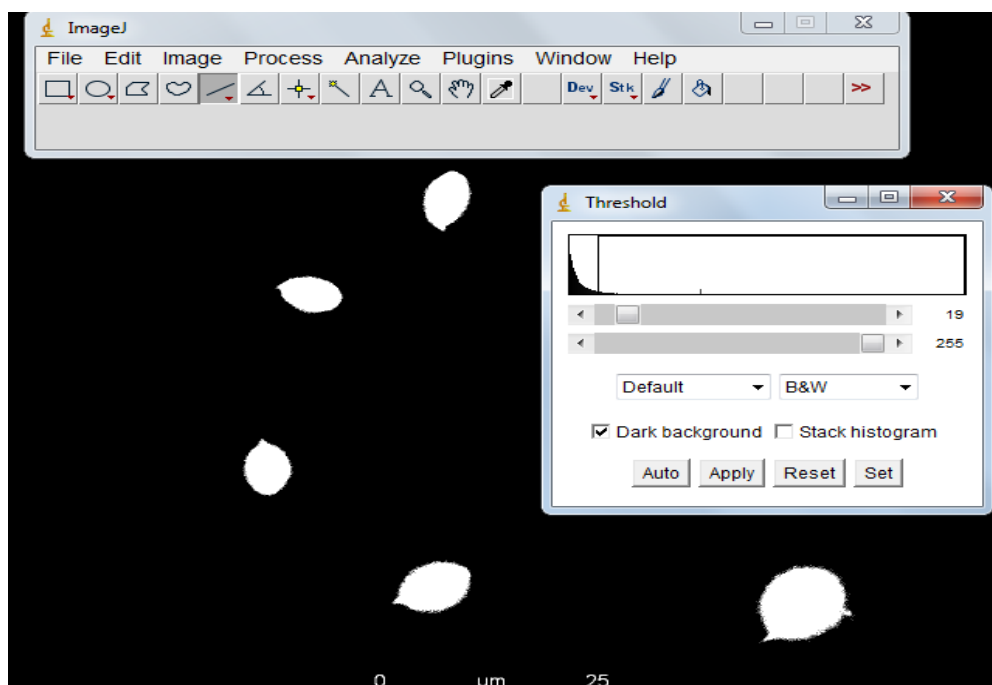
## 8. ANEXOS



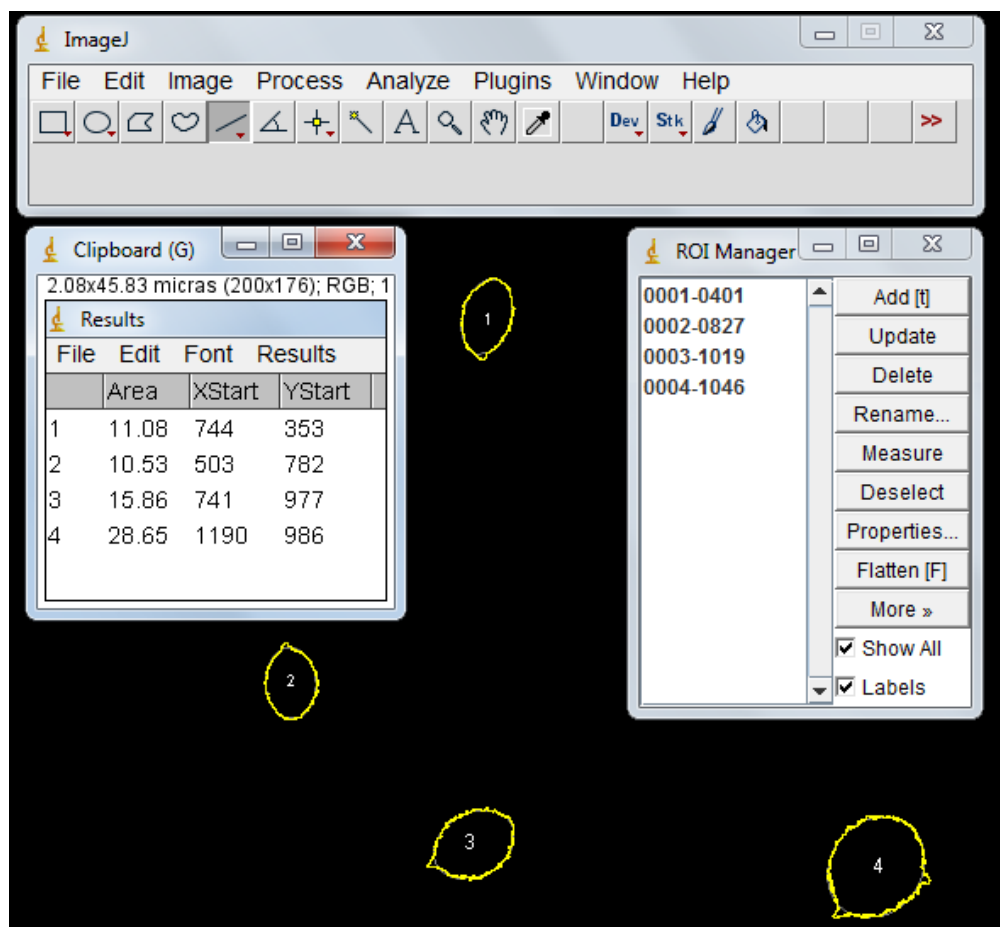
**Figura 5A:** Sequência de imagens software ImageJ 1.46® - Calibração do software com uma régua digital graduada da câmera do microscópio de Fluorescência Leica® DMI 4000B.



**Figura 5B:** Sequência de imagens software ImageJ 1.46®. Transformação da imagem dos espermatozoides para 8 bits.



**Figura 5C:** Sequência de imagens software ImageJ 1.46®. Ajuste das bordas dos halos de fragmentação em célula espermática equina.



**Figura 5D:** Sequência de imagens software. Mensurações dos halos de fragmentação célula a célula de espermatozoides equinos fixados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRABI, S.M.H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.24, n.12, p.561-569, 2007.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S. What andrologist an urologist should know about free radicals and why. **Urology**, v.67, p.2–8, 2006.

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.108, p.2017–2025, 1995.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y Chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497-506, 2001.

ALGHAMDI, A.S.; TROEDSSON, M.H.; XUE, J.L.; CRABO, B.G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal Veterinary Research**, v.63, p.880-885, 2002.

ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M. The use of alternatives cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of workshop on transporting gametas and embryos, 2ªEd., 5 de Outubro, 2003.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology of Reproduction**, v.29, p.548–555, 1983.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal funcion. In. MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Fabiger, p.715-745, 1993.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.

AURICH, J. Artificial insemination in horses – More than a century of practice and research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, I.8, p.458-463, 2012.

BALL, B.A. Evaluation and use of transported equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, **Proceedings in Reproduction**, Davis, p.18-24, 1998.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577–589, 2001.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impactos on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.257-267, 2008.

BAKER, G.H.W.; BRINDLE, J.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**, v.65, p.411-419, 1996.

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.

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

BECONI M.T.; FRANZIA, C.R.; MORA, N.G. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841-851, 1993.

BILODEAU J.F. ; BLANCHETTE, S. ; GAGNON, I.C. ; SIRARD, M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275–286, 2001.

BLUMER, C.G.; FARINELLO, R.M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D.M.; BERTOLLA, R.P.; CEDENHO, A.P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v.90, n.5, p.1716-1722, 2007.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In: Blanchard, T.L.; Varner, D.D. Stallion management. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, v.8, p.1641-1655, 2000.

CARRETERO, M.I.; LOMBARDO, D.; ARRAZTOA, C. C.; GIULIANO, S.M.; GAMBAROTTA, M.C.; NEILD, D.M. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. **Animal Reproduction Science**, v.131, p. 63-71, 2012

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; CRESPO, F.; SERRES-DALMAU, C.; GUTIÉRREZ DE LAS ROZAS, A.L.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GÓNSALVEZ, J. Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.823–828, 2009.

DA ROS, V.G.; MUNUCE, M.J.; COHEN, D.J.; MARIN-BRIGGILER, C.I.; BUSO, D.; VISCONTI, P.E.; CUASNICU, P.S. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1325–1332, 2004.

DAVID, N.R.; LEHNINGER, A.L.; COX, M. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman, p. 148, 2005.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.72, p.484–495, 1999.

FERNÁNDEZ, J. L.; MURIEL, L.; RIVERO, M.T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; Alvarez, J. G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. **Journal of Andrology**, v.24, n.1, 2003.

FERNÁNDEZ, J.L.; MURIEL, L.; GOYANES, V.; SEGRELLES, E.; GOSÁLVEZ, J.; ENCISO, M.; LAFROMBOISE, M.; DE JONGE, C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**, v.84, n.4, 2005.

FORMAN HJ, FUKUTO JM, TORRES M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **American Journal Physiology Cell**, v.2 p.246-56, 2004.

FRASER, L.& STRZEZEK, J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. **Folia Histochemica Cytobiologica**, v.42, n. 1, p.49-55, 2004.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MONTEIRO, G.A.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O. The Effects of Refrigeration Temperature and Storage Time on Apoptotic Markers in Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.27-30, 2013.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v.10, p.1109 –1122, 1995.

GÖETZ, R. Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Hannover: **Sharper Verlag**, 1949.

GARCÍA, B.M.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L., FERRUSOLA, C.O.; RODRÍGUEZ, A.M.; GALLARDO BOLAÑOS, J.M.; RODRÍGUEZ, H.M.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.811–818, 2011.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J.M.; PEÑA, F.J.; MACÍAS-GARCÍA, B. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. **Theriogenology**, v.78, n.2, p.415-422, 2012. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.021.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **The Veterinary Clinics of North American** v.12, p.131-147, 1996.

GUO, M.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-like fold. **Journal of Biology Chemichal**. v.280, p.12405–12412, 2005.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; 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.

HUGHES, J.P.; LOY, R.G. Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares from six stallions. **Cornell Veterinary**, v.60, p.463-475, 1970.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of semen plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K; SQUIRES, .EL.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p. 601-614, 1992.

KATILA, T. Procedures for Handling Fresh Stallion Semen. **Theriogenology**, v.48, p.1217-1227, 1997.

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

KELLER, A. MALSCHITZSKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M.J.;MATTOS, R.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal,

extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 318-319, 2001.

KENNEY, R.M.; KHALEEL, S.A. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.357-358, 1975.

KESSEOPOULOU, E.; POWERS, H.J.; SHARMA, K.K. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. **Fertility and Sterility**, v.64, p.825–831, 1995.

KLUG, E.; SIEME, H. Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis. 5<sup>o</sup> **völlig überarbeitete Auflage**, Hannover, 2003.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation,during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction Fertility and Development**. 12, 251–261,2000.

LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.3, p.153-156, 2000.

LI, T.K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**,v.12, p.641– 646, 1975.

LOMEO, A.M.; GIAMBERSIO, A.M. Water test: A sample methods to asses sperm membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v.14, p.278-282, 1991.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39–45, 2005.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v.57, p.1135-1142, 2002.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L.; Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MAGISTRINI, M.; COUTY, I.; PALMER, E. Factors influencing stallion sperm survival. **12th Int. Congress of Animal Reproduction**, v.4, p.1888-1890, 1992.



MEIRELES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A.P.; VIEIRA, M. J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para a preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, v. 28, n.3, p.467-470, 1998.

MATTOS, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Veterinária, UFRGS, 1995.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. **Editora Sulina**, Porto Alegre. E.6, v.2, p.750, 1987.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n. 2, p.201-207, 2010.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas e epididimárias de touros**. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, fl.129, 2009.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M.H.; GONZALEZ, E.; AGÜERRO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v.32, p.351–355, 2000.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUIERO, A. HYPOOSMOTIC TEST IN EQUINE SPERMATOZOA. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

PGAL, 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.

PEÑA, A.I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H.R. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.85–98, 2003.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL G.E JR.; BEMDTSON, W.E, VOSS, J.L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**, v.43, p.617-625, 1976.

PICKETT B.W., AMANN R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.289-302, 1987.

PICKETT, B.W. Sexual behavior. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Ed.) **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger, p.809-820, 1993.

POMMER, A.; MEYERS, S. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.351–355, 2002.

PROVINCE, C.A.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v.22, p.409-415, 1984.

PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.

REGHINI, M.F.S.; ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A.; DELL'AQUA JUNIOR, J.; FREDERICO OZANAM PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Utilização da N-acetilcisteína na conservação do sêmen eqüino a 5°C e 15°C. I **SIMPÓSIO ABRAVEQ SUL**, Artigos técnicos. Gramado - RS, 2011.

SCHAMBONY, A., GENTZEL, M., WOLFES, H., RAIDA, M., NEUMANN, U., TÖPFER-PETERSEN, E., 1998A. Equine crisp-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1387, p.206–216, 1998.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory (Bulletin 9)**, p.1-38, 1999.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203–213, 1997.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-186, 2005.

URREGO, R.; RIOS, A.; ÁNGEL, M.O.; CAMARGO, O. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, v.21, n.1, p.19-26, 2008.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, p.515-525, 1989.

WHITAKER, B.D.; CASEY, S.J; 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.