



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

**Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à
centrifugação com coloide**

Fernanda Carlini Cunha dos Santos

Porto Alegre

2017

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

**Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à
centrifugação com coloide**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Sob orientação do Professor Doutor Eduardo Malschitzky.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Fernanda Carlini Cunha
Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido
à centrifugação com coloide / Fernanda Carlini Cunha
Santos. -- 2017.

98 f.

Orientador: Eduardo Malschitzky.

Coorientadora: Bruna da Rosa Curcio.

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

1. criopreservação. 2. cushion. 3. espermatozoide.
4. espermático. 5. single layer centrifugation. I.
Malschitzky, Eduardo, orient. II. Curcio, Bruna da
Rosa, coorient. III. Título.

Fernanda Carlini Cunha dos Santos

**Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à
centrifugação com coloide**

Aprovado por:

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador e presidente da comissão

Profa. Dra. Bruna da Rosa Curcio

Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Membro da comissão

Prof. Dr. Néelson Alexandre Kretzmann Filho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro da comissão

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Osni Tadeu dos Santos e Maria do Carmo Cunha dos Santos, pela educação, carinho, amor, apoio, os ensinamentos de vida e estímulo para realização dos meus sonhos, amo vocês.

Às minhas avós, Cecília Ana Carlini (*in memoriam*) e Seny Loureiro dos Santos (*in memoriam*), por terem fé em mim e por todas suas orações.

À todos os meus e familiares amigos, por estarem sempre ao meu lado, seja nas horas de alegria e comemoração, seja para oferecer um ombro para chorar. Agradeço pelo companheirismo, parceria e festas que fazem a vida valer a pena, e sobretudo pelas experiências vividas juntas.

À Universidade Federal de Santa Maria, à Universidade Federal de Pelotas, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, todos os professores e colegas pela oportunidade de aprendizado e construção da minha vida profissional e muitas vezes pessoal.

Ao meu orientador, Eduardo Malschitzky, pela confiança, dedicação e apoio ao longo do desenvolvimento do experimento.

À equipe da Cabanha do Parque, que faça chuva ou faça sol, está sempre disposta.

À equipe da Minitube do Brasil pelo fornecimento de materiais e força de trabalho.

Agradeço a todos, que ao longo da minha existência acreditaram em mim e colaboraram de alguma maneira para que eu atingisse meus objetivos.

“Ninguém é tão velho que não possa aprender e
nem tão novo que não possa ensinar”

Esopo

RESUMO

Sêmen da cauda do epidídimo de garanhões submetido à centrifugação com coloide

Tese de Doutorado

Autora: Fernanda Carlini Cunha dos Santos

Orientação: Eduardo Malschitzky

A coleta de sêmen da cauda do epidídimo é a última oportunidade de obter espermatozoides de garanhões valiosos, sendo que durante a criopreservação, a etapa de centrifugação é considerada um ponto crítico. A principal hipótese é que a centrifugação com coloides pode melhorar a qualidade dos espermatozoides coletados da cauda do epidídimo de garanhões. Para avaliação da hipótese foram realizados dois experimentos. O experimento um teve por objetivo avaliar o efeito da centrifugação com cushion e com coloide em camada única (SLC) na motilidade de sêmen do epidídimo de garanhões após a etapa de centrifugação. O experimento dois teve o objetivo de determinar o efeito da SLC prévio ao congelamento e após o descongelamento. Experimento 1) Oito garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral e o sêmen foi coletado da cauda dos epidídimos (n=16). Após a coleta, as amostras foram submetidas a três protocolos de centrifugação: Convencional (20 minutos a 600xg), cushioned (20 minutos a 900xg) e SLC (20 minutos a 300xg). Os pellets foram ressuspensos e as amostras foram submetidas à avaliação laboratorial de motilidade e morfologia espermática. Experimento 2) Dez garanhões foram submetidos a orquiectomia bilateral e o sêmen foi coletado da cauda dos epidídimos (n=20). Para criopreservação, as amostras foram submetidas a: centrifugação convencional (20 minutos a 600xg), SLC prévio a criopreservação (SLC-Pre) (20 minutos a 300xg) e SLC após a criopreservação (SLC+) (20 minutos a 600xg seguidos de uma segunda centrifugação descrita após descongelamento). Os pellets foram ressuspensos em diluente de congelamento, submetidos ao processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento. Os grupos de

centrifugação convencional e SLC-Pre foram avaliados imediatamente após descongelamento. O grupo SLC+ foi descongelado e submetido à SLC (20 minutos a 300xg) e ressuspendido em diluente de congelamento (SLC+F) ou resfriamento (SLC+C). A motilidade total e a motilidade progressiva das amostras foram avaliadas com análise computadorizada do movimento espermático. A morfologia foi avaliada com auxílio de microscópio com contraste de fase. Funcionalidade de mitocôndria, integridade de membrana e DNA foram avaliados com auxílio de microscópio de fluorescência. Os dados foram analisados por estatística descritiva, simple one-way ANOVA e Teste de Tukey. Experimento 1) a motilidade de espermatozoide submetidos à SLC ($p < 0,05$) e cushion ($p > 0,05$) foi superior do que os submetidos a centrifugação convencional. Experimento 2) SLC-Pre e SLC+F apresentaram maior motilidade total, enquanto SLC+F apresentou maior motilidade progressiva. O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi maior em SLC-Pre e SLC+F. A funcionalidade de mitocôndria foi maior em todos grupos com SLC, enquanto a integridade de membrana foi maior em SLC-Pre. A centrifugação com coloides melhorou a qualidade de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo de garanhões, tanto no momento prévio ao congelamento como após o descongelamento.

Palavras-chave: criopreservação, cushion, espermatozoide, espermático, single layer centrifugation

ABSTRACT

Epididymal stallion semen submitted to centrifugation with colloid

Thesis

Author: Fernanda Carlini Cunha dos Santos

Adviser: Eduardo Malschitzky

Epididymis cauda sperm recovery and cryopreservation are last opportunity to obtain spermatozoa from a valuable animal, even though during cryopreservation centrifugation step is considered as a critical point. It is hypothesized that colloidal centrifugation could enhance epididymal stallion sperm parameters. To evaluate this hypothesis two experiments were performed. In experiment one, the objective was to evaluate the effect of cushioned and Single Layer Centrifugation (SLC) on epididymal stallion sperm motility postcentrifugation. In experiment two, the objective was to determine the effect of SLC on epididymal stallion sperm quality pre-freezing and post-thawing. Experiment 1) Eight stallions were submitted to bilateral orchiectomy and the resulting epididymal cauda (n = 16) were flushed with semen extender. After harvesting, samples were submitted to three centrifugation protocols: conventional (20 minutes at 600xg), cushioned (20 minutes at 900xg), and SLC (20 minutes at 300xg). Pellets were resuspended, motility and morphology were evaluated. Experiment 2) Ten stallions were submitted to bilateral orchiectomy and epididymal cauda (n=20) were harvested. For cryopreservation, epididymal sperm were submitted to: conventional centrifugation (20 minutes at 600xg), Single Layer Centrifugation prior cryopreservation (SLC-Pre) (20 minutes at 300xg) and Single Layer Centrifugation after cryopreservation (SLC+) (20 minutes at 600xg followed by a second centrifugation described after thawing). Pellets were resuspended in freezing extender, submitted to cryopreservation process in liquid nitrogen and thawed. Conventional and SLC-Pre were evaluated immediately after thawing. SLC+ samples were thawed, submitted to SLC (20 minutes at 300xg) and the pellets were resuspended with freezing (SLC+F) and cooling extender (SLC+C). Total motility (TM) and progressive

motility (PM) were evaluated with computer-assisted semen analyses. Sperm morphology was evaluated under a phase-contrast microscope. Mitochondrial functionality, membrane and DNA integrity were evaluated with an epifluorescence microscope. Data was evaluated by descriptive statistics, simple one-way ANOVA and comparison between means by Tukey test. Significance was assigned to all values $p < 0.05$. Experiment 1) Motility of spermatozoa recovered by SLC ($p < 0.05$) and cushioned centrifugation ($p > 0.05$) were higher than those recovered by conventional centrifugation. Experiment 2) SLC-Pre and SLC+F yielded the highest TM, while SLC+F yielded the highest PM. Higher morphological normal sperm was observed in SLC-Pre and SLC+F. Mitochondrial functionality was significantly higher in all treatments with SLC, while membrane integrity was higher in SLC-Pre. Colloidal centrifugation improved epididymal sperm quality before freezing and after thawing.

Key-words: cushion, cryopreservation, single layer centrifugation, sperm, spermatozoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anatomia do epidídimo do garanhão.....	19
Figura 2	Técnica de fluxo retrógado - Cauda do epidídimo prévio (A) e após remoção do tecido conjuntivo (B).....	22
Figura 3	Técnica de fluxo retrógado - Dissecação da cauda do epidídimo pela maior extensão possível.....	23
Figura 4	Técnica de fluxo retrógado - Lavagem por fluxo retrógado da cauda do epidídimo com diluente de sêmen.....	23
Figura 5	Sêmen equino sobre uma camada de Cushion previamente a centrifugação (A) e pellet (seta vermelha) após centrifugação (B).....	30
Figura 6	Sêmen equino depositado sobre coloide em camada única, previamente a centrifugação (A) e pellet (seta vermelha) após centrifugação (B).....	31
Figure 7	Schematic presentation of the processing of stallion epididymal sperm with conventional, cushioned, and single layer centrifugation..	51
Figure 8	Total motility and PM of epididymal stallion sperm after conventional, cushioned, and SLC.....	53
Figure 9	Schematic presentation of the processing of stallion epididymal sperm with Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	62
Figure 10	Total motility (TM) of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	64

Figure 11	Progressive motility (PM) of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	65
Figure 12	Mitochondrial functionality of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	66
Figure 13	Plasma membrane integrity of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	67
Figure 14	DNA integrity of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	trifosfato de adenosina
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
FIT	isotiocianato de fluoresceína
IP	iodeto de propídio
MESA	<i>microsurgical epididymal sperm aspiration</i>
PESA	<i>percutaneous epididymal sperm aspiration</i>
PNA	aglutinina do <i>Arachis hypogaea</i>
PSA	aglutinina do <i>Pisum sativum</i>
SLC	<i>Single Layer Centrifugation</i>
Sptz	espermatozoide

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Revisão de literatura.....	15
2.1	Espermatozoide.....	15
2.2	Espermatogênese.....	17
2.3	Epidídimo e maturação espermática.....	18
2.4	Coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo.....	20
2.5	Qualidade espermática em função do tempo de armazenamento do epidídimo.....	23
2.6	Princípios da criopreservação de espermatozoides.....	25
2.7	Fertilidade do sêmen da cauda do epidídimo.....	27
2.8	Centrifugação com cushion.....	29
2.9	Centrifugação com coloide em camada única (SLC).....	30
2.10	Técnicas de avaliação espermática.....	33
2.10.1	Motilidade espermática.....	33
2.10.2	Concentração espermática.....	35
2.10.3	Morfologia espermática.....	36
2.11	Técnicas de avaliação espermática com sondas fluorescentes.....	39
2.11.1	Integridade de membrana plasmática.....	41
2.11.2	Integridade de mitocôndria.....	43
2.11.3	Integridade de DNA.....	44
2.11.4	Integridade de acrossoma.....	45
3	Artigo 01 – Cushioned and Single Layer Centrifugation improve epididymal stallion sperm motility postcentrifugation.....	47
4	Artigo 02 – Pre-freezing and post-thawed epididymal stallion spermatozoa quality can be improved with Single Layer Centrifugation.....	57
5	Considerações finais.....	73
6	Referências bibliográficas.....	74
7	Anexo.....	96

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução em equídeos são importantes ferramentas para aumento na eficiência reprodutiva e melhoramento genético. Dentre estas biotecnologias, o congelamento de sêmen da cauda do epidídimo visa a recuperação de células espermáticas provenientes de garanhões com elevado valor genético que vieram a óbito, foram submetidos a orquiectomia, possuem alterações reprodutivas que impossibilitem a coleta do ejaculado ou para preservação de gametas de espécies em extinção, como a zebra de Quaga (*Equus quagga*) e o cavalo de Prezwalski (*Equus ferus przewalskii*). Pesquisas a respeito desta técnica já foram realizadas em diversas espécies, incluindo caninos (MARTINS *et al.*, 2006), felinos (TEBET *et al.*, 2006), caprinos (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2006), camundongos (SANKAI *et al.*, 2001), bovinos (Martins *et al.*, 2007), suínos (KOLBE e HOLTZ, 1999) e equinos (BRUEMMER *et al.*, 2002; NEILD *et al.*, 2006).

O congelamento de sêmen da cauda do epidídimo pode ser a última e única oportunidade para armazenamento e preservação de espermatozoides de garanhões. A qualidade espermática após descongelamento varia conforme múltiplos fatores, dentre estes o tempo transcorrido entre coleta do epidídimo e coleta dos espermatozoides, forma de extração, estado de conservação do epidídimo, além de características individuais dos garanhões.

A fertilidade de sêmen obtido a partir da cauda do epidídimo de garanhões já foi comprovada (BARKER e GANDIER, 1957), no entanto um dos principais pontos críticos é a qualidade espermática após o procedimento de criopreservação e descongelamento.

A principal hipótese é que o uso de coloides durante a centrifugação pode ser uma alternativa viável para obtenção de maior número de espermatozoides íntegros pré-congelamento e também melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento.

Considerando esta hipótese, a centrifugação com coloide poderia ser realizada em duas situações: 1) considerando o profissional que irá realizar a coleta de sêmen da cauda do epidídimo – neste caso a SLC poderia ser feita imediatamente após a coleta de sêmen (prévio ao congelamento); 2) considerando o profissional que irá realizar o descongelamento das palhetas –

neste caso se o sêmen descongelado apresenta-se baixa qualidade espermática ainda teria a possibilidade de realização de SLC (após descongelamento). Em ambas situações o objetivo seria a obtenção de maior número de espermatozoides com melhor qualidade espermática, podendo este resultado ser obtido tanto prévio como pós criopreservação.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da centrifugação com cushion e SLC no momento pré e pós criopreservação de sêmen de garanhões proveniente da cauda do epidídimo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPERMATOZOIDE

Os espermatozoides são células reprodutivas masculinas com característica estrutural especializada em uma única atividade funcional, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozoide para o citoplasma do oócito, ocorrendo a união dos pronúcleos masculino e feminino no interior da tuba uterina, produzindo o zigoto (EDDY e O'BRIEN, 1994).

O espermatozoide é composto por cabeça, peça intermediária e cauda, sendo todas estas estruturas envoltas por uma membrana plasmática.

A cabeça contém basicamente o núcleo, caracterizado pelo DNA altamente condensado, o material genético que será transferido para o oócito durante a fertilização. A cabeça do espermatozoide é revestida apenas por uma delgada camada de citoplasma e pela membrana celular em torno da sua superfície. O acrossoma é uma estrutura de parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Golgi gerado durante a espermiogênese. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (EDDY e O'BRIEN, 1994; GARDNER e HAFEZ, 2004). Esta estrutura envolve dois terços do núcleo; nessa região encontra-se cinco membranas: a membrana plasmática, as membranas acrossomais externa e interna e as membranas nucleares externa e interna (CHRISTENSEN, 1995). A função principal da cabeça do espermatozoide é armazenamento e liberação do genoma para o oócito.

Na peça intermediária, as mitocôndrias (entre 75 a 100 aproximadamente) estão dispostas helicoidalmente, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (EDDY e O'BRIEN, 1994).

A cauda é composta por uma região de peça principal, a qual contém bainhas fibrosas, e peça final que contém axonema com nove microtúbulos para movimentação (AMANN e GRAHAM, 1993).

A cauda desenvolve-se a partir do centríolo e o movimento rotacional com chicote da cauda, denominado movimento flagelar, determina a motilidade

do espermatozoide. A movimentação flagelar é resultado de um movimento rítmico de deslizamento longitudinal entre os túbulos anteriores e posteriores que constituem o axonema. A energia necessária para este processo provém do trifosfato de adenosina (ATP), sintetizado pelas mitocôndrias da peça intermediária.

A membrana plasmática envolve externamente toda a célula espermática, sendo composta por camada de lipídeos, proteínas e carboidratos. A bicamada lipídica é base universal da estrutura das membranas celulares. Todas as moléculas lipídicas são anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica, voltada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica, voltada para o meio interno (SQUIRES *et al.*, 1999; ALBERTS *et al.*, 2004). A membrana plasmática não é uma estrutura estática. À temperatura corporal, a membrana é fluida e permite movimentação dos seus componentes em sentido lateral. Esta fluidez da membrana pode ser afetada por múltiplos fatores, incluindo principalmente a temperatura, composição e distribuição dos fosfolipídios e cadeias de ácidos graxos.

Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol, menos flexível e fluida é a membrana. Normalmente quanto maior a proporção colesterol:fosfolipídios, mais resistente é a membrana plasmática às mudanças de temperatura (AMANN e PICKETT, 1987). Os espermatozoides da espécie equina são considerados mais sensíveis ao choque térmico durante a redução de temperatura, sendo este fato atribuído principalmente a alterações na membrana plasmática (KIRK *et al.*, 2001). Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou, indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES *et al.*, 1999).

Para que ocorra a fertilização, o espermatozoide necessita de no mínimo sete atributos gerais: a) metabolismo para produção de energia; b) motilidade progressiva; c) integridade do DNA; d) enzimas localizadas no acrossoma (integridade acrosomal); e) composição e distribuição apropriada de lipídios e proteínas nas membranas (estabilização destas estruturas); f) proteínas na membrana plasmática essenciais para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital feminino (pela ação supressora da imunidade, pelas interações necessárias com células epiteliais e pelo acoplamento do espermatozoide à

membrana do oócito no momento da fertilização); g) capacidade de resposta aos agentes capacitantes (AMANN e PICKETT, 1987; AMANN e GRAHAM, 2011).

2.2 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo cíclico de multiplicação e diferenciação celular, em que as células primordiais passam por complexas transformações, a nível celular e molecular, até a formação de espermatozoides maduros (SHIVAJI *et al.*, 1990).

A contínua divisão celular confere ao macho características de produção espermática durante toda vida adulta. No garanhão, estima-se que cada grama de parênquima testicular possa produzir até 16 milhões de espermatozoides diariamente.

A espermatogênese dura aproximadamente 55-60 dias, sendo dividida em 3 fases: proliferação, meiose e diferenciação.

Na fase de proliferação, as células primitivas da linhagem espermática, denominadas de espermatogônias, localizadas na região periférica do túbulo seminífero, têm formato arredondado e são diploides (cromossomos $2n$). As espermatogônias, entram em sucessivas divisões celulares por mitose e originam os espermatócitos primários, células que mantêm o formato esférico.

A segunda fase é caracterizada por divisão celular por meiose, com principal função de redução no número de cromossomos diploides ($2n$) para haploide (n). Na primeira divisão meiótica (meiose I), os cromossomos homólogos segregam-se em duas células haploides, denominadas espermatócitos secundários, com cromátides duplicadas. Em seguida, estas células iniciam a segunda divisão meiótica (meiose II) formando espermátides, contendo cromossomos haploides.

Na fase de diferenciação, denominada espermiogênese, não há divisão celular. A espermiogênese é subdividida em quatro fases: fase Golgi, fase do acrossoma, formação do flagelo e fase de maturação. Nesta fase, as espermátides, haploides e com formato esférico, passam por uma progressiva série de modificações estruturais e de desenvolvimento, originando os espermatozoides com formato característico, terminando a espermatogênese.

Durante o período de espermatogênese, as células espermáticas permanecem no compartimento adluminal dos túbulos seminíferos e estão conectadas às células de Sertoli através de pontes citoplasmáticas, vestígios de citoplasma eliminados durante a diferenciação. As células com alterações são eliminadas principalmente por apoptose ou fagocitose pelas células de Sertoli (HENINGER *et al.*, 2004).

Os túbulos seminíferos constituem cerca de 70% do volume do testículo equino (JOHNSON, 1991), sendo estes conectados à cabeça do epidídimo pela *rete testis*, formada por pequenos ductos eferentes. A célula espermática madura é liberada de entre as células de Sertoli para o lúmen do túbulo seminífero, num processo designado espermição. Nesta etapa, os espermatozoides já possuem o flagelo, no entanto, não apresentam capacidade de movimentação própria e o transporte da célula é realizado pela contração de fibras musculares na parede dos túbulos e ductos. Ao final da espermatogênese, o espermatozoide ainda sem capacidade de fecundação, atinge o lúmen dos túbulos seminíferos, rede testis, ducto eferente e em seguida é conduzido ao epidídimo, onde ocorre a maturação e armazenamento espermático extragonadal.

2.3 EPIDÍDIMO E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

O epidídimo (em grego, epi=dentro e didymoi=germinativo ou testículo) é um órgão monotubular, alongado, localizado dorsalmente ao testículo no garranhão. Este órgão realiza o transporte dos espermatozoides do ducto eferente para o ducto deferente, sendo dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda (AMANN, 1993) (Figura 1).

A cabeça do epidídimo forma uma capa acoplada no polo cranial do testículo, apresentando células altas com grande quantidade de cílios que auxiliam o transporte espermático e absorção de fluídos. Neste local, o espermatozoide adquire motilidade progressiva. O corpo tem conformação semelhante a uma fita, na face laterodorsal do testículo, com células baixas e pouco ciliadas. As principais funções incluem absorção de fluídos, transporte e maturação espermática, sendo que nesta etapa, o espermatozoide adquire capacidade de fecundação. A cauda, bem destacada, situa-se no polo caudal

do testículo, com células baixas e sem cílios, sendo o principal reservatório de espermatozoides extragonadal (AMANN e GRAHAM, 2011).

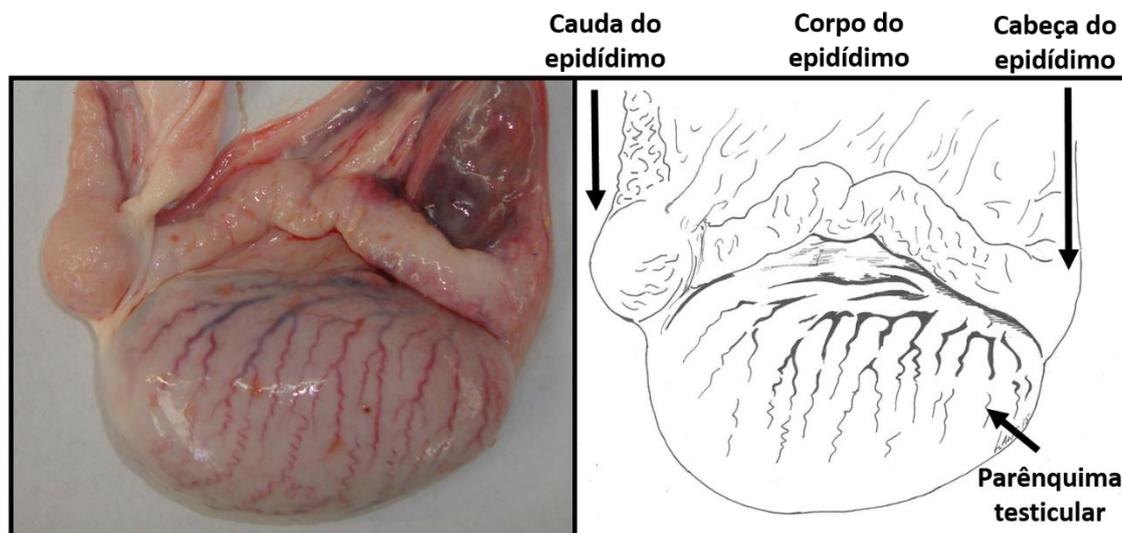


Figura 1. Anatomia do epidídimo do garanhão.

Fonte: Fernanda Carlini C Santos e André Lang

Após a passagem pelo epidídimo, o espermatozoide possui todos componentes para exercer sua principal função, a fecundação do oócito (AMANN, 1993). No garanhão, a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo tem duração aproximada de 10-12 dias. O número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculados sucessivos, dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do garanhão (BEDFORD, 1994).

Múltiplas características bioquímicas são modificadas durante o trânsito epididimário, incluindo a condensação da cromatina, trocas de fosfolípidios e colesterol, modificações na composição das proteínas da superfície da membrana plasmática (DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). Na maioria dos mamíferos, os espermatozoides necessitam alcançar a porção final do corpo do epidídimo para adquirir o potencial de fertilização, incluindo os equinos. Espermatozoides coletados da cabeça do epidídimo e porção inicial do corpo são incapazes de fertilização quando testados em inseminação artificial e fertilização *in vitro* (HORAN e BEDFORD, 1972).

A maturação do espermatozoide é um processo complexo que envolve eventos que ocorrem no epitélio seminífero, durante a sua migração pelos túbulos seminíferos e pelo epidídimo. A remodelagem nuclear e de membrana que ocorre durante esses eventos levam à diferenciação espermática, à aquisição da motilidade e à habilidade do espermatozoide de reconhecimento, ligação e penetração na zona pelúcida do oócito e, subsequentemente, fusão com o oócito (MOORE e AKHONDI, 1996). Ou seja, nos túbulos seminíferos ocorre a espermatogênese e no epidídimo o espermatozoide sofre maturação e adquire capacidade de fertilização.

Os espermatozoides maduros, localizados na cauda no epidídimo possuem habilidade de movimentação ativa e fertilização. Entretanto, após a ejaculação ou colheita do epidídimo, os espermatozoides sofrem uma série de alterações morfológicas e metabólicas no interior do sistema reprodutivo feminino, estas modificações são conhecidas como capacitação espermática (VISCANTI *et al.*, 2002). Nas espécies em que a ejaculação é intrauterina, como em equinos, os espermatozoides sofrem o processo de capacitação na tuba uterina, especificamente na região inicial do istmo (BAZER *et al.*, 1995), sendo esta capacitação o passo inicial para o processo de fertilização. O processo de capacitação promove importantes modificações na membrana plasmática e no metabolismo espermático, sendo estes essenciais para ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, onde ocorrerá a reação acrossomal. Durante o armazenamento das células espermáticas na cauda do epidídimo, os espermatozoides permanecem em um estado de quiescência, com intuito de prevenir o gasto desnecessário de energia com motilidade e evitar capacitação de forma prematura.

2.4 COLETA DE ESPERMATOZOIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

A coleta de sêmen da cauda do epidídimo pode ser a última oportunidade para preservar espermatozoides de um garanhão que veio a óbito, foi orquiectomizado (no caso de hérnias escrotais) ou possui alterações reprodutivas que impossibilitem a coleta de sêmen.

Espermatozoides viáveis da cauda do epidídimo têm sido coletados em diversas espécies, como bovinos (MARTINS *et al.*, 2009), cervídeos (FERNANDEZ-SANTOS *et al.*, 2009), caprinos (MARTINEZ-PASTOR *et al.*,

2005a), suínos (KIKUCHI *et al.*, 1998), felinos (GAÑÁN *et al.*, 2009) e equinos (PAPA *et al.*, 2008). Estas células são empregadas em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (PAPA *et al.*, 2008; HEISE *et al.*, 2010, MONTEIRO, 2010) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (HERRERA *et al.*, 2006).

Existem diferentes métodos para recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo, podendo ser utilizados em animais vivos ou post-mortem.

Em animais vivos, o material pode ser coletado por aspiração microcirúrgica (MESA) e aspiração percutânea (PESA) (SHRIVASTAV *et al.*, 1994; SILBER *et al.*, 1994). Em ambas técnicas, utilizadas principalmente em humanos, o número de espermatozoides e a motilidade são inferiores quando comparados aos do ejaculado. A técnica mais utilizada é a PESA, por ser um método menos invasivo, sem necessidade de experiência microcirúrgica (necessária na MESA) (ROSENLUND *et al.*, 1998) e com maior número de células recuperadas por procedimento. Em humanos, esta técnica é utilizada principalmente quando há diagnóstico de azoospermia obstrutiva, vasectomia ou alguma falha no transporte dos espermatozoides (DEVROEY *et al.*, 1996).

Os métodos para coleta em animais mortos incluem técnica de perfuração, de flutuação e de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo.

Na técnica de perfuração, a cauda do epidídimo é colocada em uma placa de Petri e, com auxílio de uma agulha, os ductos são perfurados (BARTELS *et al.*, 2000). Na sequência, a amostra é filtrada, para remoção de contaminantes, e submetida à criopreservação. Esta técnica apresenta boa taxa de recuperação, no entanto a viabilidade pode ser afetada pela exposição destas células a restos celulares, centrifugação e componentes sanguíneos (GUERRERO, 2006).

O método de flutuação consiste em seccionar a cauda do epidídimo por múltiplas incisões longitudinais, para exposição dos espermatozoides ao meio externo. Os segmentos são mantidos em meio diluidor aquecido, possibilitando a migração das células para este meio (CARY *et al.*, 2004). Em seguida, a amostra é filtrada e submetida a criopreservação. Em pequenos animais, esta é a técnica de eleição, devido ao reduzido tamanho do epidídimo, sendo que também pode ser utilizada em grandes animais (HISHINUMA *et al.*, 2003;

GUERRERO, 2006). Como principal desvantagem temos a contaminação da amostra com restos celulares e componentes sanguíneos (GUERRERO, 2006).

A técnica de fluxo retrógrado consiste no dissecamento cuidadoso, com auxílio de pinça e tesoura ponta romba, da cauda do epidídimo pela maior extensão possível (Figura 2 e 3). Em seguida, na extremidade proximal do ducto deferente é acoplado uma seringa e agulha, injetado diluente de sêmen, e a extremidade distal do ducto é guiada para desembocar em uma placa de Petri (Figura 4) (BRUEMMER *et al.*, 2006).

Em relação ao diluente, a coleta por fluxo retrógrado pode ser realizada com diluente de congelamento (15-20mL), sendo na sequência submetido a ajuste de concentração espermática por mL, ou com diluente de resfriamento, sendo na sequência submetido a centrifugação espermática e ressuspensão em diluente de congelamento (ALVARENGA *et al.*, 2016). Não foi observado diferença na qualidade espermática após descongelamento de sêmen da cauda do epidídimo coletado com diluente de congelamento ou resfriamento, sendo que única vantagem mencionada a eliminação da etapa de centrifugação quando a coleta é feita diretamente com diluente de congelamento (ALVARENGA *et al.*, 2016).

A coleta através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada para equinos, sendo as amostras obtidas com menor contaminação (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2006) e geralmente recuperado maior número de células espermáticas. As principais limitações incluem habilidade e treinamento do profissional, considerando que esta técnica é mais complexa que as anteriores, e tamanho do epidídimo.

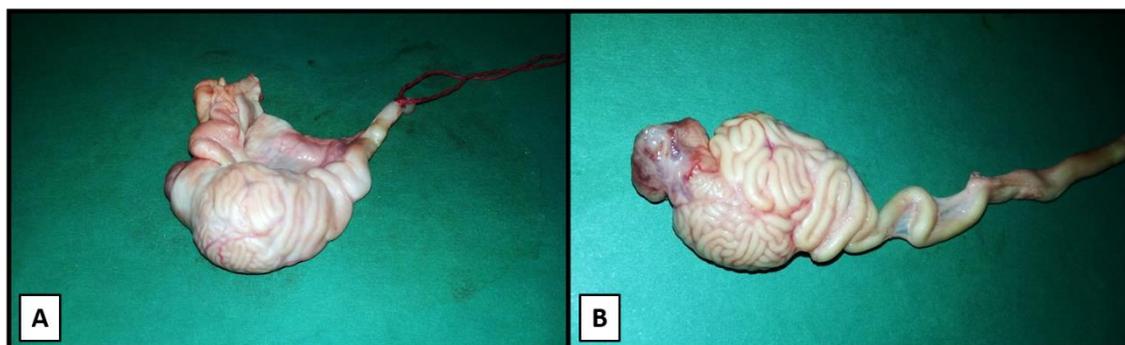


Figura 2. Técnica de fluxo retrógrado - Cauda do epidídimo prévio (A) e após remoção do tecido conjuntivo (B).



Figura 3. Técnica de fluxo retrógado - Dissecção da cauda do epidídimo pela maior extensão possível.



Figura 4. Técnica de fluxo retrógado - Lavagem por fluxo retrógado da cauda do epidídimo com diluente de sêmen.

Em um garanhão adulto podem ser coletados em torno de 15-25 bilhões de espermatozoides (BRUEMMER, 2006). Segundo AMANN *et al.*, (1979) um par de epidídimos, em garanhões adultos, hígidos, após repouso sexual, pode conter até 54×10^9 espermatozoides ou aproximadamente 61% de espermatozoides nos ductos extragonadaís.

2.5 QUALIDADE ESPERMÁTICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO EPIDÍDIMO

O intervalo entre a remoção do testículo e epidídimo do garanhão e realização da coleta de espermatozoides deve ser o mínimo necessário,

considerando que a gradual decomposição dos tecidos afeta a viabilidade celular (MURÁDAS *et al.*, 2006).

Em caprinos, espermatozoides provenientes de epidídimos armazenados a 5°C por até 72 horas apresentaram parâmetros espermáticos satisfatórios, podendo ser utilizados em biotecnologias da reprodução (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2005b).

Em carneiros, Kaabi *et al.* (2003) estudaram os efeitos do intervalo entre a morte do animal e a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo, armazenados à temperatura ambiente e a 5°C, por 0h, 24h e 48h. Foi constatado que as amostras mantiveram-se viáveis por até 24h quando armazenadas a temperatura ambiente e por até 48h quando armazenadas a 5°C. Espermatozoides coletados de epidídimos armazenados a 5°C apresentaram melhor motilidade e menos patologias do que os daqueles armazenados à temperatura ambiente por mais de 24 horas.

Em cervídeos, Martinez-Pastor *et al.* (2005a) avaliaram os parâmetros espermáticos em função do tempo pós-morte, observando valores satisfatórios até 48 horas após orquiectomia. A motilidade é o parâmetro espermático mais afetado de forma negativa conforme maior intervalo de tempo entre coleta e armazenamento.

Sob armazenamento à temperatura ambiente (18-25°C), ocorre um declínio significativo da motilidade, vigor e morfologia normal a partir de 12h após orquiectomia dos garranhões (GRANEMANN, 2006). Este decréscimo pode ser explicado pelo envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozoides, associado ao processo de degeneração tecidual pós-morte. A redução da temperatura retarda o processo de degeneração e reduz o metabolismo espermático, mantendo as células viáveis por maior tempo (GRANEMANN, 2006).

A refrigeração do complexo testículo-epidídimo a 4°C por 24h após a orquiectomia, antes de criopreservação, é um procedimento sem efeitos deletérios significativos na motilidade após descongelamento, quando comparados com os espermatozoides criopreservados imediatamente após orquiectomia (BRUEMMER *et al.*, 2002). Em concordância, não foi verificada diferença significativa em parâmetros de motilidade total, motilidade

progressiva e vigor de espermatozoide coletados do epidídimo de equinos até 24 horas pós-orquiectomia (MURÁDAS *et al.*, 2006).

Intervalos de tempo superiores foram relatados por James *et al.* (2002), demonstrando que espermatozoides viáveis podem ser coletados do epidídimo de garanhões até 96 horas *post mortem*, considerando um armazenamento de 4°C até a coleta. No entanto, os autores relataram que houve declínio significativo nos parâmetros de motilidade e viabilidade conforme o aumento do tempo de armazenamento.

2.6 PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES

O desafio da célula espermática durante o processo de criopreservação está relacionado à habilidade de resistir a à temperatura de armazenamento de -196°C e, além disso, suportar as alterações que ocorrem durante as duas zonas intermediárias de temperatura (19 a 8°C e -15 a -60°C), em dois momentos diferentes, durante congelamento e descongelamento (MAZUR, 1984).

A primeira zona de intermediária (19 a 8°C) é uma faixa crítica de temperatura, devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido para a fase de gel (GRAHAM, 1996), em que ocorrem alterações celulares parcialmente irreversíveis, sendo conjunto destas denominado de choque térmico.

O estado de choque térmico espermático é caracterizado pelo aparecimento de movimento circular anormal, perda prematura de motilidade, diminuição na produção de energia, aumento na permeabilidade da membrana, danos acrossômicos, perda de moléculas e íons intracelulares (AMANN e PICKETT, 1987; PICKETT e AMANN, 1993). A severidade dos danos provocados pelo choque térmico está associada à taxa de resfriamento e temperatura final a qual os espermatozoides estão sendo submetidos. Modificações na organização em mosaico fluído da membrana, como assimetrias na bicamada lipídica e sua interação com as proteínas, podem provocar alterações nos receptores de membrana, alterando suas funções. A membrana plasmática afetada pelo frio pode sofrer mudanças na permeabilidade, resultando em alterações funcionais e metabólicas, o que reduz a motilidade e capacidade fecundante (AMANN e GRAHAM, 1993).

Quando o sêmen é resfriado abaixo da temperatura de 5° C, os espermatozoides e o diluente permanecem em um estado de super-resfriamento, uma vez que os agentes crioprotetores diminuem o ponto de congelamento da suspensão. Entre as temperaturas de -5°C e -15°C, ocorre a formação de cristais de gelo, iniciando o congelamento propriamente dito.

À medida que a água do diluente congela, os solutos (sais, proteínas, açúcares e outros) acumulam-se nos canais remanescentes entre os cristais de gelo no meio extracelular. O aumento da concentração de solutos ao redor do espermatozoide altera o gradiente osmótico, favorecendo a saída de água de dentro da célula para o meio extracelular, sendo que este processo resulta na desidratação gradual dos espermatozoides (AMANN e PICKETT, 1987). No resfriamento lento (-25 a -40°C/min), a célula espermática desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular e conseqüentemente não há formação de grandes cristais no meio intracelular (AMANN e PICKETT, 1987). Por outro lado, numa curva de resfriamento muito rápida (> -60°C / min), a água não tem tempo para sair da célula e a partir de -10°C ocorrerá congelamento do meio intracelular com posterior ruptura de membranas.

A curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir a desidratação do espermatozoide (e conseqüentemente mínima formação de cristais de gelo) e suficientemente rápida para evitar a excessiva exposição da célula a altas concentrações de soluto. Desidratação excessiva resulta em deformação celular, danos estruturais na membrana, desalojam proteínas de membrana, desnaturam proteínas e separam as estruturas do citoesqueleto, sendo todas estas deletérias aos espermatozoides (SQUIRES et al, 1999). A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais, sendo que grandes cristais danificam mecanicamente a membrana celular.

Quando a velocidade de resfriamento ocorre de forma lenta mas constante, as células espermáticas mantêm-se perto do equilíbrio osmótico perdendo água para meio extracelular à mesma velocidade que se formam cristais de água nesse meio. Em contraste, se a velocidade de resfriamento ocorrer rapidamente, a formação de cristais extracelulares suplanta a capacidade da célula de libertar água. O resfriamento a baixa velocidade induz lesões pela exposição a altas concentrações de solutos (hiperosmolaridade). O

refriamento a alta velocidade induz lesões pela formação de cristais de gelo, intra e extracelulares. Portanto, a curva ótima de resfriamento encontra-se entre estes dois extremos (BARBAS e MASCARENHAS, 2009; OLDENHOF *et al.*, 2012).

Após a escolha pela curva de congelamento, será escolhida uma curva de descongelamento subsequente. Caso o sêmen seja congelado por meio de uma curva de congelamento lenta, deverá ser descongelado da mesma forma, para que haja tempo de o espermatozoide se reidratar e permitindo o descongelamento gradual dos cristais de gelo extracelulares (AMANN e PICKETT, 1987). O descongelamento dos cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Porém, se for utilizada uma curva de congelação rápida, a descongelação deverá ser rápida, evitando o fenômeno da recristalização (LEIBO e BRADLEY, 1999). Caso descongelamento seja excessivamente rápido, os cristais extracelulares descongelam muito rapidamente e a água do meio adentra nas células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000).

Os mamíferos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta ou baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, sendo estas geneticamente determinadas, predispondo os espermatozoides à maiores ou menores taxas sobrevivência quando submetidos ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000).

2.7 FERTILIDADE DO SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

Na espécie equina, a primeira prenhez obtida com espermatozoides criopreservados da cauda do epidídimo data da década de 1950, sendo que oito éguas foram inseminadas, com obtenção de uma gestação (taxa de concepção de 12,5%) e subsequentemente um potro (BARKER e GANDIER, 1957).

Os espermatozoides coletados do epidídimo podem ser utilizados para inseminação artificial de éguas, com sêmen fresco ou congelado, resultando em diferentes taxas de prenhez (MORRIS *et al.*, 2002; PAPA *et al.*, 2008; HEISE *et al.*, 2010; MONTEIRO, 2010). No entanto, vários autores indicaram que os parâmetros pós-descongelação dos espermatozoides epididimários são

de pior qualidade quando comparados com parâmetros seminais pós-descongelamento de sêmen proveniente do ejaculado (MORRIS *et al.*, 2002; NEILD *et al.*, 2006; PAPA *et al.*, 2008; TIPLADY *et al.*, 2002). Múltiplos estudos são conduzidos com intuito de aumentar a qualidade espermática, com resultados controversos.

Guasti *et al.* (2013) avaliaram a influência da pentoxifilina sobre os parâmetros de motilidade de espermatozoides recém-recuperados da cauda do epidídimo de garanhões. As amostras recuperadas com meio diluidor contendo pentoxifilina apresentaram melhora na cinética espermática quando comparadas as amostras recuperadas somente com o meio diluidor a base de leite desnatado.

Pasquini *et al.* (2008) compararam a eficiência de fatores estimuladores de motilidade espermática em espermatozoides do epidídimo de garanhões, concluindo que a adição dos meios Fert-Talp, Talp + Progesterona Sperm-Talp melhoraram a motilidade de espermatozoides do epidídimo após descongelamento.

Heise *et al.* (2010) compararam a taxa de prenhez de espermatozoides recuperados da cauda epidídimo acrescidos ou não de plasma seminal. A dose inseminante foi de 200×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva. Deste modo, nas inseminações com espermatozoides do ejaculado obteve-se taxa de prenhez de 55,6% com sêmen fresco e de 38,9% com sêmen congelado. Com espermatozoides epididimários, as taxas de fertilidade obtidas na presença do plasma seminal foram de 75% quando utilizados após a recuperação e de 27,8% para os espermatozoides congelados. Na ausência do plasma seminal, estes valores foram de 22,2% e 6,7% com a utilização de espermatozoides recém recuperados e congelados, respectivamente. Este estudo demonstrou maiores taxas de prenhez com espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de garanhões após adição de plasma seminal.

Morris *et al.* (2002) obtiveram uma taxa de prenhez de 45% das éguas, quando inseminadas com sêmen a fresco do epidídimo na dose de 200×10^6 spz. Com sêmen congelado do epidídimo e mesma dose obtiveram uma taxa de prenhez de 18% para inseminação por histeroscopia e 8% com inseminação convencional. O processo de criopreservação afetou negativamente as taxas

de prenhez quando comparado espermatozoides recém coletados do epidídimo e descongelados.

A fertilidade de sêmen equino obtido a partir da cauda do epidídimo já foi comprovada (BARKER e GANDIER, 1957), sendo que as pesquisas mais recentes concentram-se no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo (BRUEMMER, 2006), comparação de meios diluentes (PAPA *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2008), refrigeração espermática (MONTEIRO *et al.*, 2010), efeito da adição de plasma seminal (MORRIS *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2005), viabilidade espermática de garanhões subférteis (MONTEIRO *et al.*, 2010), fertilidade (PAPA *et al.*, 2008), métodos de inseminação artificial (MORRIS *et al.*, 2002), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (HERRERA *et al.*, 2006) e métodos de seleção espermática, visando a separação de espermatozoides com uma melhor qualidade espermática.

2.8 CENTRIFUGAÇÃO COM CUSHION

A centrifugação convencional apresenta efeitos deletérios sobre a viabilidade dos espermatozoides, uma vez que a força e tempo de centrifugação podem interferir negativamente na motilidade, integridade e taxa de recuperação espermática (SIEME *et al.*, 2003).

A centrifugação com coloide de alto peso molecular, também denominada de “cushioned”, é caracterizada pela deposição da amostra de sêmen sobre uma camada (1 a 4mL) de solução isotônica de iodixanol na parte inferior do tubo (REVELL *et al.*, 1997), seguida de centrifugação em maior velocidade do que a convencional (Figura 5). Posteriormente à centrifugação, o sobrenadante deve ser cuidadosamente removido através da aspiração com um cateter acoplado a uma seringa ou um equipamento de aspiração. Na sequência, a solução de cushion também deve ser removida através de aspiração e o pellet ressuspensionado.

O cushion protege os espermatozoides dos danos causados pela centrifugação em alta velocidade, além de evitar lesões celulares devido a formação e ressuspensão de pellets muito densos, reduzindo a perda de células descartadas com o sobrenadante e elevando o número de células recuperadas com melhor qualidade (ECOT *et al.*, 2005). O cushion atua como

um sistema de amortecimento e desta forma reduz os danos mecânicos da centrifugação espermática (ECOT *et al.*, 2005).

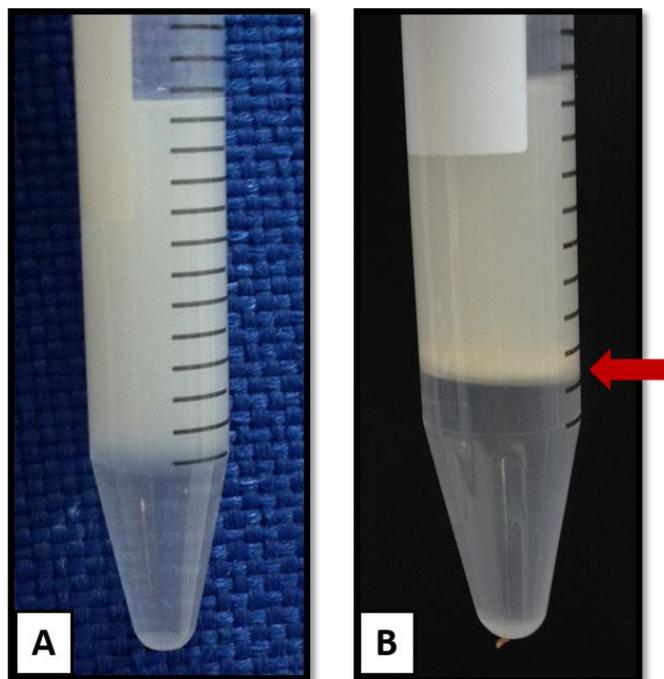


Figura 5. Sêmen equino sobre uma camada de Cushion previamente a centrifugação (A) e pellet (seta vermelha) após centrifugação (B).

Em ejaculado de garanhões, já foi comprovado uma maior taxa de recuperação de espermatozoides após centrifugação com cushion (SIEME *et al.*, 2006). Ecot *et al.* (2005) constataram uma taxa de recuperação de 83%, usando a técnica de centrifugação com cushion, em comparação a taxa de recuperação de 75%, usando a técnica de centrifugação convencional.

Considerando que a coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo é a última oportunidade para obtenção de espermatozoides de um garanhão, a centrifugação com cushion pode ser uma alternativa viável para melhorar a quantidade de células recuperadas.

2.9 CENTRIFUGAÇÃO COM COLOIDE EM CAMADA ÚNICA (SLC)

A centrifugação com coloide em camada única (SLC) tem como intuito a seleção de espermatozoides morfologicamente normais, com alto potencial mitocondrial, com cromatina, membrana plasmática e acrossoma íntegros, sendo características associadas à maior motilidade espermática e que,

consequentemente, resultam em uma amostra espermática com melhor qualidade.

O coloide utilizado para SLC é uma substância composta de sílica revestida, sendo um gradiente de densidade para centrifugação de sêmen (Figura 6).

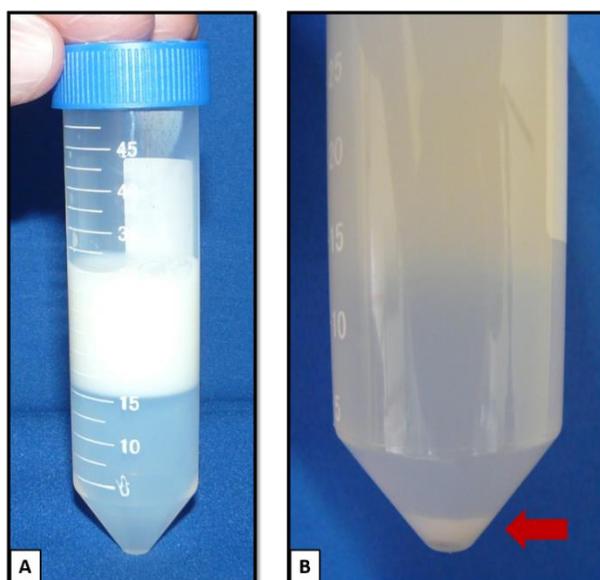


Figura 6. Sêmen equino depositado sobre coloide em camada única, previamente a centrifugação (A) e pellet (seta vermelha) após centrifugação (B).

Gradientes de densidade têm como princípio a separação de populações celulares com diferenças na gravidade específica (relacionada ao estado de maturação ou integridade de organelas) em diferentes camadas após centrifugação (FORD e GRAHAM, 1991). A centrifugação em coloide em camada única baseia-se no princípio do ponto isopícnico (igual densidade) durante a centrifugação. Quando espermatozoides ou qualquer outra população celular são submetidos a centrifugação com coloide, as células movimentam-se para um ponto do gradiente que tenha a mesma densidade (FORD e GRAHAM, 1991). Este conhecimento físico aliado ao conhecimento da densidade da subpopulação espermática com boa motilidade, viabilidade e integridade da cromatina, podemos selecionar os espermatozoides desejados centrifugando o sêmen através de um coloide com densidade conhecida (PERTOFT, 2000). Durante a centrifugação, todos os espermatozoides são alinhados paralelamente à força centrífuga, desta forma, as células que têm

movimento progressivo podem se mover até o fundo do tubo de centrifugação mais rapidamente que espermatozoides imóveis ou com baixo vigor (RHO *et al.*, 2001). Além disso, espermatozoides com uma boa morfologia nuclear são mais densos e, portanto mais pesados (LE LANNOU e BLANCHARD, 1988), sendo que esta característica associada a motilidade permite que esta subpopulação atinja a porção inferior do tubo mais rapidamente.

Os espermatozoides possuem densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, e, portanto, podem ser separados de outros componentes do ejaculado. Espermatozoides imaturos, senescentes e com DNA danificado são retidos nas camadas superiores do gradiente ou na interface, deixando a subpopulação de espermatozoides móveis e potencialmente férteis no pellet (SAKKAS *et al.*, 2000). Como os espermatozoides móveis podem se orientar na direção da força centrífuga e formar um pellet mais rápido do que os imóveis, a seleção cuidadosa do tempo de centrifugação e da velocidade permite a separação das duas subpopulações espermáticas (MORRELL, 2006).

Após o procedimento, as células selecionadas formam um pellet, enquanto outros componentes, tais como células mortas, com alterações morfológicas, com organelas lesadas, bactérias e partículas contaminantes localizam-se no sobrenadante (MORRELL *et al.*, 2011). Considerando que este coloide atua selecionando uma subpopulação de células espermáticas com melhor qualidade, a taxa de recuperação após centrifugação varia conforme a qualidade inicial da amostra (MORRELL *et al.*, 2009d).

Morrell *et al.* (2011) relataram uma correlação significativa entre a taxa de recuperação espermática com a morfologia normal ($r = +0,64$) e taxa de fragmentação do DNA ($r = -0,54$), em ejaculados de garanhões centrifugados com SLC.

Em ejaculados de garanhões, o uso de SLC em sêmen fresco e refrigerado por 48h a 5°C melhorou os parâmetros de motilidade, integridade acrossômica e morfologia (JOHANNISSON *et al.*, 2009).

Anja *et al.* (2013) observaram que amostras de sêmen equino submetidas a SLC apresentaram menos espermatozoides com lesão em DNA, maior motilidade progressiva, mais células morfolologicamente íntegras e maior

número de células com alto potencial mitocondrial, quando compararam com o sêmen congelado e descongelado não selecionado durante a centrifugação.

Papa *et al.* (2012) ao testarem o coloide Equipure® antes da congelação de sêmen equino observaram aumento significativo dos parâmetros de cinética espermática tanto após a seleção espermática quanto após a descongelação do sêmen. Corroborando com estes dados, Stoll *et al.* (2012) observaram melhora dos parâmetros espermáticos com a seleção espermática com Equipure® realizada após a descongelação.

2.10 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, sendo esta influenciada por inúmeros fatores. Os testes laboratoriais de análise de sêmen têm como intuito a predição da qualidade espermática, compreendendo principalmente a avaliação de movimentação, integridade estrutural e funcional.

2.10.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A avaliação da motilidade espermática consiste na determinação da percentagem de espermatozoides totais com movimento em um ejaculado. Apesar da avaliação da motilidade espermática não poder ser usada como uma mensuração dos espermatozoides vivos e mortos na amostra, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois a motilidade é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PENA-MARTINEZ, 2004). Existe forte correlação entre a motilidade espermática e a capacidade dos espermatozoides migrarem através do trato genital feminino até o sítio de fertilização (TSAKMAKIDIS, 2010). A avaliação desses parâmetros por meio da microscopia ótica oferece limitações primárias como a subjetividade e a variabilidade (RIJSSELAERE *et al.*, 2005). A determinação subjetiva da motilidade espermática pode ser influenciada pela temperatura de avaliação e pela qualificação do avaliador, levando a uma alta variabilidade entre os laboratórios e operadores (IGUER-OUADA e VERSTEGEN, 2001). A análise computadorizada do movimento espermático (*Computer Assisted Sperm Analysis - CASA*) tem como principal objetivo superar o obstáculo de subjetividade, aumentando a acurácia da avaliação de

sêmen e incrementando os dados avaliados em estudos andrológicos (TARDIF *et al.*, 1997; VERSTEGEN *et al.*, 2002; AMANN e KATZ, 2004; UCHOA *et al.*, 2012).

CASA é um sistema computadorizado e automático de captura e análise de sucessivas fotos dos espermatozoides, que formam um filme com o trajeto de cada célula. Por esse sistema é possível obter informações mais precisas e acuradas do movimento de cada célula espermática (AMANN e KARTZ, 2004).

As imagens são capturadas por um sistema estroboscópico acoplado a um computador, que digitaliza as imagens, e um *software*, que une estas imagens, formando o vídeo. O trajeto é obtido através de marcações de pontos onde a cabeça do espermatozoide está em cada foto. Embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que propulsiona o movimento, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça, porque é tecnicamente mais fácil o acompanhamento deste movimento (AMANN e KATZ, 2004).

Para cada espécie animal, o computador é programado com uma micrometragem mínima e máxima. Neste caso, objetos que tiverem tamanhos dentro da faixa registrada são considerados espermatozoides e marcados na tela de avaliação, sendo operada por um técnico especializado. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo do mínimo são consideradas contaminantes (MORTIMER e MAXWELL, 1999).

Depois de identificado o espermatozoide, o *software* une as imagens traçando assim a trajetória de cada célula. As células espermáticas são classificadas quanto ao seu movimento em padrões definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER e MAXWELL, 1999). Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide (QUINTERO-MORENO *et al.*, 2003).

Apesar do alto custo e técnica, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez e objetividade nas avaliações, possibilitando detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado, fornecendo assim, informações e detalhes adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozoides (FARRELL *et al.*, 1998; SOUSA, 2007). Os principais parâmetros da cinética espermática possíveis de serem avaliados pelo sistema CASA incluem:

- Motilidade total (MT) - A razão das células móveis no total de espermatozoides da amostra (%).

- Motilidade progressiva (MP) - A razão das células móveis com movimento progressivo no total de espermatozoides da amostra (%).

- Velocidade média na trajetória (VAP) - A indicação da trajetória geral do espermatozoide, sendo a velocidade média ininterrupta do caminho da célula ($\mu\text{m/s}$).

- Velocidade linear (VSL) - Considera a trajetória espermática como uma reta. É a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso ($\mu\text{m/s}$).

- Velocidade curvilínea (VCL) - A velocidade do deslocamento real dos espermatozoides, ou seja, e a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula ($\mu\text{m/s}$).

- Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) - Corresponde a largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento (μm).

- Frequência de batimento da cauda (BCF) – Definida como a frequência com que a cabeça do espermatozoide movimenta-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido (Hz).

- Retilinearidade (STR) - É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta (uma comparação da linha reta com a média dos caminhos) (%).

- Linearidade (LIN) - É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta (comparação da linha reta e os caminhos curvilíneos) (%).

2.10.2 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração representa o número de espermatozoides por milímetro (mm^3) cúbico, sendo este exame realizado com sêmen diluído em solução de formol salino na proporção 1+20. As principais técnicas empregadas para obtenção da concentração espermática consistem na contagem das células na câmara de Neubauer, espectrofotometria, *Micro-cell-counter* e sistema CASA (CBRA, 2013), com preferência para os sistemas automatizados pela acurácia.

A concentração espermática varia conforme a idade, raça, características individuais e frequência de ejaculação do garanhão.

A determinação da concentração espermática é imprescindível para realização da manipulação do sêmen, seja para inseminação artificial a fresco, resfriamento, congelamento ou para aplicação de demais biotécnicas. No emprego de técnicas de seleção espermática por centrifugação em coloide de única camada a concentração máxima indicada é de 100×10^6 spz/mL. A concentração de $25-50 \times 10^6$ spz/mL é considerada ideal para o resfriamento de sêmen equino, auxiliando na manutenção da qualidade espermática (JASKO *et al.*, 1991; VARNER *et al.*, 1987). A qualidade espermática após descongelamento está relacionada a concentração espermática e quantidade de crioprotetores por unidade de volume (ANGOLA *et al.*, 1992). Para o congelamento de sêmen, há relatos de uma faixa ampla de concentração, variando de $20-1600 \times 10^6$ spz/mL, apresentando melhores resultados com até 400×10^6 spz/mL (HEITLAND *et al.*, 1996; NASCIMENTO, 2006).

2.10.3 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia do espermatozoide pode ser alterada em qualquer fase da espermatogênese, da maturação, durante e após a ejaculação (DOTT, 1975).

Para avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides são utilizados basicamente duas técnicas: preparação seca (esfregaço em lâmina seguido de coloração com leitura posterior) ou preparação úmida (adição de corante em uma gota de sêmen, fixação com lamínula e leitura em seguida). A leitura pode ser realizada em microscopia ótica, microscopia com contraste de fase e por sistema automatizados, sendo estes últimos mais restritos a área de pesquisa.

As avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado (*Automated Sperm Morphometry Analyses - ASMA*) são realizadas em esfregaços corados. As imagens destinadas à avaliação da morfometria da cabeça dos espermatozoides são avaliadas por um *software*, sendo aplicada em várias espécies incluindo a bovina (GRAVANCE *et al.*, 1996), caprina (GRAVANCE *et al.*, 1995), ovina (GRAVANCE *et al.*, 1998), humana (DAVIS e KATZ, 1993) e equina (ARRUDA *et al.*, 2002). Estes sistemas são programados para classificar objetos e diferenciar imagens das

células espermáticas do detrito seminal e/ou superposição de células, medindo parâmetros como diâmetro máximo, diâmetro mínimo, área da cabeça, porcentagem de acrossomo (obtido dividindo área do acrossomo pela área da cabeça) e fator de elipse (obtido dividindo-se o diâmetro mínimo da cabeça pelo máximo), que são utilizados para classificar as células segundo sua forma em: normal (formato de cabeça regular), afilada, redonda, macro, micro ou amorfo (cabeça irregular).

As patologias espermáticas podem ser classificadas pela região anatômica do espermatozoide (CBRA, 2013), defeitos maiores e menores (BLOM, 1973), defeitos primários e secundários (BLOM, 1977) e compensáveis e não compensáveis (SAACKE *et al.*, 2008).

A classificação de Blom (1973) é baseada no grau de importância do defeito e relevância na fertilidade, em defeitos maiores e menores, sendo esta classificação mais utilizada em bovinos. Nos defeitos maiores estão inclusas as anormalidades correlacionadas com prejuízos de fertilidade ou com uma condição patológica do testículo ou epidídimo, dentre elas: subdesenvolvimento, formas duplas, *knobbed sperm*, decapitado, diadema, piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça destacada anormal, peça intermediária em saca-rolhas, outros defeitos de peça intermediária, gota proximal, cauda fortemente dobrada ou enrolada. Nos defeitos menores, estão inclusos desvios de forma, aparentemente de menor importância, como cabeça delgada, cabeça pequena normal, cabeça gigante, curta e achatada, cabeça normal destacada, acrossomo destacado, inserção abaxial, gota distal, cauda dobrada ou enrolada, e cauda enrolada na extremidade.

Considerando a classificação de Blom (1977), há duas categorias morfológicas para os defeitos dos espermatozoides em equinos: primários, que ocorrem durante a espermatogênese, e secundários, que ocorrem durante o trânsito pelos ductos, representando falhas na maturação, transporte ou durante manipulação do sêmen.

Os defeitos primários tem maior influência na qualidade espermática do que os secundários. Segundo o CBRA (2013), para garanhões é considerado aceitável o máximo de defeitos totais de 30% para sêmen fresco e 40% para sêmen descongelado.

Embora os aspectos morfológicos do sêmen tenham mostrado associações expressivas com a fertilidade (JASKO *et al.*, 1990), as dificuldades em estabelecer um modelo de uso prático na rotina de um estabelecimento de criação de equinos ainda são marcantes. As anormalidades morfológicas variam entre indivíduos, durante o período reprodutivo, e podem ou não estar associadas a outras características espermática (HELLANDER *et al.*, 1991; VEERAMACHANENI RAO *et al.*, 1993; HAMMES *et al.*, 1996), sem que haja um comprometimento efetivo sobre a fertilidade. Segundo Kenney *et al.* (1983) a combinação entre concentração espermática, motilidade e percentual de espermatozoides morfolologicamente normais são as características que melhor explicam a variação na taxa de prenhez obtida no fim de uma temporada de monta.

Em relação a outras espécies, os espermatozoides equinos apresentam peculiaridades, sendo que a implantação abaxial da cauda considerada fisiológica (BIELANSKI e KACZMARSKI, 1979). Durante a espermatogênese ocorre a formação da gota citoplasmática, sendo esta um resíduo do processo de formação e maturação espermática. Ao longo do trânsito espermático, a gota gradualmente migra para a peça intermediária, de proximal para distal, até completo desprendimento do citoplasma. Os espermatozoides coletados do epidídimo estão em diferentes estágios de maturação, sendo assim é esperado a detecção de uma maior quantidade de células com gota citoplasmática.

Na classificação de Saacke *et al.* (2008), as alterações morfológicas foram divididas como compensáveis ou não compensáveis. Esta classificação tem cunho voltado para academia, com utilidade restrita para avaliação andrológica de rotina comercial, no entanto é importante que o profissional tenha conhecimento sobre este método de classificação (ARRUDA *et al.*, 2015).

Essa classificação considera que os espermatozoides anormais podem reduzir a fertilidade de um macho por dois motivos principais. O primeiro deles é pela incapacidade em alcançar o local da fertilização, muitas vezes atribuída a defeitos que influenciam negativamente no transporte espermático. Estes defeitos causam redução da motilidade espermática e induzem com que os espermatozoides tenham menor probabilidade de transcender com sucesso o trato reprodutivo feminino. Estas anomalias morfológicas são denominadas de

defeitos compensáveis, dentre as quais poderiam ser citadas: defeitos de cauda, gotas citoplasmáticas e defeitos sutis no formato da cabeça. Em tese, um aumento no número de espermatozoides funcionalmente competentes poderia resolver ou mitigar o problema de fertilidade de um ejaculado ou de uma partida de sêmen. Por outro lado, existem defeitos espermáticos que determinam ao espermatozoide, mesmo que este alcance normalmente o sítio de fertilização, uma incapacidade intrínseca para fertilização do oócito ou para sustentação do desenvolvimento embrionário inicial, com maior quantidade de falhas acontecendo antes do reconhecimento materno da gestação. Estas anomalias espermáticas são denominadas de defeitos não compensáveis e, diferentemente do primeiro caso, não são passíveis de elevação da fertilidade, mesmo que haja um incremento no número de espermatozoides no ejaculado. Os defeitos não compensáveis incluem os que alteram significativamente o formato da cabeça espermática e defeitos na estrutura da cromatina (SAACKE *et al.*, 1994; SAACKE *et al.*, 2000).

2.11 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA COM SONDAS FLUORESCENTES

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. A funcionalidade de organelas dos espermatozoides e compartimentos podem ser avaliados por procedimentos específicos de coloração, conhecidos como sondas fluorescentes (ARRUDA *et al.*, 2011). As sondas fluorescentes são corantes usadas na identificação de condições subcelulares, sendo possível a identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula (SOUSA *et al.*, 2012). Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas. A leitura das amostras coradas com sondas fluorescentes pode ser feita em microscópio de fluorescência ou em citômetro de fluxo.

A avaliação com sondas fluorescentes possui limitações, incluindo necessidade de equipamentos de custo mais alto como um microscópio de epifluorescência ou um citômetro de fluxo, importação (não há produção

brasileira e trâmite é burocrático e demorado) e padronização na leitura de resultados, tanto para microscopia como para citometria.

A microscopia por epifluorescência é o método principalmente utilizado devido a disponibilidade do aparelho, sendo mais barato que a citometria de fluxo. Neste método, o número de células avaliadas é entre 100-200, fixadas em lâmina, com maior subjetividade, pois depende da experiência do profissional treinado para detecção de cada parâmetro. A análise de células é considerada qualitativa.

A citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para análise celular, uma vez que, em poucos minutos, o citômetro fornece dados sobre todas as subpopulações celulares de uma amostra, tornando-o ideal para avaliação de populações heterogêneas, como os espermatozoides (GRAHAM, 2001; GILLAN et al., 2005; GRAHAM e MOCÉ, 2005).

A citometria de fluxo permite a observação de características, como tamanho da célula, forma e complexidade interna, assim como qualquer componente ou função do espermatozoide que pode ser detectado por um fluorocromo ou composto marcado com fluorescência (GRAHAM, 2001). Com a citometria de fluxo, é possível contar, examinar e classificar células em uma solução aquosa em fluxo. Essa solução é direcionada a um fluxo linear, onde as células passam individualmente através de um feixe de luz ou laser. Esse feixe excita as sondas fluorescentes, ou fluorocromos, associadas às células e capta a frequência da luz. O equipamento converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por softwares específicos, gerando gráficos com distintas populações celulares

A análise é objetiva, tem um alto nível de repetibilidade experimental e possui a vantagem de estar apta a trabalhar com amostras de volume reduzido. Além disso, o citômetro de fluxo tem a capacidade de detectar marcadores por múltiplos fluorocromos associados a um único espermatozoide, o que significa que mais de um atributo espermático pode ser avaliado simultaneamente (GILLAN *et al.*, 2005), denominado de avaliação (multiparamétrica). A análise de células é considerada qualitativa e quantitativa. Aproximadamente 50.000 células podem ser avaliadas em um minuto, número substancialmente maior do que o total de 200 células geralmente analisadas por microscopia ótica (GILLAN *et al.*, 2005; GRAHAM e MOCÉ, 2005). Por meio da citometria de

fluxo, é possível medir a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associadas às células, de forma imparcial, com precisão, sensibilidade, rapidez, em um número estatisticamente relevante de células (CORDELLI *et al.*, 2005).

2.11.1 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática envolve toda a célula espermática e é formada basicamente por lipídios (bicamada), proteínas e carboidratos (BORGES *et al.*, 2011). Os principais lipídios são os fosfolipídios, compostos por uma alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, que garantem a fluidez da membrana; os esteróis, sendo o principal o colesterol; e os glicolipídios (PARKS e LYNCH, 1992; FLESCHE e GADELLA, 2000). As proteínas integrais e periféricas atuam como bombas de cálcio, sódio e outros íons, e como receptores associados a interações ao oócito (GRAHAM, 1996). Os carboidratos, encontrados na superfície da membrana plasmática, são responsáveis pela adesão entre as células, como a do espermatozoide e o oócito (ALBERTS, 1997).

A qualidade espermática está correlacionada com a integridade da membrana plasmática, pois esta membrana não apenas limita a célula mas também tem função nas interações celulares, como por exemplo a ligação do espermatozoide ao epitélio da tuba uterina ou a penetração da célula espermática no oócito (FOSTER *et al.*, 2011). Ainda que a membrana plasmática envolva a célula espermática toda, ela é constituída de três compartimentos distintos, a membrana acrossomal externa que envolve todo o acrossomo, a membrana que envolve a porção posterior ao acrossomo na cabeça do espermatozoide e o compartimento que envolve a peça intermediária (MOCÉ e GRAHAM, 2008). A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estrutura, que é a mais afetada pelo choque frio, podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN e PICKETT, 1987; AMANN e GRAHAM, 2011).

Na temperatura corpórea, a membrana plasmática está na forma de um mosaico fluido de lipídeos e proteínas. As proteínas se movem livremente na

bicamada de fosfolipídios, sendo esta movimentação necessária na funcionalidade da membrana (JASKO, 1994). Com a redução da temperatura os lipídeos da membrana passam de um estado fluído, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas (AMANN e GRAHAM, 2011). Este evento é chamado de fase de transição lipídica e ocorre em uma temperatura específica para cada tipo lipídeo. Em equinos, a fase de transição dos fosfolipídios ocorre por volta dos 20,7°C (PARKS e LYNCH, 1992). Esta mudança restringe a mobilidade das proteínas da membrana, alterando sua funcionalidade. Com a continuidade do declínio da temperatura, o arranjo da bicamada pode não ser mais mantido, resultando na ruptura da membrana (JASKO, 1994).

Após atingir a maturidade, o espermatozoide, perde a maioria de suas organelas e a transcrição do DNA é cessada, sendo impossível sintetizar novos componentes da membrana plasmática. Assim, danos à mesma resultam em irreversível perda de sua função (EDDY e O'BRIEN, 1994). Portanto, a integridade da membrana plasmática é fundamental para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992).

A determinação da integridade da membrana plasmática é realizada com corantes fluorescentes (sondas) impermeáveis à membrana, com afinidade ao DNA, portanto, as células não coradas são consideradas com membrana plasmática intacta.

O Hoeschst 33258 (H258), YoPro-1, homodímero de etídio-1 (EthD-1) ToPro-1, TOTO e iodeto de propídio (PI) são os principais exemplos de sondas.

As sondas acetiladas, que por conter radicais acetil conseguem passar na membrana intacta, representam uma outra alternativa para avaliação da membrana, sendo imediatamente desacetiladas por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável. Assim, as células intactas apresentam coloração, porém é possível haver ligação sondas a células deterioradas com membrana lesada. Exemplos destas sondas são o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e SYBR-14. É possível utilizar simultaneamente as sondas, como SYBR-14 ou CFDA com PI ou EthD-1, para detectar células com

membrana plasmática intacta e lesada, respectivamente (AURICH, 2005; SILVA e GADELLA, 2006).

O CFDA é uma sonda fluorescente permeável à membrana plasmática do espermatozoide. Enzimas presentes no citoplasma espermático convertem a molécula de CFDA em fluoresceína que emite uma fluorescência verde. O iodeto de propídio (IP) tem afinidade com receptores localizados no DNA. Ele não é permeável à membrana plasmática, porém, quando esta apresenta alguma falha de continuidade, a molécula de IP consegue penetrar na célula e se ligar ao DNA. Quando isso ocorre é emitida uma fluorescência vermelha (HARRISON e VICKERS, 1990; ARRUDA *et al.*, 2011). O espermatozoide é corado de verde pelo CFDA, através de esterases não específicas, que se transformam em carboxifluoresceína livre no interior da célula, ficando esta retida (HARRISON e VICKERS, 1990) nos espermatozoides com membrana íntegra (HAUGLAND, 1992). O PI cora as células mortas de vermelho, devido à permeabilidade alterada da membrana danificada (GARDNER *et al.*, 1986). O PI é bastante utilizado, isoladamente ou associado a outras sondas, devido a sua facilidade de preparação e aplicação, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana corada.

A utilização conjunta do CFDA com o PI é considerada mais segura para avaliar a integridade de membrana do que a utilização isolada destes corantes (HARRISON e VICKERS, 1990). Esta técnica tem como desvantagem a necessidade de ser realizada o mais rápido possível depois da aplicação do corante, pois a cor se perde devido à passagem dos compostos fluorescentes através da membrana (GARDNER *et al.*, 1986).

2.11.2 INTEGRIDADE DE MITOCÔNDRIA

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária, com principal função de produção de ATP por fosforilação oxidativa. O ATP é o suplemento energético para os batimentos flagelares, sendo indispensável para motilidade espermática (COSSON, 1996) e conseqüentemente a migração e sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea.

As sondas fluorescentes Rodamina 123 (R123) e os corantes da linha Mitotracker®: Deep Red, Red, Orange, Green, Orange CM-H2TMROS, X

Rosamine CMH2XRos e o JC-1 (SILVA e GADELLA, 2006) são indicadores do potencial de membrana de mitocôndrias, com ausente toxicidade celular. O corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final.

2.11.3 INTEGRIDADE DE DNA

A integridade do DNA de espermatozoides de mamíferos é de importância vital para a contribuição paterna de um descendente normal (ANDRABI, 2007; SHIBAHARA *et al.*, 2003), uma vez que danos de DNA podem resultar em morte celular e na indução de mutações que podem ser transportadas para a próxima geração ou resultar em infertilidade do macho. Assim, a integridade do DNA se tornou importante como indicador da qualidade do espermatozoide (HUGHES *et al.*, 1999).

A análise da estrutura da cromatina do espermatozoide é um método para determinação da susceptibilidade do DNA espermático à desnaturação, relacionada à fertilidade. Uma sonda metacromática, laranja de acridina (Acridine Orange) é utilizada para avaliação da relação do DNA duplo-filamento (nativo) e simples (anormal ou lesado) presente no espermatozoide, por meio da emissão de fluorescência verde ou laranja, respectivamente.

Os distúrbios na integridade da cromatina são caracterizados pela presença de fraturas na banda simples ou dupla da molécula de DNA que leva à formação de segmentos desnaturados (RYBAR *et al.*, 2004). Uma suscetibilidade aumentada à desnaturação demonstra heterogeneidade da estrutura da cromatina e tem sido relacionada a distúrbios na espermatogênese, morfologia anormal (ENCISO *et al.*, 2011), concentração e motilidade espermática diminuídas (BENCHAIB *et al.*, 2003), danos ao desenvolvimento embrionário e consequente fertilidade reduzida (HALLAP, 2005). Os espermatozoides afetados possuem a capacidade de fertilizar oócitos, mas o consequente desenvolvimento embrionário depende do grau de alteração do DNA (AHMADI e SOON-CHYE, 1999).

A desnaturação da cromatina é mais alta no sêmen de garanhões subférteis em comparação a garanhões férteis (32% versus 16%) e o escore de desnaturação é negativamente correlacionado com a taxa de prenhez

(KENNEY *et al.*, 1995). Quando um espermatozoide com DNA danificado fertiliza o oócito, pode ocorrer impacto negativo no desenvolvimento fetal (EVENSON e JOST, 2000), o que possibilita a mortalidade embrionária precoce e prejudica a eficiência reprodutiva. Uma das principais causas da morte embrionária precoce é a deposição da cromatina anormal no oócito (QIU *et al.*, 1995). Segundo Karabinus *et al.* (1997), o estresse de temperatura acarreta alterações morfológicas e bioquímicas desde a espermatogênese e, como consequência, além da diminuição da motilidade, a degradação do DNA. A análise da estrutura da cromatina pode ser utilizada para avaliar a integridade do DNA no sêmen fresco, resfriado ou congelado (LOVE, 2005). Garanhões com elevação do número de células com DNA comprometido em sêmen fresco, também apresentam uma taxa acelerada na queda da qualidade do DNA quando o sêmen é resfriado ou congelado (LOVE *et al.*, 2002).

A estrutura da cromatina é sensível à desnaturação por elevação da temperatura. Ao submeter o sêmen coletado diretamente do testículo, do epidídimo, da *rete testis* ou do ejaculado a temperaturas crescentes que variam de 22 a 100°C, a desnaturação térmica é capaz de induzir a fragmentação da cromatina de espermatozoides de morfologia normal ou anormal, principalmente naquelas células mais imaturas. Não somente o DNA de células de morfologia irregular tem uma menor resistência ao calor, mas muitos espermatozoides normais de doadores subférteis também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu DNA, sendo que a sensibilidade da cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade (EVENSON, 1980).

2.11.4 INTEGRIDADE DE ACROSSOMA

O acrossoma constitui-se, tanto na membrana interna como externa, em um carreador de proteínas adquiridas durante a formação e maturação, imprescindíveis para a interação do espermatozoide-zona pelúcida, reação acrossômica, fusão e penetração no oócito. As principais alterações acrossomais incluem capacitação prematura e ausência da membrana acrossomal externa, sob o efeito do estresse de congelação e descongelação, que podem resultar em queda na taxa de fertilidade (THUNDTHIL *et al.*, 1999)

O isotiocianato de fluoresceína (FIT) é um corante fluorescente que tem afinidade por carboidratos presentes na membrana acrossomal externa, sendo usado para identificar espermatozoides que já iniciaram a reação acrossômica. Variando conforme a espécie, é adicionado a aglutinina do *Pisum sativum* (ervilha verde; PSA) ou da *Arachis hypogaea* (amendoim; PNA), sendo que estes fluocromos, quando conjugados com o FIT, possibilitam a visualização da reação e coloração do acrossoma em verde amarelado (SILVA e GADELLA, 2006; MOCÉ e GRAHAM, 2008; ARRUDA *et al.*, 2007). A PSA liga-se a glicoproteínas da matriz acrossomal (α -manose e α -galactose) e a PNA da membrana externa do acrossomo (β - galactose), sendo eu estas aglutininas também pode ligar-se não-especificamente a determinados componentes da membrana plasmática. Em equinos, a FITC-PSA é mais utilizada por ter maior afinidade por glicoproteínas da matriz acrossomal e, portanto maior acurácia, em comparação a PNA, que possui tendência à ligação a componentes não específicos.

3 ARTIGO 01

Cushioned and Single Layer Centrifugation improve epididymal stallion sperm motility postcentrifugation

Fernanda Carlini Cunha dos Santos^{a*}, Jane M. Morrell^b, Bruna da Rosa Curcio^c, Márcio Menezes Nunes^d, Eduardo Malschitzky^{a,e}

^a Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

^c Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Luterana (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

Artigo publicado na Journal of Equine Veterinary Science, v.57, p56-60, 2017.

Abstract

Traumatic injuries and sudden death can prematurely end the breeding career of a stallion. In such cases, a final spermatozoa collection can be obtained by harvesting the cauda epididymis. Semen samples can then be used for fresh artificial insemination or cryopreserved. Centrifugation is a critical point of sperm cryopreservation processing and can be detrimental to spermatozoa. Colloid centrifugation approaches reduce this physical damage and can be used to select better quality sperm. The aim of this research was to determine the effect of cushioned and single layer centrifugation (SLC) on epididymal stallion sperm motility postcentrifugation. Eight stallions were submitted to bilateral orchiectomy and the resulting epididymal cauda (n = 16) were flushed with semen extender. After harvesting, the samples were submitted to three centrifugation protocols: conventional (20 minutes at 600xg), cushioned (20 minutes at 900xg), and SLC (20 minutes at 300xg). The pellets were resuspended and sperm parameters were evaluated. Sperm morphology was evaluated under a phase-contrast microscope, total motility (TM) and progressive motility (PM) were evaluated with computer-assisted semen analyses. The proportion of morphologically normal spermatozoa was 72.2% for SLC, 72% for cushioned, and 67% for conventional ($P >.05$). After conventional centrifugation, it was recorded a TM of 7.4% and PM of 2.7%. After cushioned centrifugation, it was recorded a TM of 13.9% and PM of 6.5%. After SLC, it was recorded a TM of 46% and PM of 32.1%. The motility of spermatozoa recovered by SLC ($P <.05$) and cushioned centrifugation ($P >.05$) were higher than those recovered by conventional centrifugation. Colloids, including cushioned and SLC, improved epididymal stallion sperm motility postcentrifugation.

Keywords: colloid, equine, spermatozoa, sperm selection.

1. Introduction

The stallion's reproductive life may end prematurely in case of unforeseen catastrophic injury, sudden death, or emergency orchiectomy. The cauda of the epididymis is source of mature spermatozoa, where they are present in a metabolic quiescent state to prevent premature activation (Sostaric

et al., 2008; Caballero et al., 2011). Stallion sperm spermatozoa capable of fertilization can be harvested from the cauda epididymis and be used for artificial insemination (Barker & Gandier, 1957) of a limited number of mares, or for cryopreservation, being the last chance to obtain viable doses from a valuable stallion.

The most efficient technique for collection of equine epididymal spermatozoa is retrograde flushing of the epididymal cauda (Tiplady et al., 2002), which allows the recovery of up to 15–20 billion sperm cells (Bruemmer et al., 2002). After flushing with cooling extender, the spermatozoa are centrifuged to obtain a usable sperm concentration. Conventional centrifugation is not an innocuous process to spermatozoa and can cause detrimental effects on sperm functions (Jager et al., 1996) and loss of spermatozoa, being considered a critical point during semen processing. Spermatozoa must be centrifuged under carefully defined conditions to minimize the damage and to maximize the recovery of viable and motile cells (Matás et al., 2007). Centrifugation with colloids is an alternative to conventional centrifugation.

Cushioned centrifugation using a high molecular weight colloid, protects the spermatozoa from high force centrifugation and ensure maximum sperm recovery while minimizing physical damage (Revell et al., 2002), besides avoiding the high packing of the pellet. The single layer centrifugation (SLC) method, using a less dense colloid that cushion centrifugation, was shown to select the most motile spermatozoa (Morrell et al., 2008; Morrell, 2011), with normal morphology, intact plasma membranes and good chromatin integrity from the rest of the ejaculate (Morrell et al., 2009c, Johannisson et al., 2009). These spermatozoa form a pellet in the bottom of the tube, while dead cells, with abnormal morphology, with organelles lesions, bacteria and contaminants are located in the supernatant that will be discarded (Morrell et al., 2009c), thus improving the quality of the sample. The SLC method of sperm selection is based on the size and density of spermatozoa; because these parameters change during epididymal maturation, it may be possible to use this protocol to select mature epididymal spermatozoa in a similar manner to ejaculated samples.

Comparative studies with colloid centrifugation of epididymal stallion sperm have not been investigated previously. Therefore, the aim of this

research was to determine whether cushioned and SLC could improve epididymal stallion sperm motility compared to conventional centrifugation.

2. Material and Methods

2.1. Animals and Epididymal Collection

Eight Crioulo horses, aged 4 years, were submitted to elective bilateral orchiectomy. The procedure was performed under general anesthesia (xylazine hydrochloride 1.1 mg/kg, cetamine 3 mg/kg, and diazepam 0.1 m/kg intravenously) and local anesthesia (lidocaine hydrochloride 2% with epinephrine) in the spermatic cord and scrotum skin. The deferent duct was tied with nonabsorbable wire, the testicles and epididymis were immersed in ringer lactate and transported for 12 hours at 5°C.

2.2. Epididymal Sperm Processing

The testis and epididymis (n = 16) were washed with ringer lactate and the cauda of epididymis was separated from the testis. The connective tissue was carefully dissected, to allow the passage of the flushing extender, and the cauda was straightened. A pipette tip was attached to a 10-mL syringe, then syringe was attached to the deferent ductus and sperm harvesting was performed by a retrograde flushing technique (Garde et al., 1994; Bruemmer et al., 2006) with skim milk– based extender (Kenney et al., 1975).

The semen samples were submitted to different centrifugation protocols: conventional (20 minutes at 600xg), cushioned (CushionFluid, Minitub, Tiefenbach, Germany) (20 minutes at 900xg), and SLC (Androcoll, Minitub, Tiefenbach, Germany) (20 minutes at 300xg). The supernatant was discarded, the pellet was resuspended and the sample was submitted to sperm analyses (Figure 7).

2.3. Sperm Analyses

Sperm concentration was measured by computer assisted semen analyses (CASA; AndroVision, Minitub, Tiefenbach, Germany) and total sperm count was calculated from volume and sperm concentration. Before centrifugation, sperm concentration was adjusted to 50×10^6 spz/mL. Recovery

rate was calculated by dividing the postcentrifugation sperm concentration by the precentrifugation sperm concentration and multiplying by 100.

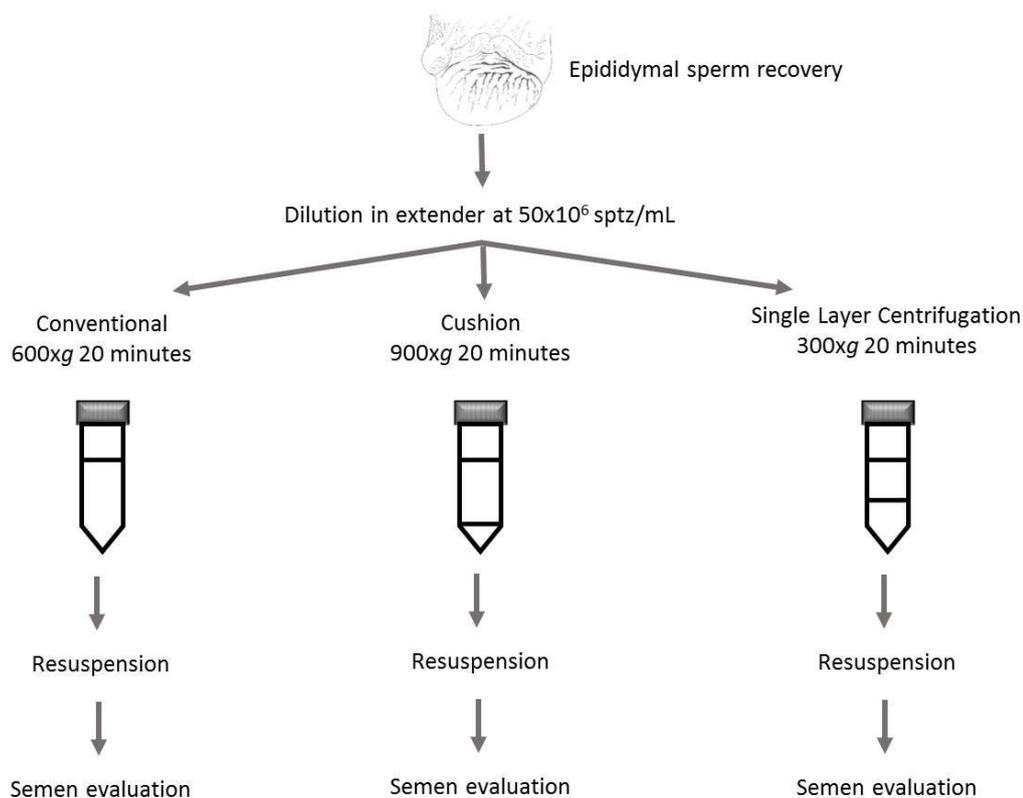


Figure 7. Schematic presentation of the processing of stallion epididymal sperm with conventional, cushioned, and single layer centrifugation.

The percentage of total motility (TM) and progressive motility (PM) was evaluated by CASA. For analysis, 30 frames per field were evaluated and six fields per sample with approximately 100 cells per field. To select spermatozoa from other cells and contaminants, the position of the sperm heads is recognized by the camera in successive frames.

Spermatozoa with an amplitude of lateral head displacement (ALH) < 4 and beat-cross frequency (BCF) < 4 were considered immotile. Those with a radius > 10 , radius < 60 and rotation > 0.7 were considered to have circular motility. Those with a curvilinear velocity (VCL) < 120 were considered as slow, motile. Those with VCL < 40 and progressive velocity (VSL) < 10 were considered locally motility.

Sperm morphology was evaluated in an unstained wet mount preparation with semen fixed in buffered formol saline. One hundred spermatozoa were

checked for morphologic alterations under a phase-contrast microscopy (BX 41 Olympus América, Inc, São Paulo, SP, Brazil) at 1000x magnification with oil immersion. Evaluation of sperm morphology was performed as described for equine spermatozoa (Einarsson et al., 2009).

2.4. Statistical Analyses

Data was evaluated by descriptive statistics, simple one-way ANOVA and comparison between means by Tukey test. The program Statistix 9 (Statistix. Statistix 9 for Windows; Analytical Software, Tallahassee, FL) was used for statistical analyses. Significance was assigned to all values $P < .05$.

2.5. Ethics Committee

This experiment used animals in the experimental model and had the approval of the Institutional Research Ethics Committee of Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, by the number CEEA-9894-2014.

3. Results

Total and progressive motility are expressed in (Figure 8).

Recovery rate of conventional was 85.8%, SLC was 46.1%, and cushioned was 94.7%. The proportion of morphologically normal spermatozoa was 72.2% in SLC, 72% in cushioned, and 67% in conventional centrifugation ($P < .05$). Bent tail (9.5%, 7.5%, and 16.4%), coiled tail (8%, 12%, and 7.4%), and cytoplasmic proximal droplet (7.7%, 5.2%, and 5.5%) were the main defects observed in SLC, cushioned, and conventional centrifugation ($P < .05$), respectively.

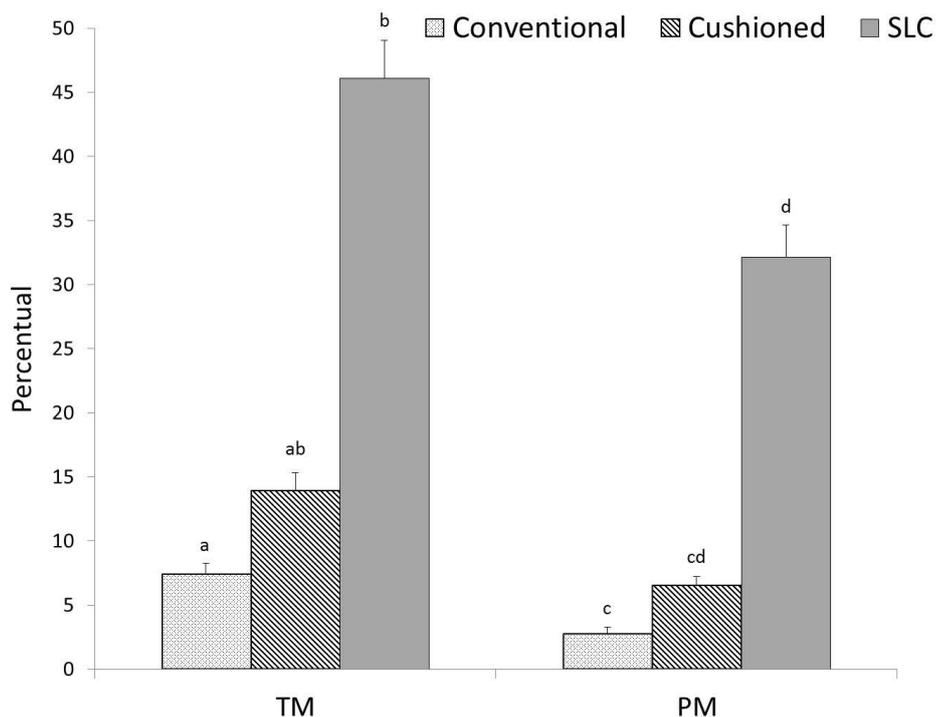


Figure 8. Total motility and PM (\pm SEM) of epididymal stallion sperm after conventional, cushioned, and SLC. *Lowercase letters indicate statistical difference between centrifugation protocols ($P < .05$). PM, progressive motility; TM, total motility; SLC, single layer centrifugation.

SLC presented the highest TM (46%) and PM (31.1%), followed by cushioned (TM 13.9% and PM 6.5%) and conventional (TM 7.4% and PM 2.7%).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of cushioned and SLC on epididymal stallion sperm parameters. Samples submitted to SLC presented the highest TM (46% \pm 0.9) and PM (32.1% \pm 0.9), followed by cushioned TM (13.9% \pm 1.4) and PM (6.5% \pm 0.7) and conventional centrifugation TM (7.4% \pm 0.8) and PM (2.7% \pm 0.5).

Spermatozoa, once differentiated in the testis, remain quiescent in the high viscosity epididymal fluids until they are released by ejaculation. Dilution of the epididymal fluid surrounding the spermatozoa with semen extender allows the initiation of sperm motility and metabolism (Turner & Reich, 1985). Sperm motility is the parameter most frequently used to assess stallion semen quality,

to measure sperm viability in the ejaculate and during/after any handling and preservation procedure, including refrigeration and even cryopreservation (Tejerina et al., 2009). Motility parameters of epididymal sperm improved considerably after centrifugation and the addition of extender in all groups. Motility in SLC group was significantly higher and it is associated with the selection of a subpopulation of motile sperm collected from stallion epididymis. Single layer centrifugation has been used successfully for selecting good quality spermatozoa from stallion ejaculates (Macías García et al., 2009; Morrell et al., 2009c; Morrell. 2011; Hoogewijs et al., 2012)

Because of the method of harvest, epididymal sperm are inevitably contaminated with epithelial cells, erythrocytes, leukocytes, bacteria, and cell debris. Samples of cat epididymal sperm submitted to SLC presented less red blood cell contamination, higher intact membrane, higher normal morphology, and higher motile spermatozoa cells, when compared with unselected samples (Chatdarong et al., 2010). In the case for most wild endangered species, the epididymis of dead animals (e.g., animals that have been found dead, shot by hunters or poachers, or that require euthanasia in zoological collections) can be used as a source of spermatozoa and genetic bank material. However, samples obtained this way are compromised, because they carry contaminant cells in a proportion that is much higher than in ejaculates and it induce cellular damage to the higher release of reactive oxygen species. In gray wolfs, SLC was successfully used to separate epididymal spermatozoa from contaminating diploid cells and debris in epididymal samples harvested from carcasses. In this specie, epididymal sperm samples are in short supply and all the sperm is used for the extraction of DNA, thus samples free of somatic cells are a great interest (Muñoz-Fuentes et al., 2014).

After SLC, the supernatant and interface contained cell debris and defective supernatant, whereas the resuspended pellet contained spermatozoa practically free of cell debris, red blood cells, and unidentified particles. In ejaculates, SLC selects good quality spermatozoa and removes cellular debris and pathogens that may be present in the seminal plasma (Morrell 2011). In the present study, by visual inspection under the microscope, fewer contaminants were still present in epididymal samples after SLC.

In accordance with the present study, red deer sperm samples selected with SLC also showed an improvement in sperm kinematics (TM and PM). In this context, SLC becomes especially interesting because its use is much easier than other methods, such as swim up or density gradients with more layers, and this could become an important tool in preparation and handling of sperm for reproductive techniques, including cryopreservation, in vitro fertilization, artificial insemination, or sperm sex sorting (Anel-López et al., 2015).

On the other hand, it is reported no significant differences of TM, viable acrosome-intact spermatozoa and DNA fragmentation index of stallion sperm submitted to simple dilution (no centrifugation), cushioned and SLC before sexsorting process (Mari et al., 2015). Similar to a previous study (Gibb et al., 2013), these results suggest that cushioned and SLC cannot select a sperm population that are more resistant to the sorting and freezing procedure.

Investigations regarding cushioned centrifugation of stallion semen demonstrated excellent yields of sperm that were undamaged by the centrifugation process and reduction of sperm losses in the supernatant (Ecot et al., 2005; Knop et al., 2005; Sieme et al., 2006).

In the present study, cushioned centrifugation resulted in higher recovery rates of spermatozoa, attributed to the higher centrifugation velocity; higher motility, attributed to the softness in the bottom of the tube and no pellet packing, when compared with conventional centrifugation. Because of the colloid method of action (sperm selection), the recovery rate of SLC samples are usually lower than the other centrifugation protocols, but with better quality spermatozoa. From our results, the best method to obtain a sample with higher motility is by SLC, whereas cushioned centrifugation provides a greater number of cells, and both methods presented better quality spermatozoa than in conventional centrifugation. These findings should be taking into consideration when processing epididymal stallion sperm, because it is the last chance to obtain spermatozoa samples from stallions whose reproductive life ended prematurely.

5. Conclusions

Centrifugation with colloids is a viable alternative to improve epididymal stallion sperm motility. The motility of the sperm samples from different centrifugation protocols was ranked SLC > cushioned > conventional.

Acknowledgments

The authors thank the Cabanha do Parque farm, for providing the animals for the experiment; and Minitube do Brasil, for providing the material and staff support.

4 ARTIGO 02

Pre-freezing and post-thawed epididymal stallion spermatozoa quality can be improved with Single Layer Centrifugation

Fernanda Carlini Cunha dos Santos^{a*}, Jane M. Morrell^b, Carlos Eduardo Wayne Nogueira^c, Bruna da Rosa Curcio^c, Márcio Menezes Nunes^d, Eduardo Malschitzky^{a,e}

^a Programa de Pós Graduação Medicina Animal: Equinos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

^c Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Luterana (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Cryopreservation of spermatozoa from cauda epididymis is the last possibility for preserving spermatozoa of valuable stallions in case of sudden death, severe injuries, orchiectomy or in endangered species. The aim of this experiment was to determine the effect of Single Layer Centrifugation (SLC) on epididymal stallion sperm quality pre-freezing and post-thawing. Ten stallions were submitted to bilateral orchiectomy and harvesting of epididymal cauda (n=20) was performed by retrograde flushing with cooling extender. For cryopreservation, epididymal sperm were submitted to: conventional centrifugation (Conventional) (20 minutes at 600xg), SLC prior cryopreservation (SLC-Pre) (20 minutes at 300xg) and SLC after cryopreservation (SLC+) (20 minutes at 600xg followed by a second centrifugation described after thawing). The pellet was resuspended in freezing extender, submitted to cryopreservation process in liquid nitrogen and thawed. Conventional and SLC-Pre were evaluated immediately after thawing. SLC+ samples were thawed, submitted to SLC (20 minutes at 300xg) and the pellet was resuspended with freezing (SLC+F) and cooling extender (SLC+C). Sperm analyses included total motility (TM), progressive motility (PM), morphology, mitochondria functionality, plasma membrane integrity and DNA integrity (expressed by mean \pm EPM). SLC+F (26.2 \pm 4) and SLC-Pre (24.6 \pm 3.6) yielded the highest TM, while SLC+F (17.5 \pm 3.8) also yielded the highest PM. Percentual morphologically normal spermatozoa were higher in SLC-Pre (73.3 \pm 2.9) and SLC+F (71.8 \pm 2.4). Mitochondrial functionality was significantly higher groups submitted to SLC. Plasma membrane integrity were higher in SLC-Pre (48.6 \pm 4). DNA integrity did no differ among treatment. Better sperm quality was obtained in SLC-Pre followed by SLC+F, demonstrating that SLC can be performed prior or after cryopreservation improving the quality of epididymal stallion sperm after thawing.

Keywords: colloid, cryopreservation, epididymides, sperm selection.

Introduction

The recovery of spermatozoa from cauda epididymis and cryopreservation are a great technological advance, as it is the last possibility

for preserving spermatozoa of valuable stallions in case of sudden death, severe injuries, orchiectomy or in endangered species, e.g. Quagga zebra (*Equus quagga*) and Przewalskii horse (*Equus ferus przewalski*)

Due to the method of harvest, epididymal sperm samples are inevitably contaminated with epithelial and red blood cells, leukocytes, bacteria, cell debris, etc. These contaminants, as well as abnormal and dead sperm, produce excessive reactive oxygen species, which affects negatively sperm quality (Nichi et al., 2007). In addition to abnormal and dead cells, whole blood appeared to reduce post-thaw quality of dog sperm (Rijsselaere et al., 2004) and *in vitro* fertilization capability in cattle (Verberckmoes et al., 2004). Bacterial contamination in the semen can induce an acrosome reaction (El Mulla et al., 1996) and impair sperm motility (Kaur et al., 1986). In order to obtain better sperm quality after thawing, these contaminants should be separated from the epididymal sperm sample.

The Single Layer Centrifugation (SLC) method improve epididymal stallion sperm motility after sperm harvesting (Santos et al., 2017). In ejaculates, SLC was shown to select the most motile spermatozoa (Morrell et al., 2008; Morrell, 2011), with normal morphology, intact plasma membranes and good chromatin integrity from the rest of the ejaculate (Morrell et al., 2009b; Johannisson et al., 2009). SLC is also capable of reducing the bacterial load in stallion semen samples although a proportion of some bacteria can accompany the spermatozoa through the colloid. (Morrell et al., 2014). The capacitation status of the spermatozoa is not affected by the colloidal centrifugation (Bergqvist et al., 2011), also motility, viability and chromatin integrity are maintained for longer period than unselected ejaculates (Johannisson et al., 2009; Morrell et al., 2010). A subpopulation of good quality sperm have been selected with SLC from fresh (Morrell et al., 2009b) and frozen stallion semen (Macías García et al., 2009). Also, Santos et al. (2017) have already proven that SLC improved epididymal stallion sperm motility postcentrifugation.

If spermatozoa recovery from the cauda of epididymis is the last chance to cryopreserve doses from a valuable stallion, to evaluate protocols that could improve sperm quality after thawing in an important point of study. In cat epididymal sperm, SLC prior and after cryopreservation has already been

proven to enhance quality, including better morphology, membrane and DNA integrity (Chatdarong et al., 2010).

Comparative studies with SLC method in pre-freezing and post-thawed epididymal stallion sperm have not been investigated previously and it is hypothesized that SLC can improve sperm quality after thawing. Therefore, the study aimed to determine: 1) whether SLC could be improve stallion epididymal sperm parameters; 2) which is the best extender to resuspend the pellet from SLC used in post-thawed epididymal stallion sperm; 3) whether SLC should be performed prior or after cryopreservation of epididymal stallion sperm.

Materials and Methods

Animals and epididymal collection

Ten stallions (seven Crioulo and three American Quarter Horse), aged 4-8 years, were submitted to elective bilateral orchiectomy. The procedure was performed under general anesthesia (xylazine hydrochloride 1.1 mg/kg, cetamine 3mg/kg, diazepam 0.1m/kg intravenously) and local anesthesia (lidocaine hydrochloride 2% with epinephrine) in the spermatic cord and in the scrotum skin. The deferent duct was tied with non-absorbable wire, the testicles and epididymis were immersed in ringer lactate and transported for 12h at 5°C.

Epididymal sperm processing

The testis and epididymis (n=20) were washed with ringer lactate and the cauda of epididymis was separated from the testis. The connective tissue was carefully dissected, to allow the passage of the flushing extender, and the cauda was straightened. A pipette tip was attached to a 10-mL syringe, then syringe was attached to the deferent ductus and sperm harvesting was performed by a retrograde flushing technique (Garde et al., 1994; Bruemmer et al., 2006) with skim milk-based extender (cooling extender) (Kenney et al., 1975).

Sperm concentration was adjusted to 50×10^6 spz/mL and samples were maintained for 20 minutes over a 37°C heated plaque before centrifugation protocols.

For processing epididymal sperm, samples were submitted to four protocols: 1) conventional centrifugation (Conventional) (20 minutes at 600xg) –

cryopreservation – thawing – sperm evaluation; 2) Single Layer Centrifugation prior cryopreservation (SLC-Pre) (20 minutes at 300xg) – cryopreservation – thawing – sperm evaluation; 3) Conventional centrifugation (20 minutes at 600xg) – cryopreservation – thawing – SLC (20 minutes at 300xg) – resuspension in freezing extender (SLC+F) – semen evaluation; 4) Conventional centrifugation (20 minutes at 600xg) – cryopreservation – thawing – SLC (20 minutes at 300xg) – resuspension in cooling extender (SLC+C) – semen evaluation (Figure 9).

SLC was performed with Androcoll® (Minitub, Tiefenbach, Germany) according to methodology described by Morrell and Rodriguez-Martinez (2009).

For cryopreservation, supernatant was removed and the pellet was resuspended in a freezing egg yolk-based extender (freezing extender) (BotuCrio®, Botupharma, Botucatu, Brazil) at a final concentration of 100×10^6 spermatozoa/mL. Semen samples were packed into 0.5 mL straws, equilibrated for 20 minutes at 5°C and maintained for 20 minutes above 6 cm of liquid nitrogen. Finally, straws were completely plunged in it and stored in liquid nitrogen at -196°C until analysis. Thawing was performed by immersion of the straws in a water bath at 37°C for 30 seconds.

Sperm analyses

Sperm concentration was measured by computer assisted semen analyses (CASA; AndroVision, Minitub, Tiefenbach, Germany) and total sperm count was calculated from volume and sperm concentration. Before centrifugation, sperm concentration was adjusted to 50×10^6 sptz/mL. Recovery rate was calculated by dividing the postcentrifugation sperm concentration by the precentrifugation sperm concentration and multiplying by 100, in Conventional and SLC-Pre.

Semen samples were analyzed after thawing (Conventional and SLC-Pre), after thawing and resuspension with freezing (SLC+F) and cooling (SLC+C) extender. All samples were kept for 10 minutes in a water bath at 37°C before sperm analyses.

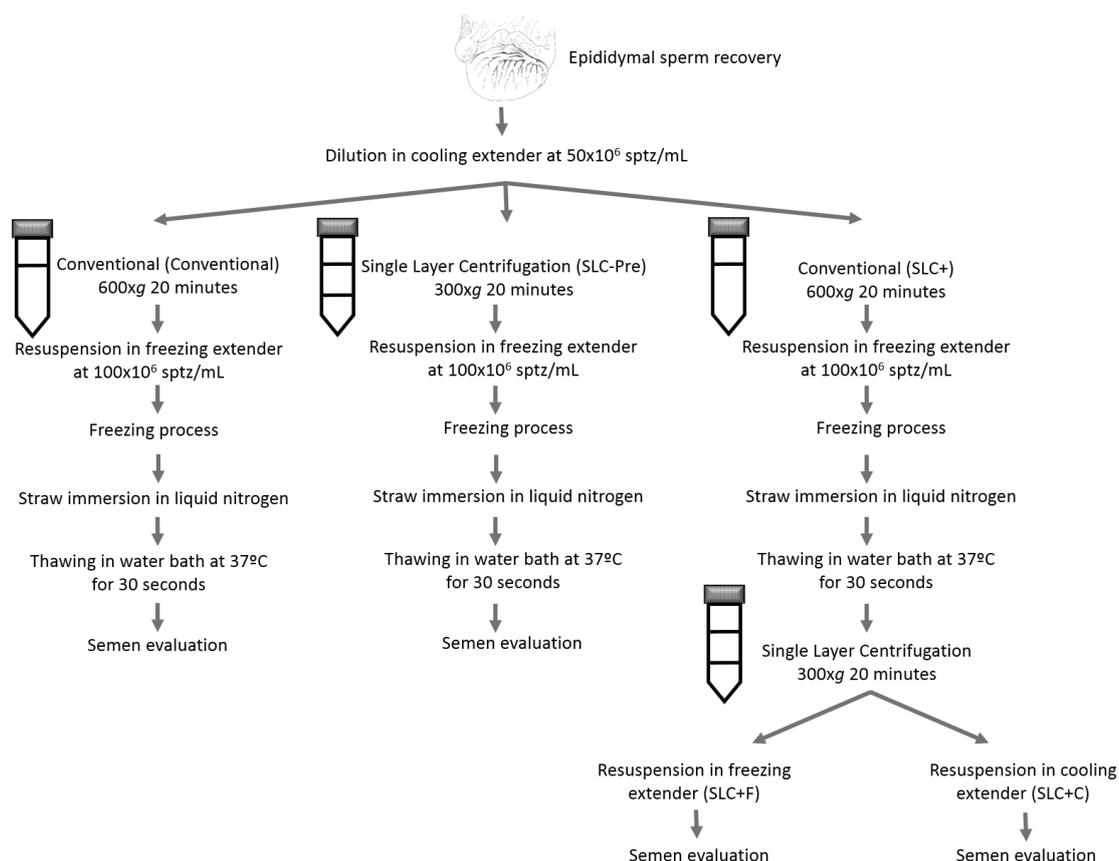


Figure 9. Schematic presentation of the processing of stallion epididymal sperm with Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

The percentage of total motility (TM) and progressive motility (PM) was evaluated by Computer Assisted Semen Analyses (CASA; AndroVision, Minitub, Tiefenbach, Germany). Spermatozoa with an amplitude of lateral head displacement (ALH) < 4 and beat-cross frequency (BCF) < 4 was considered immotile. Those with a radius > 10, radius < 60 and rotation > 0.7 was considered to have circular motility. Those with a curvilinear velocity (VCL) < 120 was considered as slow, motile. Those with VCL < 40 and progressive velocity (VSL) < 10 were considered locally motility. For analysis, 30 frames per field were evaluated and six fields per sample with approximately 100 cells per field. To select spermatozoa from other cells and contaminants, the position of the sperm head is recognized by the camera in successive frames.

Sperm morphology was evaluated by examining wet mount preparation of unstained samples fixed in buffered-formol saline. One hundred spermatozoa were checked for morphologic alterations under a phase-contrast microscopy

(BX 41 Olympus América, Inc, São Paulo, SP, Brazil) at 1000x magnification with oil immersion. Evaluation of sperm morphology was performed as described for equine spermatozoa (Einarsson et al., 2008).

Contaminants were estimated by visual inspection under the microscope in different areas per lamina, before and after SLC.

Mitochondrial functionality was performed by staining the cells with Rhodamine 123. The presence of an intense green accumulation in the intermediate piece of spermatozoa was considered as intact mitochondrial functionality and mat green as damaged functionality (Grasa et al., 2004).

Plasma membrane integrity was evaluated using the fluorescent probes carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, according the methodology described by Harrison and Vickers (1990). Green fluorescence was associated to intact membrane while red fluorescence was associated to damaged membrane, respectively.

DNA integrity was evaluated using acridine orange protocol. Acridine orange fluoresces green on normal double stranded DNA and fluoresces red on single-stranded, denatured DNA, respectively (Bencharif et al., 2008).

Mitochondrial functionality, plasma membrane and DNA integrity were analyzed in an epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Axiolab, Germany) at 1000x magnification, in 10 different areas of the lamina and 100 spermatid cells were counted (expressed in %).

Statistical analysis

Data were evaluated by descriptive statistics, simple test one-way (ANOVA) and comparison between means by Tukey test. The program Statistix 9 (Statistix. Statistix 9 for Windows; Analytical Software, Tallahassee, FL) was used for statistical analysis. Significance was assigned to all values $P < .05$.

Ethics Committee

This experiment used animals in the experimental model and had the approval of the Institutional Research Ethics Committee of Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, by the number CEEA-9894-2014.

Results

Total and progressive motility are in Figure 10 and 11.

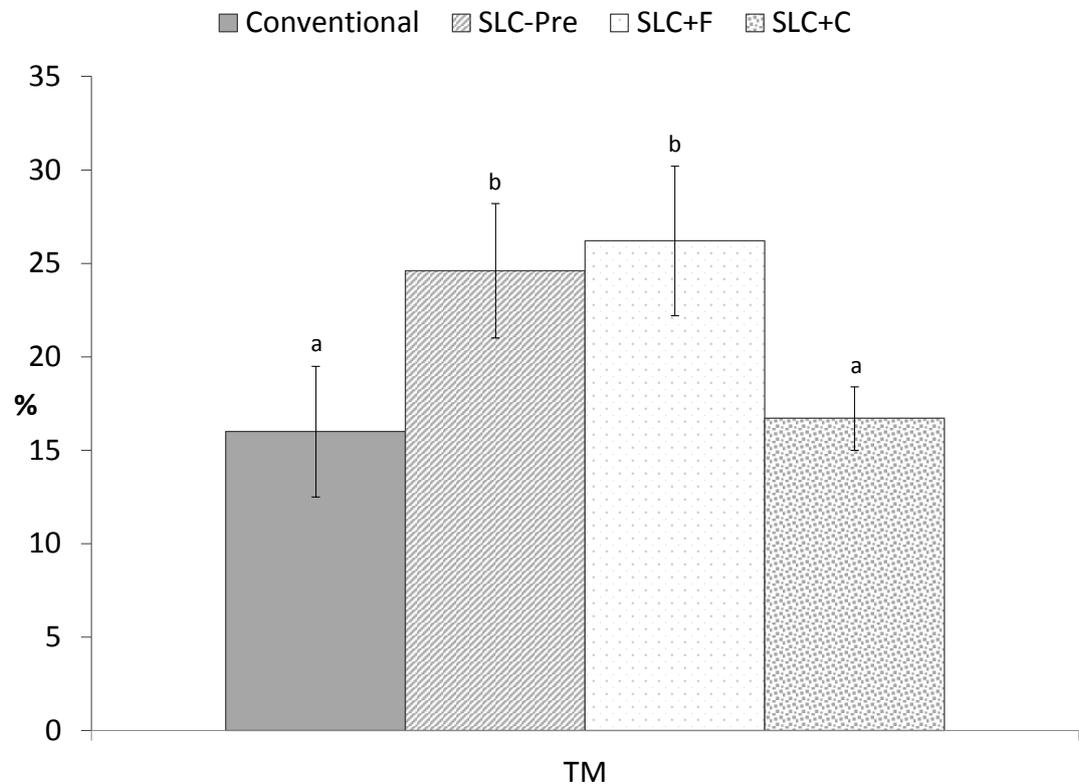


Figure 10. Total motility (TM) of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

* Different letters indicate statistical difference between treatments ($p < 0.05$)
 Conventional – conventional centrifugation prior cryopreservation
 SLC-Pre – Single Layer Centrifugation prior cryopreservation
 SLC+F – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in freezing extender
 SLC+C – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in cooling extender

SLC+F (26.2 ± 4) and SLC-Pre (24.6 ± 3.6) yielded the highest TM.

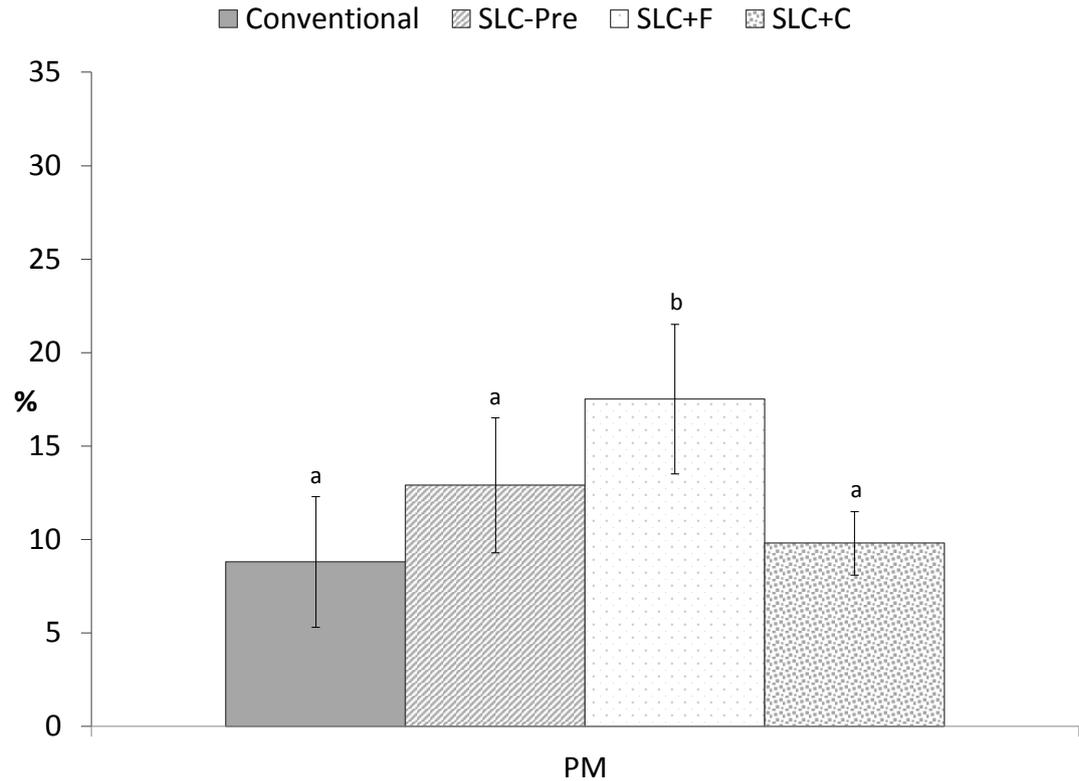


Figure 11. Progressive motility (PM) of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

* Different letters indicate statistical difference between treatments ($p < 0.05$)
 Conventional – conventional centrifugation prior cryopreservation
 SLC-Pre – Single Layer Centrifugation prior cryopreservation
 SLC+F – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in freezing extender
 SLC+C – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in cooling extender

SLC+F (17.5 ± 3.8) also yielded the highest PM.

Mitochondrial functionality is shown in Figure 12.

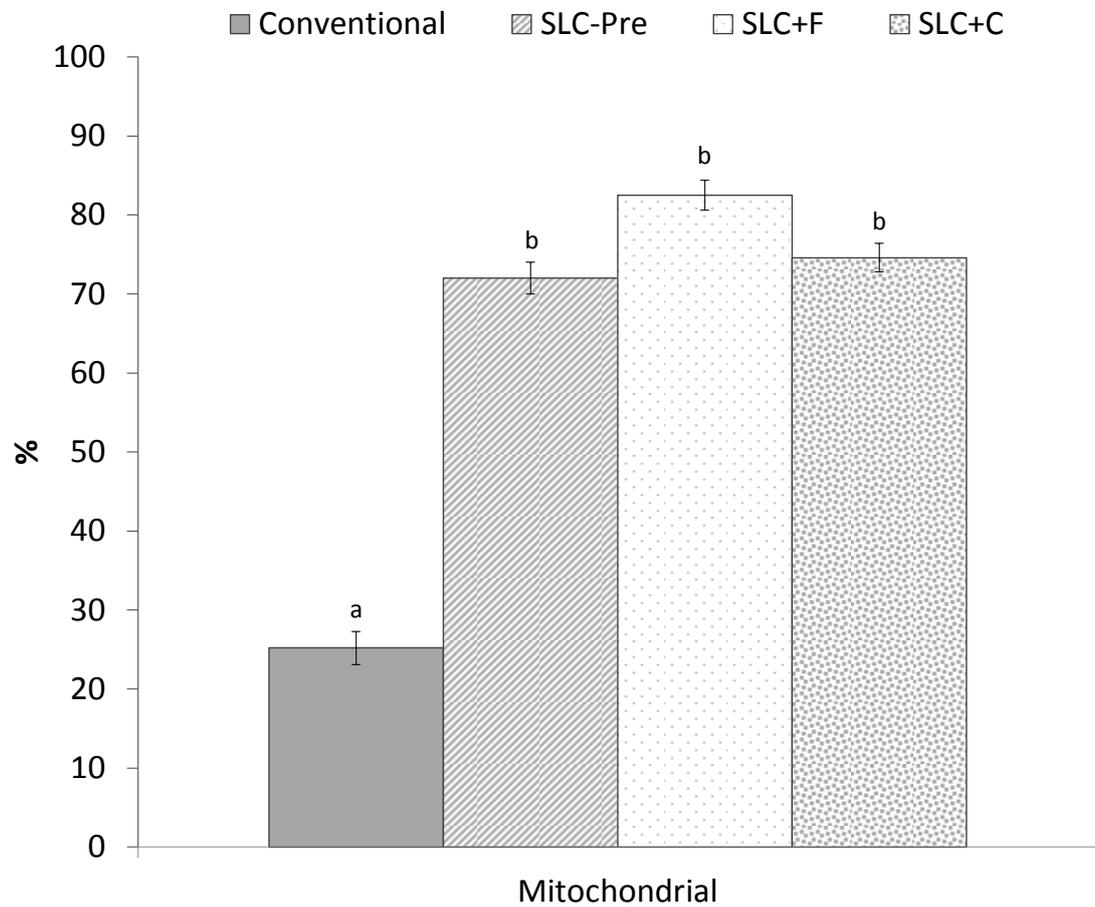


Figure 12. Mitochondrial functionality of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

* Different letters indicate statistical difference between treatments ($p < 0.05$)

Conventional – conventional centrifugation prior cryopreservation

SLC-Pre – Single Layer Centrifugation prior cryopreservation

SLC+F – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in freezing extender

SLC+C – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in cooling extender

Mitochondrial functionality was significantly higher in all groups submitted to SLC, including prior cryopreservation and after thawing.

Plasma membrane integrity is expressed in Figure 13.

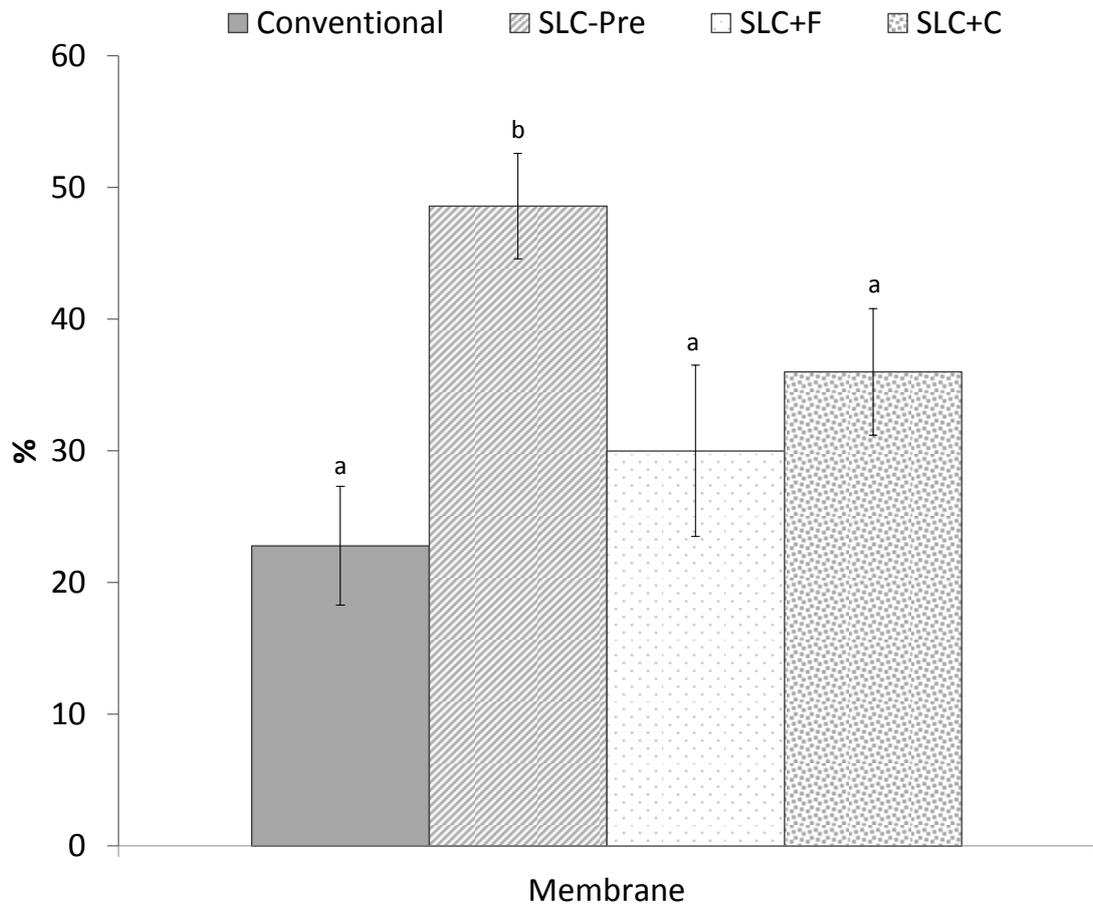


Figure 13. Plasma membrane integrity of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

* Different letters indicate statistical difference between treatments ($p < 0.05$)

Conventional – conventional centrifugation prior cryopreservation

SLC-Pre – Single Layer Centrifugation prior cryopreservation

SLC+F – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in freezing extender

SLC+C – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in cooling extender

Plasma membrane integrity was higher in SLC-Pre (48.6 ± 4) than in other treatments.

DNA integrity is in Figure 14.

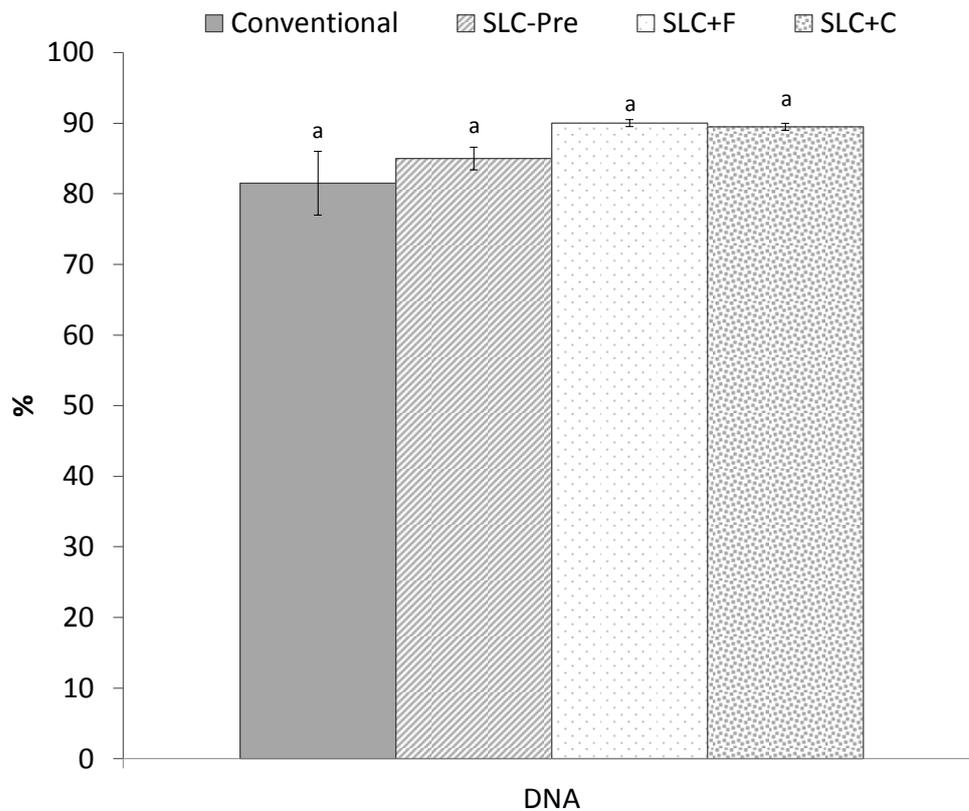


Figure 14. DNA integrity of epididymal stallion sperm after Conventional, Single Layer Centrifugation pre-freezing and post-thawed.

* Different letters indicate statistical difference between treatments ($p < 0.05$)
 Conventional – conventional centrifugation prior cryopreservation
 SLC-Pre – Single Layer Centrifugation prior cryopreservation
 SLC+F – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in freezing extender
 SLC+C – Single Layer Centrifugation after cryopreservation and resuspension in cooling extender

No difference was observed in DNA integrity between treatments ($p > 0.05$).

The recovery rate of conventional was 84.5% and SLC-Pre was 47.6%. The proportion of morphologically normal spermatozoa were higher in SLC-Pre (73.3 ± 2.9) and SLC+F (71.8 ± 2.4) than in SLC+C (58.8 ± 4.6) and conventional (55 ± 4.3).

Coiled tail (10.4; 11.4; 7.9 and 12.3%), cytoplasmic proximal droplet (8.8; 7.5; 7 and 6.1%), bent tail (7; 5.2; 5.2 and 5.5%), cytoplasmic distal droplet (7.2; 3.9; 5.8 and 2.4%), were the main defects observed in Conventional, SLC-Pre, SLC+F and SLC+C, respectively ($p > 0.05$).

Discussion

The use of SLC just after harvesting has already been proven to enhance epididymal sperm motility in stallions (Santos et al., 2017). Epididymal stallion samples presented higher TM and PM after SLC when compared to conventional centrifugation and it was associated with the selection of a subpopulation of motile sperm collected from stallion epididymis (Santos et al., 2017).

The most frequently parameter used to evaluate stallion sperm quality and sperm viability during handling and preservation procedures is motility (Tejerina et al., 2009). In the present study, SLC+F and SLC-Pre yielded the highest TM, while SLC+F also yielded the highest PM. SLC-Pre also showed high values of plasma membrane and DNA integrity, mitochondrial functionality and normal morphology.

If the professional will be performing the cryopreservation procedure, better sperm quality, regarding motility, organelles integrity and sperm morphology, can be obtained with sperm selection prior cryopreservation (SLC-Pre).

If the professional will only be receiving the frozen straws (when the professional was not the same that had the samples frozen) and after thawing the sperm quality is suboptimal, sperm selection can also be performed after cryopreservation with good results. Resuspension of the pellet was best performed with the same freezing extender (SLC+F), rather than cooling extender (SLC+C), probably due to less osmotic shock. Treatments with SLC presented better epididymal sperm quality when compared to only conventional freezing-thawing protocols in stallions.

According to Alvarenga et al. (2016), epididymal stallion semen may be recovered by washing the tail of the epididymis with the same extender used for cryopreservation (15–20 mL), or by washing with the extender used for centrifugation. These authors reported no differences on postthaw sperm quality when flushing straight with the freezing extender or flushing with milk extender and the centrifugation step. Ellerbrock et al. (2017) also found no differences in total and progressive sperm motility, viability, mitochondrial potential, acrosome integrity, and chromatin stability between the groups collected with cooling extender (+ centrifugation) and with freezing extender (no centrifugation). The

conclusion was that although centrifugation does not appear to be detrimental to epididymal sperm, it also does not seem necessary for semen processing.

In the present study, SLC was able to improve epididymal sperm parameters, being this procedure recommended during sperm centrifugation, either before freezing or after thawing. If the professional is going to harvest the epididymis with cooling extender, the centrifugation process is best obtain with SLC. If the professional is going to harvest the epididymis directly with freezing extender, the centrifugation step is not required, but SLC can still be performed after thawing if the sperm quality is suboptimal.

Due to the method of harvest, epididymal sperm are inevitably contaminated with epithelial cells, erythrocytes, leukocytes, bacteria and cell debris. Samples of cat epididymal sperm submitted to SLC presented less red blood cell contamination, higher intact membrane, higher normal morphology and higher motile spermatozoa cells, when compared to unselected samples (Chatdarong et al., 2010). In gray wolfs, SLC was successfully used to separate epididymal spermatozoa from contaminating diploid cells and debris in epididymal samples harvested from carcasses (Muñoz-Fuentes et al., 2014). In the present study, as expected, samples submitted to SLC both prior cryopreservation and after thawing presented lower contamination by visual inspection under the microscope, when compared to unselected samples.

Percentual morphologically normal sperm was higher in SLC-Pre and SLC+F. Defective sperm have been found in association with an overproduction of reactive species of oxygen that could further damage the overall population of spermatozoa cells (Aziz et al., 2004). In accordance to the present study, Tipkantha et al. (2016) found clouded leopard that the percentage of normal morphological sperm was higher in the SLC group than that in the control group postthaw. For boar (Martinez-Alborcia et al., 2012) and donkey (Ortiz et al., 2015) semen it has been suggested that elimination of the poor quality sperm subpopulation before freezing improves the freezability of the remaining sperm.

Parameters of sperm quality tend to reduce after cryopreservation process. Temperature changes occur during semen preservation protocol, although this is not a biological phenomenon to which the sperm cell is adapted. Spermatozoa cooling and freezing methods are well known for the production of deleterious effects on sperm survival and consequently, lower conception rates

following artificial insemination (Ritar and Salamon, 1982; Parks and Graham, 1992; Holt, 2000). The reduction in fertilizing capacity has typically been attributed to a reduced rate of sperm motility and the induced cryopathological induction of morphological abnormalities such as damaged plasma membrane (Parks and Graham, 1992). Previous studies showed that freezing-thawing protocols damage the spermatozoa, especially in the membranes (plasma and organelle membrane), in red deer (Esteso et al., 2003) and in boar (Peña et al., 2003). The results of our study showed that SLC-Pre significantly improved the percentage of live sperm with intact membrane. Therefore both groups with SLC just after thawing presented higher values of plasma membrane integrity when compared to conventional centrifugation.

Mitochondrial activity was strongly improved by the sperm selection before cryopreservation and after thawing, including all groups with SLC, when compared to conventional centrifugation. Mitochondria are an essential organelle of the spermatozoa and it is considered as being one of the structures in the spermatozoa most sensitive to cold shock (Ortega-Ferrusola et al., 2008). Motility was previously shown to be related to mitochondrial activity (Paoli et al., 2011) and in humans samples it is considered a marker for fertilizing potential (Gallon et al., 2006).

The DNA integrity revealed similar high values (all $\geq 80\%$) for selected and unselected samples, with no difference between treatments. These finding has been observed in other species (Jiménez-Rabadán et al., 2012; Anel-Lopez et al., 2015) and could be related to the degree of chromatin condensation which provides protection and maintenance of DNA integrity, being spermatozoa more resistant to changes and environmental stress (Perreault et al., 1988). In both bull and stallion spermatozoa, almost all the DNA is packaged by protamine, and this could be one of the reasons for the relative insensitivity to sorting damage of the chromatin in these species compared with human spermatozoa (Bench et al., 1996; Gardiner-Garden, 1999).

SLC is a simple procedure that can be performed prior or after cryopreservation that enhanced epididymal stallion sperm quality, being this moment the last chance to obtain spermatozoa from valuable stallions in the face of unforeseen events.

Conclusion

Our hypothesis was confirmed and treatments with SLC improved sperm quality after thawing. SLC can be performed prior or after cryopreservation as an alternative to improve stallion epididymal sperm parameters after thawing. Epididymal semen submitted to SLC after thawing is best extended with freezing extender when compared to cooling extender.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A centrifugação de sêmen coletado da cauda do epidídimo de garanhões com coloides é uma alternativa viável para melhorar a qualidade espermática.

A centrifugação com cushion ou com SLC antes da etapa de congelamento resultou em melhora na motilidade espermática, tanto total como progressiva, quando comparado à centrifugação convencional.

O uso de SLC prévio a etapa de congelamento ou imediatamente após o descongelamento resultou em melhora na motilidade total e progressiva, morfologia espermática, funcionalidade de mitocôndria e integridade de membrana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, A.; SOON-CHYE N. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **The Journal of Experimental Zoology**. v.284, n.6, p.696-704, 1999.

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. 1294 p.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap.10, p. 583-595.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; NETO, C.R. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.32, n.3, p.521-530, 2016.

ANEL-LÓPEZ. L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; SOLER, A.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARDEA, J.J.; MORRELL, J.M. Use of Androcoll-S after thawing improves the quality of electroejaculated and epididymal sperm samples from red deer. **Animal Reproduction Science**, v.158, p.68–74, 2015.

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p.715-745.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p.715-745.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2011. p.1053-1084.

AMANN R, KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

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

AMANN, R.P.; THOMPSON, D.L.JR.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal reserves in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.1–6, 1979.

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

ANGOLA, A.P.; MENDEZ, J.V.; QUINTERO, L.Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y La motilidad pos descongelación del semen equino. **Veterinária Mexico XXIII**, v.44, p.315-318, 1992.

ANJA, S.; LOVE, C.; BALL, B.A. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved-Thawed Equine Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.7, p.547-551, 2013.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.253-256, 2002.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n.1-4, p. 65-75, 2005.

AZIZ, N.; SALEH, R.A.; SHARMA, R.K.; LEWIS-JONES, I.; ESFANDIARI, N.; THOMAS, J.R.A.J.; AGARWAL, A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility and Sterility**, v.81, p.349–54, 2004.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v.10, n.1, p.49–62, 2009.

BARKER, C.A.; GANDIER, S.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.21, n.2, p.47-51, 1957.

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN, Y.; VAN DYK, G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**, v.53, p.325, 2000.

BAZER, F.W.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo. 1995. p.191-216.

BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, n.11, p.2187-2199, 1994.

BENCH, G.S.; FRIZ, A.M.; CORZETT, M.H.; MORSE, D.H.; BALHORN, R. DNA and **total** protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. **Cytometry**, v.23, p. 263–271, 1996.

BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUERIN, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, n.5, p.1023-1028, 2003.

BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M.L.; BARRIERE, P.; LARRAT, M.; TAINTURIE, D. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v.70, n.9, p.1478–1488, 2008.

BERGQVIST, A.S.; JOHANNISSON, A.; BÄCKGREN, L.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MORRELL, J.M. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa through Androcoll-E does not adversely affect their

capacitation-like status, as measured by CTC-staining. **Reproduction of Domestic Animals**, v.46. p.74–78, 2011.

BIELASNKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, sup.27, p.39-45, 1979.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.25, n.7, p.383-391, 1973.

BLOM, E. Sperm morphology with reference to bull infertility. In: **First All India Symposium Animal Reproduction**, p.61-81, 1977.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.303-314, 2011.

BRUEMMER, J.E. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.22, n.3, p.677-682, 2006.

BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, n., p.405-407, 2002.

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary Medicine International**, 757194. 2011.

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYANA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, n.1, p.35–41, 2004.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J.M. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. **Theriogenology**, v.73, p.1284–1292, 2010.

CHRISTENSEN, P. **Evaluation of equine spermatozoa: the use of transmission electron microscopy and in vitro acrossome reaction**. 1995. 133p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual Para Exame Andrológico de Sêmen Animal**. 3 ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.

COOPER, T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*, v.9, n.4, p.533-539, 2007.

CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M.; SPANO, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v.72, n.4, p.273-279, 2005.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v.20, n.2, p.83-94, 1996.

DACHEUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction and Nutrition Development**, v.20, n.4, p.1085-1099, 1980.

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. **Journal of Andrology**, v.14, n.5, p.385-395, 1993.

DEVROEY, P.; Nagy, P.; Tournaye, H.; Liu, J.; Silber, S.; Van Steirteghem, A. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.11, n.5, p.1015-1018, 1996.

DOTT, D.M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, sup. 23, p.41- 46, 1975.

ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; DELHOMME, G.; VIDAMENT, M. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.245-249, 2005.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. 1994. p.29–77.

EINARSSON, S.; DALIN, A.M.; LUNDEHEIM, N. Sperm production and sperm morphology of Swedish Warmblood stallions. **Reproduction of Domestic Animals**, v.44. p.33–36, 2009.

EL MULLA, K.F.; KÖHN, F.M.; DANDAL, M. *In vitro* effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. **Archives of Andrology**, v.37, p.73–78, 1996.

ELLERBROCK, R.E.; PRELL, M.J.; STEWART, J.L.; BOJKO, M.S.; LIMA, F.S.; CANISSO, I.F. Comparison of Centrifugation and Noncentrifugation Methods to Cryopreserve Stallion Epididymal Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.50, p.27–32, 2017.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J.L.; GONSÁLVEZ, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.23-32, 2011.

ESTESO, M.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *CryoLetters*, v.24, p.260–267, 2003.

EVENSON, D.P. Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. **Flow Cytometry: advanced research and clinical applications**. Boca Raton, Flórida: CRC Press. 1980. p.217-246.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v.22, n.2-3, p.169–189, 2000.

FARRELL, P.B.; PRESIW, G.A.; BROCKETT, C.G.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, n.4, p.871-979, 1998.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.111, n.1, p.93–104, 2009.

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

FORD, T.C.; GRAHAM, J.M. Introduction to centrifugation techniques. In: **An introduction to centrifugation**. 1. ed. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. 1991. p.8.

FOSTER, M.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T.L. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. **Theriogenology**, v.76, n.2, p.334-41, 2011.

GALLON, F.; MARCHETTI, C.; JOUY, N.; MARCHETTI, P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1526–1530, 2006.

GAÑÁN, N.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v.72, n.9, p.1268-1277, 2009.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**; v.41, p.203, 1994.

GARDINER-GARDEN, M. Techniques for sorting X and Y spermatozoa may adversely affect histone-associated regions in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.14, p.1403–1404, 1999.

GARDNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole. 2004. p.97-110.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A. PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v.34, n.1, p. 127- 138, 1986.

GIBB, Z.; MORRIS, L.H.; MAXWELL, W.M.; GRUPEN, C.G. Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, p.1027–1033, 2013.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.445-457, 2005.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n.1, p. 131-47, 1996.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n.3-4, p. 239–247, 2001.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.492-504, 2005.

GRANEMANN, L.C. **Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia.** 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; BÁGUENA, O. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.982-990, 2004.

GRAVANCE, C.G.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.49, n. 6, p.1219-1230, 1998.

GRAVANCE, C.G.; LEWIS, K.M.; CASEY, P.J. Computer automated sperm-head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, n.7, p.989-1002, 1995.

GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometry analysis of bull sperm heads. **Theriogenology**, v.46, n.7, p.1205-1215, 1996.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; Maziero, R.R.; Martin, I.; Avanzi, B.R.; DELLAQUA JUNIOR, J.C.; PAPA, F.O. Effects of Pentoxifylline on Equine Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.12, p.1153-1156, 2013.

GUERRERO, C.A. **Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa.** 2006. 202p. Tese (Doutorado) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires.** 2005. 34p. Tese de Doutorado (Divison of comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health) – Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

HAMMES, A.M.; PIMENTEL, C.A.; FERNANDES, C.E. Fertilidade em garanhões avaliada através do exame andrológico. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.277-283, 1996.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n.1, p.343-352, 1990.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probs and research chemicals**. 5. ed. Molecular Probs Inc. Eugene. 1992. p.81- 234.

HEISE, A.; KAHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, n.1, p.48-53, 2010.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES E.L.; Graham, J.K.; Pickett, B.W.; Hamilton, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.47-53, 1996.

HELLANDER, J.C.; SAMPER, J.C.; CRABO, B.G. Fertility of a stallion with low sperm motility and a height incidence of an unusual sperm tail defect. **Veterinary Record**, v.128, n.19, p.449-451, 1991.

HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W. Germ cell apoptosis in the testis of normal stallions. **Theriogenology**, v.62, n.1-2, p.283-297, 2004.

HERRERA, C.; MIRAGAYA, H.M.; CONDE, P.; HYNES, V.; LOSINNO, L.; QUINTANS, C.; PASQUALINI, R.S. Intracytoplasmatic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.94, n.1-4, p.299–302, 2006.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. **Theriogenology**, v.59, n.3-4, p. 813-820, 2003.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v 62, n.1-3, p 3-22, 2000.

HOOGEWIJS, M.; MORRELL, J.; VAN SOOM, A.; GOVAERE, J.; JOHANNISSON, A.; PIEPERS, S.; DE SCHAUWER, C.; DE KRUIF, A.; DE VliegHER, S. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. **Equine Veterinary Journal**, v.40, n.43, p.35-41, 2011.

HOOGEWIJS, M.; PIEPERS, S.; JGOVAERE, J.; SCHAUWER, C.; KRUIF, A.; MORRELL, J.M. Sperm longevity following pre-freeze sperm selection. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.3, p.475–518, 2012.

HORAN, A.H.; BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, n.3, p.417-423, 1972.

HUGHES, C.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; LEWIS, S.E.M. Human sperm DNA integrity assessed by the comet and ELISA assays. **Mutagenesis**; v.14, n.1, p.71–75, 1999.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, n.3, p.733-749, 2001.

JAGER, C.; BORNMAN, M.S.; ANECKHAHN, N.H.; TOIT, D.; VILIOEN, E. Effect of rotation on the generation of reactive oxygen species in human semen. **Andrologia**; v.28, p.291–293, 1996.

JAMES, A.N.; GREEN, H.; HOFFMAN, S.; LANDRY, A.M.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.401-404, 2002.

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

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOT, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.197, n.3, p.389-394, 1990.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1059-1068, 1991.

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; MORRELL, J.; JOHANNISSON, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ÁLVARO-GARCÍA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; GARDE, J. Single Layer Centrifugation(SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibéricabuck semen. **Animal of Reproduction Science**, v.136, p.47–54 2012.

JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M.; THORÉN, J.; JÖNSSON, M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**, v.116, n.1-2, p.119-128, 2009.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.4, p.173- 219, 1991.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effects of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1249–1259, 2003.

KARABINUS, D.; VOGLES, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in bovine sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v.18, n.5, p.549-555, 1997.

KAUR, M.; TRIPATHI, K.K.; BANSAL, M.R.; JAIN, P.K.; GUPTA, K.G. Bacteriology of the cervix in cases of infertility: effect on human sperm. **American Journal of Reproduction and Immunology Microbiology**, v.12, p.21–24, 1986.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: **Annual Convention American Association Equine Practitioners**, Boston. Proceedings. AAEP, v.21, p. 327–336, 1975.

KENNEY, R.M.; EVENSON, D.P.; GARCIA, M.C.; LOVE, C.C. Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. **Biology of Reproduction Mono**, v.1, p.647-653, 1995.

KENNEY, R.M.; HURTTGEN, J.P.; PERSON, R.; WHITERSPOON, D.; SIMONS, J. **Society for Theriogenology: Manual for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion**. Hastings:NE. 1983. 100p.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKE, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; SOLOY, E.; KANEKO, H. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**, v.50, n.4, p.615–623, 1998.

KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Evaluation frozen semen by flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.348-349, 2001.

KNOP, K.; HOFFMANN, N.; RATH, D.; SIEME, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. **Animal of Reproduction Science**, v.89, p.294–297, 2005.

KOLBE, T.; HOLTZ, W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozenthawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. **Theriogenology**, v.52, n.4, p.671-682, 1999.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. **The male gamet: from basic science to clinical applications**. Vienna, IL: Cache River Press. 1999. p.501-516.

LE LANNOU, D.; BLANCHARD, Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. **Journal of Reproduction. Fertility**, v.84, n.2, p.551-556, 1988.

LOVE, C. Stallion semen evaluation and interpretation. **Proceedings Society for Theriogenology**, p.93-102, 2002.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.39- 45, 2005.

MACÍAS GARCÍA, B.; MORRELL, J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; TAPIA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PEÑA, F. Centrifugation one single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. **Animal of Reproduction Science**, v.114, p.193–202, 2009.

MARI, G.; BUCCI, D.; LOVE, C.C.; MISLEI, B.; RIZZARTO, G.; GIARETTA, E.; MERLO, B.; SPINACI, M. Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. **Theriogenology**; v.83, p.953–958, 2015.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides

stored at 5°C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v.116, n.1-2, p.50-57, 2009.

MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; MORRELL, J.M.; PARRILLA, I.; BARRANCO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. **Theriogenology**, v.78, p.1117–1125, 2012.

MARTINEZ-PASTOR, F.; CORUJO, A.R.D.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v.64, n.4, p.958-974, 2005a.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A.R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v.63, n.1, p.24-40, 2005b.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, n.3, p.471-485, 2006.

MARTINS, M.M.; JUSTINO, R.C.; PEREIRA, F.D.; PERCHES, C.S.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epididymis of dogs and cats: preliminary results. **Animal Reproduction**, v.3, p.265, 2006.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, n.3-4, p.326-331, 2007.

MATÁS, C.; DECUADRO, G.; MARTÍNEZ-MIRÓ, S.; GADEA, J. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. **Theriogenology**, v.67, p.1087–1091, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, n.3, p.125-142, 1984.

MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; VILLAVARDE, A.I.S.B.; AVANZI, B.R.; MONTEIRO, G.; DELL'AQUA JR. J.A.; PASQUINI, D.F.; ALVARENGA, M.A. Comparison of three different extenders for freezing

epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3-4, p.331-331, 2008.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.104-18, 2008.

MONTEIRO, G.A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões**. Botucatu, 2010. 37p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, n.9, p.2372-2381, 2005.

MOORE, H.D.M.; AKHONDI, M.A. In vitro maturation of mammalian spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v.1, n.1, p.54-60, 1996.

MORRELL, J.M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, n.1, p. 63-67, 2006.

MORRELL, J.M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. **Animal Reproduction**, v.5, p.121–126, 2008.

MORRELL, J.M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. **Equine Veterinary Journal**, v.4, p.53–58, 2009a.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. **Reproduction of Domestic Animals**, v.44, p.512–517, 2009b.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Single layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**, v.72, p.879–884, 2009c.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; STRUTZ, H.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity, and Chromatin Integrity during Storage. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.1, p. 24–32, 2009d.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biometric techniques for improving sperm quality in animal breeding: A review. **The Open Andrology Journal**, v.1, p.1-9, 2009.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. **Equine Veterinary Journal**, v.42, p.579–585, 2010.

MORRELL, J.M. Biomimetics in action: practical applications of single layer centrifugation for equine breeding. **Veterinary Science Technology**, v.2, p.107, 2011.

MORRELL, J.M.; WALLGREN, M. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v.123, n.1-2, p.64–69, 2011.

MORRELL, J.M.; KLEIN, C.; LUNDEHEIMA, N.; EROLC, E.; TROEDSSON, M.H.T. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation **Animal Reproduction Science**, v. 145, p.47–53, 2014.

MORRIS, L.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. The *in vivo* fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.643-646, 2002.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram spermatozoa hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, n.1, p.25–30, 1999.

MUÑOZ-FUENTES, V.; FORSBERG, C.L.; VILÀ, C.; MORRELL, J.M. Single-layer centrifugation separates spermatozoa from diploid cells in epididymal samples from gray wolves, *Canis lupus* (L.). **Theriogenology**, v.82, p.773–776, 2014.

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.3, p.69-74, 2006.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de**

epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados. 2006. 107 p. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; PINTO, M.; ALONSO, A.; GAMBAROTTA, M.; LOSINNO, L.; AGUERO, A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24h after ground transportation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n.1-4, p.92-95, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.; CORTADA, C.N.; BARNABE, V.H.D.E.; CLERCQ, J.B.; BOLS, P.E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v.67, p.334–340, 2007.

OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; AKHOONDI, M.; GOJOWSKY, M.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. **Molecular Membrane Biology**, v.29, n.3-4, p.95–106, 2012.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALAN, Y.; VARELA-FERNANDEZ, E.; GALLARDO-BOLANOS, J.M.; MURIEL, A.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. **Journal of Andrology**, v.29, p.213-221, 2008.

ORTIZ, I.; DORADO, J.; ACHA, D.; GÁLVEZ, M.J.; URBABO, M.; HIDALGO, M. Colloid single-layer centrifugation improve post-thaw donkey (*Equus asinus*) sperm quality and is related to ejaculate freezability. **Reproduction Fertility Development**, v.27, p.332–340, 2015.

PAOLI, D.; GALLO, M.; RIZZO, F.; BALDI, E.; FRANCAVILLA, S.; LENZI, A.; LOMBARDO, F.; GANDINI, L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.95, p.2315–2319, 2011.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.; DELLA'QUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.293-301, 2008.

PAPA, P.M.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; DELLAQUA, J.A.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N.; LANDIM-ALVARENGA,

F.C.; PAPA, F.O. Effect of density gradient on sperm parameters of stallion frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.505, 2012.

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

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n.2, p.255-266, 1992.

PASQUINI, D.F.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S.; DE VITA, B.; DELL'AQUA, J.A. Jr. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.338–339, 2008.

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

PENA-MARTINEZ I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.209- 224, 2004.

PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SLOTT, VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, v.125, p.181-186, 1988.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.44, p.1-30, 2000.

QIU, J.; HALES, B.F.; ROBAINE, B. Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa. **Biologic Reproduction**, v.52, n.1, p.33-40, 1995.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.59, n.9, p. 1973-1990, 2003.

REVELL, S.G.; PETTIT, M.T.; FORD, T.C. Use of centrifugation over iodixanol to reduce damage when processing stallion sperm for freezing. In:

Proceedings of the Joint Meeting Society for the Study of Fertility, v.92, p.38, 1997.

REVELL, S.G.; ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; CAMUS, A. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. In: **Proceedings of the 14th Meeting European A.I.** Lugo, Spain: Vets; 2002.

RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. **Theriogenology**, v.56, p.503-516, 2001.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.61, p.1589– 1602, 2004.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A.V.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.706-719, 2005.

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biology Science**, v.35, n.3, p.305-12, 1982.

ROSENLUND, B.; WESTLANDER G, WOOD M, LUNDIN K, REISMER E, HILLENSJÖ T. Sperm retrieval and fertilization in repeated percutaneous epididymal sperm aspiration. **Human Reproduction**, v.13, n.10, p.2805-2807, 1998.

RYBAR, R.; FALDIKOVA, L.; FALDYNAM, M.; MACHATKOVA, M.; RUBES, J. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. **Veterinary Medicine**, v.49, n.1, p.1–8, 2004.

SAACKE, R.G. Sperm morphology: its relevance to compensable and un-compensable traits in semen. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.473-478, 2008.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, n.2, p.663-677, 2000.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; DALTON, J.C.; BAME, J.H.; DEJARNETTE, J.M.; DEGELOS, S.; NEBEL, R.L. Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update. In: **Technique Conference on Artificial Insemination and Reproduction. National Association of Animal Breeders**, 15, 1994, Columbia, MO, USA. Proceedings... Columbia, MO: NAAB, 1994. p.57-67.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.C.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLI, M.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v.5, n.5, p.1112-1116, 2000.

SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; Ogonuki, N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.55, n.8, p.1759-1768, 2001.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DI'AZ, A.; PULIDO-PASTOR, A.; DORADO, J.; GÓMEZ-BRUNET, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n.5, p.1219-1926, 2006.

SANTOS, F.C.C.; MORRELL, J.M.; CURCIO, B.R.; NUNES, M.M.; MALSCHITZKY, E. Cushioned and Single Layer Centrifugation improve epididymal stallion sperm motility after centrifugation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.57, p.56-60, 2017.

SHIBAHARA, H.; ONAGAWA, T.; AYUSTAWATI, JORSARAEI, S.; HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. **International Journal of Andrology**, v.26, n.4, p.236–241, 2003.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. Proteins of seminal plasma. **Bioscience and Reproduction**, v.8, n.0, p.609-618, 1990.

SHRIVASTAV, P.; NADKARNI, P.; WENSVOORT, S. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v.9, n.11, p.2058–2061, 1994.

SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5°C for 24 h, and stored cooled

for 2 or 24h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v.94, p 99–103, 2006.

SIEME, H.; MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLD, R.; KLUG, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, n.2, p. 134–140, 2003.

SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees C for 24 h, and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.99–103, 2006.

SILBER, S.J.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. **Human Reproduction**, v.9, n.9, p.1905–1909, 1994.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.958–978, 2006.

SOSTARIC, E.; ALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.237–248, 2008.

SOUSA, D.B. **Variabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M;S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.4, p.649-657, 2012.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9, 1999.

STOLL, A.; LOVE, C.C.; BALL, B.A. Use of a single-layer density centrifugation method enhances sperm quality in cryopreserved-thawed equine

spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.7, p.547-551, 2012.

TARDIF, A.L.; FARREL PB, TROUERN-TREND V, FOOTE RH. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p.1606-1612, 1997.

TEBET, J.; MARTINS, M.I.; CHIRINEA, V.; SOUZA, F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p.1629-1632, 2006.

TEJERINA, F.; MORRELL, J.; PETTERSON, J.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm). **Animal Reproduction**, v.6, p.380–385, 2009.

THUNDTHIL, J.; GILL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Premature capacitation on fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.351, 1999.

TIPKANTHA, W.; THUWANUT, P.; MORRELL, J.; COMIZZOLI, P.; CHATDARONG, K. Influence of living status (single vs. paired) and centrifugation with colloids on the sperm morphology and functionality in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Theriogenology**, v.86, n.9, p.2202-2209, 2016.

TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.225-228, 2002.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v.92, n.1-3, p.126–130, 2010.

TURNER, T.T.; REICH, G.W. Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. **Biology Reproduction**, v.32, p.120–128, 1985.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCA, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies

after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). **Theriogenology**, v.77, n.9, p.1959-1963, 2012.

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

VEERAMACHANENI RAO D.N.; MOELLER, C.L.; PICKETT, B.W.; SHINER, K.A.; SAWYER, H.R. On processing and evaluation of equine seminal samples for cytopathology and fertility assessment: the utility of electron microscopy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, n.4. 207-215, 1993.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DE PAUW, I.; DEWULF, J.; RIJSSELAERE, T.; DE DRUIF, A. Effect of whole blood and serum on bovine sperm quality and in vitro fertilization capacity. **Theriogenology**, v.61, p.25–33, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, n.1-2, p.133-150, 2002.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.481-492, 2000.

Anexo: Publicação Artigo 01

Impact fator: 0.882

Santos, F.C.C.; Morrell, J.M.; Curcio, B.R.; Nunes, M.M.; Malschitzky, E. Cushioned and Single Layer Centrifugation improve epididymal stallion sperm motility after centrifugation. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.57, p.56-60, 2017

Journal of Equine Veterinary Science 57 (2017) 56–60



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com



Original Research

Cushioned and Single Layer Centrifugation Improve Epididymal Stallion Sperm Motility Postcentrifugation



Fernanda Carlini Cunha dos Santos^{a,*}, Jane M. Morrell^b, Bruna da Rosa Curcio^c, Márcio Menezes Nunes^d, Eduardo Malschitzky^{a,e}

^a Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

^c Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Iuterana (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2017

Received in revised form 25 May 2017

Accepted 26 May 2017

Available online 28 June 2017

Keywords:

Colloid

Equine

Spermatozoa

Sperm selection

ABSTRACT

Traumatic injuries and sudden death can prematurely end the breeding career of a stallion. In such cases, a final spermatozoa collection can be obtained by harvesting the cauda epididymis. Semen samples can then be used for fresh artificial insemination or cryopreserved. Centrifugation is a critical point of sperm cryopreservation processing and can be detrimental to spermatozoa. Colloid centrifugation approaches reduce this physical damage and can be used to select better quality sperm. The aim of this research was to determine the effect of cushioned and single layer centrifugation (SLC) on epididymal stallion sperm motility postcentrifugation. Eight stallions were submitted to bilateral orchidectomy and the resulting epididymal cauda ($n = 16$) were flushed with semen extender. After harvesting, the samples were submitted to three centrifugation protocols: conventional (20 minutes at $600\times g$), cushioned (20 minutes at $900\times g$) and SLC (20 minutes at $300\times g$). The pellets were resuspended and sperm parameters were evaluated. Sperm morphology was evaluated under a phase-contrast microscope, total motility (TM) and progressive motility (PM) were evaluated with computer-assisted semen analyses. The proportion of morphologically normal spermatozoa was 72.2% for SLC, 72% for cushioned, and 67% for conventional ($P > .05$). After conventional centrifugation, it was recorded a TM of 7.4% and PM of 2.7%. After cushioned centrifugation, it was recorded a TM of 13.9% and PM of 6.5%. After SLC, it was recorded a TM of 46% and PM of 32.1%. The motility of spermatozoa recovered by SLC ($P < .05$) and cushioned centrifugation ($P > .05$) were higher than those recovered by conventional centrifugation. Colloids, including cushioned and SLC, improved epididymal stallion sperm motility postcentrifugation.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.