

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

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA PARA
SÊMEN EQUINO**

GUSTAVO RUPP LARENTIS

**PORTO ALEGRE
2017**

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

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA PARA
SÊMEN EQUINO**

AUTOR: GUSTAVO RUPP LARENTIS

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

ORIENTADOR: RICARDO MACEDO GREGORY

**PORTO ALEGRE
2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Larentis, Gustavo Rupp
SELEÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA
PARA SÊMEN EQUINO / Gustavo Rupp Larentis. -- 2017.
37 f.
Orientador: Ricardo Macedo Gregory.

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

1. garanhão. 2. ejaculado. 3. motilidade
progressiva. 4. seleção de sêmen. I. Gregory, Ricardo
Macedo, orient. II. Título.

GUSTAVO RUPP LARENTIS

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA PARA SÊMEN
EQUINO**

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Dr. Henrique Kurtz Löf
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ivo e Inês e a minha irmã Elisa pelo suporte nos momentos difíceis.

A Cíntia, minha esposa, que esteve ao meu lado em cada passo da realização deste trabalho.

A pequena Isadora pelas pequenas alegrias mesmo nos momentos mais tensos.

Ao Prof. Ricardo Macedo Gregory, por me orientar.

Ao Prof. Rodrigo Costa Mattos pelo apoio nas diversas atividades desenvolvidas no REPROLAB e por me incentivar.

Aos meus amigos Henrique Bastos, Giovani Camozzato e Gabriel Santos pela parceria, por todo desenvolvimento científico e pelo trabalho em conjunto no REPROLAB.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos por compartilhar o conhecimento e possibilitar meu crescimento profissional.

Aos inúmeros amigos e colegas do REPROLAB, estagiários, mestrandos e doutorandos, agradeço pela convivência.

O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos.

Lao-Tsé

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Schematics of the filtration chambers device and filter position..... 23
- Figura 2 Total number of progressive spermatozoa (10^6) observed after 15 min filtration (T15) in the two devices (SD – 26 mm and LD – 36 mm diameter). Values represent mean \pm SE. Superscripts (^{a,b}) represent significant ($P < 0.001$) differences between treatments.... 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades dos diferentes métodos de seleção de espermatozoides.....	15
Tabela 2	Table 1: Semen parameters observed from samples filtered with two devices (SD and LD) after two filtration times (T7 and T15) and immediately after dilution (T0). Values represent mean \pm SE.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Motilidade progressiva.....	13
2.2	Seleção espermática.....	14
2.2.1	Migração.....	15
2.2.2	Gradiente de centrifugação.....	16
2.2.3	Filtros.....	17
2.3	Dimensão do espermatozoide.....	17
3	ARTIGO.....	19
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30

SELEÇÃO ESPERMÁTICA ATRAVÉS DE MEMBRANA SINTÉTICA PARA SÊMEN EQUINO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a cinética e a integridade e funcionalidade da membrana plasmática após a seleção espermática com um filtro de membrana sintética em câmaras de PVC com dois diâmetros diferentes e dois tempos de filtração. Foram utilizados 12 ejaculados de três garanhões. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi diluído com leite desnatado (T0) e analisado. Duas câmaras diferentes em PVC foram produzidas com dois joelhos conectados com um tubo dividido ao meio por um filtro de membrana sintética com poros de 5 μm . Uma câmara de 26 mm e a outra de 36 mm de diâmetro interno. Foi colocado leite desnatado a 37° C em um lado da câmara (A). No outro lado da câmara (B) depositou-se uma amostra do sêmen diluído, com um número conhecido de espermatozoides. Após 7 e 15 min, obteve-se uma amostra do lado "A" de cada câmara e calculou-se a concentração espermática e analisou-se o sêmen. A motilidade total, a motilidade progressiva e a integridade da membrana plasmática melhoraram ($P < 0,05$) após a filtração em ambos os dispositivos e tempos de filtração. A concentração espermática foi menor ($P < 0,05$) em ambas as câmaras nos dois tempos em relação ao T0. O dispositivo de filtração demonstra ser uma alternativa prática e fácil para a seleção espermática. A seleção usando as câmaras permite um aumento da cinética e da integridade da membrana e funcionalidade independente do tempo e do diâmetro do dispositivo.

Palavras-chave: garanhão, ejaculado, motilidade progressiva, seleção de sêmen.

EQUINE SPERM SELECTION BY SYNTHETIC MEMBRANE FILTER

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the kinetics and plasma membrane integrity and functionality after sperm selection with a synthetic membrane filter in PVC chambers with two different diameters and two filtration times. A total of 12 ejaculates from three stallions was used. Immediately after collection semen was diluted with skim milk (T0) and analyzed. Two different chambers in PVC were made with two elbows connected with a pipe divided in half by a 5 μ m pore synthetic membrane filter. One chamber had an inner diameter of 26 mm and the other 36 mm. Skim milk at 37° C was placed in a side of the chamber (A). In the other side of the chamber (B) a sample of the extended semen, with known number of spermatozoa was deposited. After 7 and 15 min a sample was obtained from the 'A' side of each chamber and sperm concentration was calculated and semen analyzed. Total motility, progressive motility and plasma membrane integrity were improved ($P<0.05$) after filtration in both devices and filtration times. Concentration was lower ($P<0.05$) in both chambers at all times in relation to T0 semen. The filtration device demonstrates to be a practical and easy alternative for sperm selection. Selection using the chambers allows an increase in kinetics and membrane integrity and functionality independent of time and device diameter.

Keywords: stallion, ejaculate, progressive motility, semen selection

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato de uma inseminação artificial (IA) é de uma lenda árabe de 1322, onde um xeique roubou o sêmen de um garanhão de uma tribo rival utilizando uma esponja e inseminou sua melhor égua, nascendo um produto 11 meses depois. Mais concretamente, após Leeuwenhoek ter descrito pela primeira vez o espermatozoide (“animalculi”) em 1677, aproximadamente 100 anos se passaram até ser documentada a primeira IA (FOOTE, 1982). Isto ocorreu quando Spallanzani inseminou uma cadela em 1780, resultando em três filhotes (FOOTE, 1982). Até por volta de 1900 o interesse na IA era meramente científico, quando se desenvolveram programas de IA em animais de fazenda para fins de reprodução assistida (FOOTE, 1982). A IA é considerada a técnica que gerou a maior contribuição na reprodução dos animais domésticos (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; JOHANNISSON, 2010).

A IA teve seu uso disseminado em equinos, na Rússia, no final do século 19 (PERRY, 1968; DAVIES MOREL, 1999; VERBERCKMOES; VAN SOOM; KRUIF, 2004; AURICH, 2012). Inicialmente acreditava-se que a IA era um método para controle de doenças venéreas ou para tratar esterilidade nas éguas. O uso desta técnica como ferramenta no melhoramento genético ocorreu no início do século 20 (BOYLE, 1992; VERBERCKMOES; VAN SOOM; KRUIF, 2004).

Repiquet, um veterinário francês, em 1890 também já preconizava o uso da IA para a melhoria no potencial reprodutivo de garanhões na Europa (PERRY, 1968). Heape (1897) preconizava que se espermatozoides fossem depositados artificialmente na vagina de certas fêmeas de mamíferos no período adequado, estas fêmeas deveriam conceber. Ele também dizia que a deposição artificial de espermatozoides no útero de indivíduos que falharam na reprodução natural por determinadas razões poderiam apresentar prenhez como consequência. Mais recentemente se verificou que essa melhoria pode ocorrer com o tratamento do sêmen, incluindo a concentração e a filtração para a obtenção de uma boa amostra de sêmen de ejaculados de baixa qualidade (DAVIES MOREL, 1999).

Relatos de IA nos EUA descreveram a coleta do sêmen ejaculado na vagina de uma égua através de uma seringa especial e o uso imediato deste sêmen, por vezes em mais de uma égua. Outro método utilizado foi o uso de cápsulas de gelatina, que quando impregnadas com sêmen e introduzidas no interior do útero das éguas “receptoras” acabavam liberando os espermatozoides (HEAPE, 1897).

Por volta dos anos 50 Michajilov introduziu o uso de leite de égua pasteurizado como diluente para o sêmen equino. Essa técnica possibilitou o fracionamento e uso de um único ejaculado em diversas éguas sem prejuízo à motilidade em um curto período de tempo (BOWEN, 2011).

A técnica de IA apresenta como vantagens a aceleração do melhoramento genético da manada; avaliação e monitoramento rotineiro do sêmen; incremento no potencial reprodutivo de garanhões subférteis; fertilização de éguas com incapacidade de ser cobertas ou reações inflamatórias adversas ao sêmen; armazenamento e transporte de sêmen; aumento de éguas cobertas por um mesmo garanhão; auxílio no controle de acidentes e enfermidades (BOYLE, 1992; DAVIES MOREL, 1999; SQUIRES, 2009). O uso da IA com sêmen fresco apresenta índices de concepção próximos ou até mesmo superiores quando comparados aos índices de monta natural (MATTOS et al. 1996).

A fertilidade ou o potencial de fertilização são características, na melhor das hipóteses, secundárias na escolha de um garanhão para reprodutor e na maioria dos casos a seleção e exclusão dos animais que claramente não possuem características necessárias para uma fertilidade razoável não é viável. Isso se explica pelas características da produção equina, baseadas no desempenho e fenótipo (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2003).

O potencial reprodutivo é avaliado através de vários testes laboratoriais. Os testes de rotina realizados na avaliação clínica do sêmen incluem o aspecto, volume, concentração, motilidade e morfologia e pH. Outros testes menos comuns são o bacteriológico, citológico, hiposmótico, coloração para visualização de espermatozoides mortos-vivos, teste de longevidade e testes de fluorescência (BAUMBER-SKAIFE, 2011).

A motilidade progressiva é um dos principais critérios de avaliação e de classificação da fertilidade do macho, pois é um método simples e de baixo custo para se realizar. Apesar de haver argumentos contraditórios quanto à correlação direta entre motilidade progressiva e fertilidade, este exame ainda é utilizado como rotina para informação referente à qualidade do sêmen a ser inseminado (MALMGREN, 1997; VARNER; LOVE, 2003; VERBERCKMOES; VAN SOOM; KRUIF, 2004; VARNER, 2008; SIEME, 2009; BAUMBER-SKAIFE, 2011).

Já o volume e a concentração espermática por mL permitem calcular o número total de espermatozoides no ejaculado. Com estas medidas é possível determinar

quantas inseminações podem ser realizadas a partir de um ejaculado (FOOTE, 1982; MOCÉ; GRAHAM, 2008). Quando avaliadas com frequência estas medidas da produção espermática são excelentes para avaliar o aspecto quantitativo da espermatogênese (FOOTE, 1982).

Para que uma IA resulte em prenhez é necessário que uma dose inseminante contenha um número suficiente de espermatozoides viáveis capazes de alcançar o local de fertilização (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Apesar de o número mínimo de espermatozoides em uma dose inseminante provavelmente sofrer variação individual (SIEME et al., 2004), a referência para a fertilização de éguas foi estabelecida em 500 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva (EMP). Em um programa típico de IA esta dose varia de 250-500 milhões de EMP, mas estudos recentes já indicam doses inferiores a 100 milhões de EMP sem redução da fertilidade (BRISKO, 2006; BRISKO, 2011).

Técnicas efetivas para inseminação de éguas com números baixos de espermatozoides foram desenvolvidas para a utilização de espermatozoides selecionados por sexo (MORRIS; ALLEN, 2002). Estas técnicas também permitem o uso mais eficiente do sêmen do garanhão, o potencial incremento na fertilidade de garanhões com sêmen de baixa qualidade ou baixa produção e o potencial de redução da reação inflamatória pós-cobertura nas éguas. Algumas das técnicas descritas para o uso de baixo número de espermatozoides incluem inseminação no oviduto via laparotomia, inseminação uterina profunda (na ponta do corno uterino) e inseminação histeroscópica na junção útero-tubárica (NIE; JHONSON; WENZEL, 2003).

Recentemente filtros de membrana foram desenvolvidos com o objetivo de separar os espermatozoides do fluido seminal e aumentar a concentração do ejaculado sem utilizar a centrifugação (ALVARENGA et al., 2010; ALVARENGA et al., 2012). Assim, evitando os efeitos considerados nocivos como o dano aos espermatozoides e a formação de espécies reativas ao oxigênio.

Este trabalho tem como objetivo determinar a cinética espermática e a integridade e funcionalidade da membrana plasmática após a seleção espermática através de membrana sintética em câmaras de PVC com dois diferentes diâmetros e dois tempos de filtração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Motilidade progressiva

Deveríamos prever a fertilidade de um ganhão antes de iniciar sua carreira reprodutiva através de exame físico e análise do sêmen. Esta é uma limitação que ainda não foi solucionada, pois apesar do número de testes funcionais disponíveis, sua relação com a fertilidade ainda não foi definida completamente. De forma geral sêmen de baixa qualidade é um indicador potencial de subfertilidade, enquanto sêmen de boa qualidade não é garantia de fertilidade (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2003; BAUMBER-SKAIFE, 2011).

O objetivo da análise de sêmen é determinar o potencial de fertilização da amostra usando um procedimento rápido e não dispendioso (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Esta meta pode ser difícil de alcançar devido à natureza complexa da fertilização: particularidades do espermatozoide, capacidade de avaliar a fertilidade e manejo das fêmeas que serão inseminadas (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Hoje em dia é aceito que a fertilização *in vivo* ocorre com espermatozoides apresentando alta motilidade e morfologia normal, com membranas e cromatina intactas. Quanto maior for a proporção de espermatozoides com estas características na dose inseminante, maior a chance de prenhez após a inseminação (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

A estimativa visual do percentual da motilidade espermática em uma amostra de sêmen provavelmente é a avaliação laboratorial mais comumente realizada. Este método pode ser muito útil apesar de avaliar apenas um único e importante atributo do sêmen que sofre influência de subjetividade humana (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Entretanto, esta subjetividade está relacionada com o treinamento e a habilidade do avaliador (BROEKHUIJSE et al., 2011). Este fator pode ser minimizado com o uso de sistemas de análise computadorizada (CASA) (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Os valores cinéticos avaliados são a velocidade do movimento, a largura da trajetória da cabeça dos espermatozoides, e a frequência da mudança de direção da cabeça dos espermatozoides (SERRES et al., 1984).

Acredita-se que o percentual de motilidade dos espermatozoides no ejaculado de ganhões é um dos fatores que determinam a fertilidade da amostra (CASEY et al., 1993; VARNER, 2008). Este conceito é intuitivo, pois é sabido que o espermatozoide deve estar vivo, ser capaz de se movimentar (pelo menos para penetrar na zona

pelúcida) e de permanecer vivo e móvel por um período de tempo capaz de fertilizar um oócito (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Em mulheres com idade inferior a 39 anos o resultado de inseminações baseadas na motilidade em inseminações intrauterinas apresentando espermatozoides com motilidade superior a 50%, a chance de sucesso foi 2,95 vezes superior quando comparado com motilidade inferior a 50% (MONTANARO GAUCI et al., 2001).

Por este fator as centrais de reprodução equina, onde se realiza coleta de sêmen como rotina, as doses são geralmente calculadas com base no número de espermatozoides e motilidade progressiva (MALMGREN, 1997). Após vários testes de seleção espermática em sêmen fresco e congelado de garanhões observou-se o aumento no percentual de espermatozoides com motilidade progressiva e redução no percentual de espermatozoides anormais, provavelmente por eliminar aqueles de qualidade inferior (TREIN, 2004). Também se supõe que espermatozoides imóveis ou danificados podem apresentar efeitos adversos no que se refere à qualidade e fertilidade dos espermatozoides móveis (CASEY et al., 1993). Na ausência de outro teste rápido, de baixo custo e confiável para a obtenção de parâmetros preditivos da qualidade do sêmen à campo esta avaliação subjetiva permanece como o mais prático para o uso rotineiro e comercial (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

2.2 Seleção espermática

Vários métodos foram sugeridos para mimetizar a seleção dos espermatozoides de boa qualidade no trato reprodutivo da fêmea (tabela 1). A filtração de espermatozoides do plasma seminal, ativa ou passiva, mimetizando a migração dos espermatozoides para os cornos uterinos ou fazendo a seleção dos espermatozoides de melhor qualidade do resto do ejaculado como ocorre na junção útero-tubárica *in vivo* (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Inseminando apenas espermatozoides de alta qualidade selecionados previamente à inseminação deve melhorar os índices de prenhez (NIE; JHONSON; WENZEL, 2003; MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

Na reprodução humana assistida o gradiente de centrifugação ou o *swim-up* são técnicas laboratoriais utilizadas rotineiramente para a exclusão de espermatozoides imóveis e anormais do ejaculado. Esse processamento é realizado para obter doses inseminantes de alta qualidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 2002). Para a obtenção de

alíquotas ricas em espermatozoides, estas técnicas necessitam de uma ou mais passagens por centrifugação (ENGEL et al., 2001).

Tabela 1. Propriedades dos diferentes métodos de seleção de espermatozoides.

	Migração	Filtração	Centrifugação em coloide
Facilidade de uso	Simples	Simples	Requer atenção aos detalhes
Equipamento necessário	Tubos especiais em casos de swim-through	Pode utilizar centrífuga	Centrífuga
Material necessário	Tubos especiais necessários para migração/sedimentação	Filtros	Coloides
Custo por amostra	Baixo, a não ser que utilize meio especial	Moderado	Alto
Seleção espermática	Baseado apenas em motilidade	Baseado em motilidade, morfologia e acrossomas intactos	Baseado em motilidade, morfologia, viabilidade, qualidade da cromatina e possibilidade de acrossomas intactos
Remoção do plasma seminal	Sim	Um pouco	Sim
Remoção de patógenos	Sem informações	Sem informações	Sim
Fragmentos celulares	Não	Pode estar presente	Não
Recuperação de espermatozoides	10-20%	60-85%	>50%

*Adaptado de MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009.

Com o aprimoramento destas técnicas é possível melhorar a fertilidade de determinados ejaculados. Este fato pode ser de grande valia para a IA, a não ser que a recuperação de espermatozoides após processamento seja muito baixa (FOOTE, 1982). O objetivo da seleção é uma melhoria quantitativa e qualitativa do ejaculado quando comparado com o ejaculado inicial, evitando alterações mecânicas ou físico-químicas dos espermatozoides (ENGEL et al., 2001).

2.2.1 Migração

Os métodos de migração apresentam a motilidade dos espermatozoides como o principal fator de seleção, onde o método *swim-up* é o mais utilizado em humanos (METHA; SIGMAN, 2014). Esta técnica consiste em centrifugar o sêmen diluído até

formar um pélete frouxo onde os espermatozoides com capacidade de movimento progressivo se destaquem, ficando no sobrenadante, demonstrando sua funcionalidade (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995).

A motilidade das amostras de ejaculado é maior quando utilizada a técnica de *swim-up* do que quando utilizada a técnica de gradiente de centrifugação (MEHMOOD; ANWAR; SAQLAN NAQVI, 2009). A principal desvantagem dos métodos de migração é a baixa taxa de recuperação de espermatozoides (CASEY et al., 1993) como foi demonstrado por Hallap et al. em 2004 (4%), tornando pouco viável o uso desta técnica na preparação de doses inseminantes na maioria das espécies animais (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

2.2.2 Gradiente de centrifugação

Neste método o sêmen com o diluente é centrifugado através de camadas de diferentes densidades de um coloide promovendo a separação do plasma seminal e da sub-população de espermatozoides com boa viabilidade (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). A separação completa de diversos componentes de uma mistura se dá por variação no tempo de sedimentação, força-*g* e a amplitude do intervalo de densidade do gradiente (PERTOFT, 2000). O gradiente de centrifugação seleciona a partir da densidade (LE LANNOU; BLANCHARD, 1988), não sendo um método fisiológico de separação (MEHMOOD; ANWAR; SAQLAN NAQVI, 2009).

Uma desvantagem desta técnica é que as células espermáticas são frágeis, onde os efeitos da centrifugação nos diferentes indicadores de qualidade da amostra ainda estão por ser determinados. Outro problema detectado é o número de amostras que devem ser preparadas quando na utilização comercial (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Outro fator desabonador é o número pequeno de espermatozoides recuperados, 12,2%, como descrito por Morrell et al. em 2005. Entretanto, o número de espermatozoides móveis recuperados e o percentual de recuperação são significativamente superiores no gradiente de centrifugação quando comparado ao *swim-up* (MEHMOOD; ANWAR; SAQLAN NAQVI, 2009). Por fim a presença de endotoxinas e a advertência do fabricante do Percoll® (nome comercial do gradiente de centrifugação mais utilizado) quanto ao uso *in vivo* (ENGEL et al., 2001) vão contra o uso desta técnica.

Outra variação da técnica é a centrifugação de camada simples, que obteve resultados semelhantes aos obtidos em centrifugação de diferentes camadas. Este método possibilita o processamento de um volume maior do ejaculado de cada vez sem apresentar endotoxinas (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; JOHANISSON, 2010).

As técnicas de centrifugação em coloides têm seu resultado final diretamente relacionado com a qualidade do sêmen, ou seja, sêmen de baixa qualidade geral com resultados apresentando menor recuperação de espermatozoides viáveis.

2.2.3 Filtros

Diferentes técnicas de seleção de espermatozoides viáveis foram desenvolvidas com o intuito de reter as células espermáticas de baixa qualidade. O filtro de lã de vidro, o gel de Sephadex e membranas porosas são exemplos destas técnicas em diferentes espécies (MOGAS et al., 1998).

O filtro de lã de vidro apresentou um aumento significativo de espermatozoides normais no que diz respeito à morfologia do sêmen humano. Também apresentou diminuição na quantidade de espermatozoides mortos. Este filtro funciona por adesão do conteúdo corpuscular (proteínas, espermatozoides imóveis e células de formato arredondado de diferentes origens) à superfície das fibras da lã de vidro e apenas parcialmente pela densidade da malha (ENGEL et al., 2001).

Estas técnicas apresentam menor taxa de perda de espermatozoides viáveis (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009) com recuperação de aproximadamente 63% sendo relatado em bovinos por Januskauskas et al. em 2005. O filtro de lã de vidro leva a uma melhoria na motilidade espermática, na viabilidade, na morfologia e na integridade de membrana plasmática (KIM; YU; KIM, 2010).

Filtros de membrana foram desenvolvidos com o intuito de evitar o processo de centrifugação com o objetivo de aumentar a concentração espermática através da passagem do fluido seminal, retendo os espermatozoides (ALVARENGA et al., 2010; ALVARENGA et al., 2012).

2.3 Dimensão do espermatozoide

O espermatozoide é o fim do processo de produção da espermatogênese, passando por sucessivas fases mitóticas, meióticas e pós-meióticas nos túbulos seminíferos dos testículos. Enquanto as duas primeiras fases são cruciais para o desenvolvimento do gameta masculino, é durante a fase pós-meiótica que o espermatozoide é formado. Esta fase se caracteriza por remodelação da espermátide em espermatozoide pela formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e perda de grande parte do citoplasma (EDDY, 2006).

O espermatozoide é classicamente dividido em cabeça e flagelo (ou cauda). A cabeça é definida como um formato de espátula, contendo o núcleo, o acrossoma e complementos de elementos citosólicos. O flagelo se divide em peça conectiva, peça intermediária, peça principal e peça final. Estas várias partes do espermatozoide são envoltas por uma membrana plasmática comum (VARNER; GIBB; AITKEN, 2015).

O exame morfométrico do espermatozoide de cinco garanhões demonstrou que a cabeça dos espermatozoides apresentam $6,3 \mu\text{m}$ ($\pm 0,41$) de comprimento e $3,08 \mu\text{m}$ ($\pm 0,34$) de largura. Estas medidas são menores após a fixação e secagem de coloração, por exemplo, a de Feulgen apresentando 20 e 13% menores respectivamente (BALL; MOHAMMED, 1995).

Já um estudo realizado na Polônia demonstrou em 10 indivíduos uma variação de tamanho de acordo com a técnica de coloração utilizada. Na coloração de nitrato de prata o comprimento médio da cabeça dos espermatozoides foi de $7,76 \mu\text{m}$, a largura média da cabeça foi de $3,75 \mu\text{m}$ e o comprimento total foi de $88,73 \mu\text{m}$. Já na coloração de eosina e violeta de genciana os tamanhos médios do comprimento de cabeça, largura de cabeça e comprimento total foram $7,53 \mu\text{m}$, $3,74 \mu\text{m}$ e $81,24 \mu\text{m}$ respectivamente (BANASZEWSKA et al., 2015).

3 ARTIGO

Artigo para publicação na Journal of Equine Veterinary Science.

EQUINE SPERM SELECTION BY SYNTHETIC MEMBRANE FILTER

Gustavo R. Larentis*, Giovani C. Camozzato, Henrique B.A. Bastos, Rodrigo C. Mattos,
Ricardo M. Gregory

REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-6124; Fax: +55 51 3308-8063

E-mail address: gustavo.larentis@ufrgs.br (Gustavo R. Larentis)

Postal address: Avenida Bento Gonçalves, 9090, REPROLAB, cep. 91540-000, Porto Alegre - RS Brasil.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the kinetics and plasma membrane integrity and functionality after sperm selection with a synthetic membrane filter in PVC chambers with two different diameters and two filtrations times. A total of 12 ejaculates from three stallions was used. Immediately after collection semen was diluted with skim milk (T0) and analyzed. Two different chambers in PVC were made with two elbows connected with a pipe divided in half by a 5 µm pore synthetic membrane filter. One chamber had an inner diameter of 26 mm and the other 36 mm. Skim milk at 37° C was placed in a side of the chamber (A). In the other side of the chamber (B) a sample of the extended semen, with known number of spermatozoa was deposited. After 7 and 15 min a sample was obtained from the 'A' side of each chamber and sperm concentration was calculated and semen analyzed. Total motility, progressive motility and plasma membrane integrity were improved ($P < 0.05$) after filtration in both devices and filtration times. Concentration was lower ($P < 0.05$) in both chambers at all times in relation to T0 semen. The filtration device demonstrates to be a practical and easy alternative for sperm selection. Selection using the chambers allows an increase in kinetics and membrane integrity and functionality independent of time and device diameter.

Keywords: stallion, ejaculate, progressive motility, semen selection

1. Introduction

Stallions are selected for breeding primarily on the basis of their pedigree and their athletic prowess; however fertility is usually at best a secondary consideration (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2003). Therefore, stallion subfertility remains an important aspect of reproductive management of the horse (BALL, 2008). Stallions with poor fertility are tolerated because we have the ability, in some cases, to improve fertility with more intensive veterinary management (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2003).

One assisted reproduction technique that can improve fertility is artificial insemination (AI). For a successful AI resulting in pregnancy, a sufficient number of viable spermatozoa capable of reaching the fertilization site is required (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; JOHANNISSON, 2010). To improve the quality of AI doses, the selection of spermatozoa that are most likely to achieve fertilization from the rest of the ejaculate is an alternative approach (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

The goal of sperm selection is a quantitative and qualitative improvement of the sperm when compared to the native ejaculate, whilst avoiding mechanic or physicochemical alterations of the spermatozoa (ENGEL et al., 2001). Different methods of selection were used with equine spermatozoa, like filters with glass wool or Sephadex (SAMPER; HELLANDER; CRABO, 1991) or density gradients centrifugation (MACPHERSON et al., 2002). The use of PercollTM was effective in recovering motile sperm without influence on the integrity and functionality of the plasmatic membrane (TREIN, et al. 2008). Nevertheless, different levels of endotoxin have been found in different batches of Percoll, making it necessary to check each batch (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). An increase in semen quality and pregnancy rates was observed after a single layer centrifugation in stallions with no known fertility problems (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; JOHANNISSON, 2010; MORRELL et al., 2014). In order to enrich the spermatozoa in a desired sample volume, the sperm selection methods mentioned above are commonly followed by one or more centrifugation steps (ENGEL et al., 2001). Detrimental effects on quality are described in stallion semen after centrifugation, such as damage to spermatozoa integrity (SIEME et al., 2003; AURICH, 2008). Damaged and abnormal spermatozoa generate greater amount of reactive oxygen species (ROS) that may contribute to reduced fertility or

problems related to semen preservation (BALL et al., 2001). Oxidative stress can induce damage to sperm membranes and DNA, ultimately leading to non-viable sperm. The use of damaged sperm in assisted reproductive technology has been implicated in alterations on embryo development in humans (YELUMALAI et al., 2012).

To avoid deleterious effects of centrifugation, filters have been developed for the removal of seminal plasma and the concentration of spermatozoa (ALVARENGA et al., 2010) causing less damage to the plasma membrane when compared to centrifugation techniques (ALVARENGA et al., 2012).

The aim of the present study was to determine the kinetics and plasma membrane integrity and functionality after sperm selection with a synthetic membrane filter in PVC chambers with two different diameters and two filtrations times.

2. Materials and methods

2.1. Semen Collection

The present study was conducted with three stallions aged between 6 and 9 years old, kept in paddocks at Reprolab/UFRGS, (Porto Alegre, Brazil). They were fed oat grains and alfafa hay daily, with free access to water and mineral salt. All animal procedures were reviewed and approved by the Committee of ethics in animal experimentation (CEUA) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul under the number 31105 29/06/16. On a twice weekly schedule, four ejaculates per stallion were collected, using a phantom, and a lubricated and prewarmed (42° C – 45° C) Hannover model artificial vagina with an inline filter to separate the gel fraction, totalizing 12 ejaculates.

2.2. Semen dilution and evaluation

Immediately after collection, semen volume and aspect was evaluated. Semen was extended 1 + 2 (semen + extender) in skim milk in order to get at least 40 mL (T0), to divide in two parts of 20 mL for each device. Samples needed to have at least vigor 3 in a 0 - 4 scale to be used in the study.

Concentration was verified with a sperm sample diluted 1 + 19 in an Improved Neubauer chamber. Total sperm count was obtained in two replicates using separate

chambers with a mean difference between the two counts not greater than 10% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; BRITO et al., 2016).

Sperm parameters were determined using a CASA system (AndroVision, Minitub, Tiefenbach - Germany). For each evaluation, a 3 μL sperm sample was placed in a disposable 4 chamber slide (20 microns in depth; Leja Amsterdam, The Netherlands) and three randomly selected fields were analyzed. Sperm motility values included: total motility, percent progressive motility, curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN) minimum and maximum, amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF).

The functional integrity of the plasma membrane was assessed using hypoosmotic-swelling test (HOST) at 100 mOsmol/L with 100 μL of the sample diluted in 200 μL of distilled water (LOMEO; GIAMBERSIO, 1991; LAGARES et al., 2000). The diluted samples were incubated in a water bath at 37° C for 8 min, and 100 cells were evaluated using a phase contrast microscope (400x; Olympus® BX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Percentage of sperm that showed swollen tails was calculated.

Plasma membrane integrity was evaluated using fluorescent probes. An aliquot of 950 μL of semen was treated with 20 μL of formol-citrate and 10 μL of a propidium iodide (PI) solution (0.5 mg PI in 1 mL 0.9% NaCl solution) and 20 μL of carboxyfluorescein diacetate (CFDA) solution (0.46 mg CFDA in 1 mL DMSO) and incubated for 8 min at 30° C. Samples were analyzed using a fluorescence microscope (1000x; Zeiss® model Axiolab, filters 450-490 excitation and FT510 - LP520 emission, Zeiss, Oberkochen, Germany). A total of 100 cells were counted. Sperm stained totally in green were considered to be cells with good plasma membrane integrity. Cells stained red were considered to be damaged sperm (HARRISON; VICKERS, 1990). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Selection chambers

Two different chambers were made with two PVC (polyvinyl chloride) elbows connected with a 3 cm PVC pipe (Tigre Tubos e conexões, Tigre S.A., Joinville, Brazil). One chamber had an inner diameter of 26 mm (Small Device - SD) and the other one an inner diameter of 36 mm (Large Device - LD). Those chambers were roughly divided

in half by a 5 μm pore synthetic membrane filter (Sterlitech Corporation, Kent, WA, USA) (Fig. 1). Both devices were cleaned and sterilized before each use.

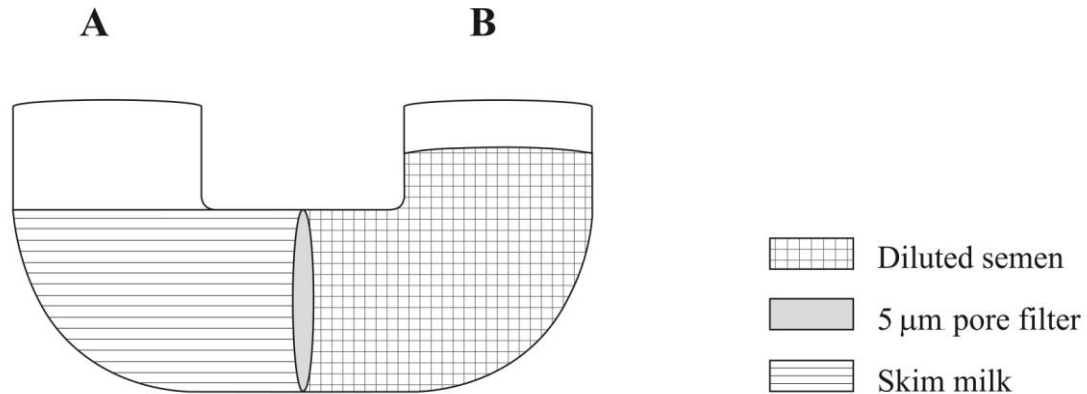


Fig. 1. Schematics of the filtration chambers device and filter position.

2.4. Experimental design

Immediately after dilution (T0), each semen samples was analyzed by CASA, concentration was calculated, and plasma membrane functionality and integrity were evaluated. Skim milk at 37° C was placed in 'A' side of the chamber (Fig. 1), in an amount sufficient to cover the pore synthetic membrane, i. e. 30 mL in the SD and 40 mL in the LD. In the 'B' side of the chamber (Fig. 1) a sample of the extended semen, with known number of spermatozoa was deposited in order to cover the total area of the membrane.

After 7 min (T7) and 15 min (T15) a sample was obtained from the 'A' side of each chamber and its sperm concentration was calculated, analyzed by CASA and plasmatic functionality and integrity evaluated. At T15 the 'A' side was emptied in a graduate cylinder, the volume measured and the number of total progressive spermatozoa calculated. This measurement was not done at T7 because it would interrupt the filtration process.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed using computer software Statistix, version 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). A one-way ANOVA was performed to evaluate concentration, total motility, progressive motility, VCL, VSL, VAP, LIN max and min,

ALH max and min BCF membrane plasmatic integrity and functionality as a dependent factors and device diameter and treatments as independent variables. The Tukey post hoc test was used to locate differences in data with normal distribution; otherwise Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric test was employed. $P < 0.05$ was regarded as significant.

3. Results

Semen parameters observed from samples filtered in two devices (SD and LD) after two filtration times (T7 and T15) and presenting significant differences ($P < 0.05$) are depicted in the Table 1. No differences ($P > 0.05$) were observed in VCL, VAP, LIN max and min, ALH min, BCF.

Table 1: Semen parameters observed from samples filtered with two devices (SD and LD) after two filtration times (T7 and T15) and immediately after dilution (T0). Values represent mean \pm SE.

Parameter	T0	T7		T15		P
		SD	LD	SD	LD	
Total motility (%)	66 \pm 4.5 ^a	84 \pm 2.9 ^b	88 \pm 2.9 ^b	85 \pm 3.9 ^b	83 \pm 5.4 ^b	0.031
Progressive motility (%)	51 \pm 4.4 ^a	75 \pm 3.7 ^b	81 \pm 3.7 ^b	74 \pm 4.4 ^b	75 \pm 5.6 ^b	< 0.001
VSL ($\mu\text{m/s}$)	45 \pm 3.6 ^a	62 \pm 4.1 ^b	62 \pm 3.5 ^b	61 \pm 4.1 ^{ab}	61 \pm 4.9 ^{ab}	0.007
ALH maximum (μm)	4.2 \pm 0.1 ^a	3.3 \pm 0.2 ^b	3.2 \pm 0.2 ^b	3.5 \pm 0.2 ^b	3.8 \pm 0.1 ^{ab}	< 0.001
Concentration ($10^6/\text{mL}$)	77 \pm 18.1 ^a	9 \pm 1.3 ^{bc}	5 \pm 2.8 ^b	16 \pm 7.7 ^c	9 \pm 2.4 ^{bc}	< 0.001
Plasma membrane functionality	55 \pm 3.5 ^a	66 \pm 2.9 ^{ab}	76 \pm 2.4 ^b	70 \pm 5.3 ^{ab}	76 \pm 3.7 ^b	< 0.001
Plasma membrane integrity	73 \pm 2.8 ^a	88 \pm 1.9 ^b	93 \pm 1.2 ^b	91 \pm 2.3 ^b	92 \pm 1.6 ^b	< 0.001

Different letters in the same line represent significant differences ($P < 0.05$). Abbreviations: VSL, straight-line velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; SD 26 mm and LD 36 mm diameter. T0 extended semen, T7 and T15 filtered semen after 7 min and 15 min respectively.

The total number of progressive spermatozoa observed after 15 min filtration (T15) in the two devices (SD and LD) is expressed in Fig. 2. No differences ($P > 0.05$) were observed between the number of progressive sperm filtered by the SD and LD.

However, the amount of progressive motile spermatozoa recovered in SD and LD were lower ($P < 0.05$) in comparison with the non filtered (T0).

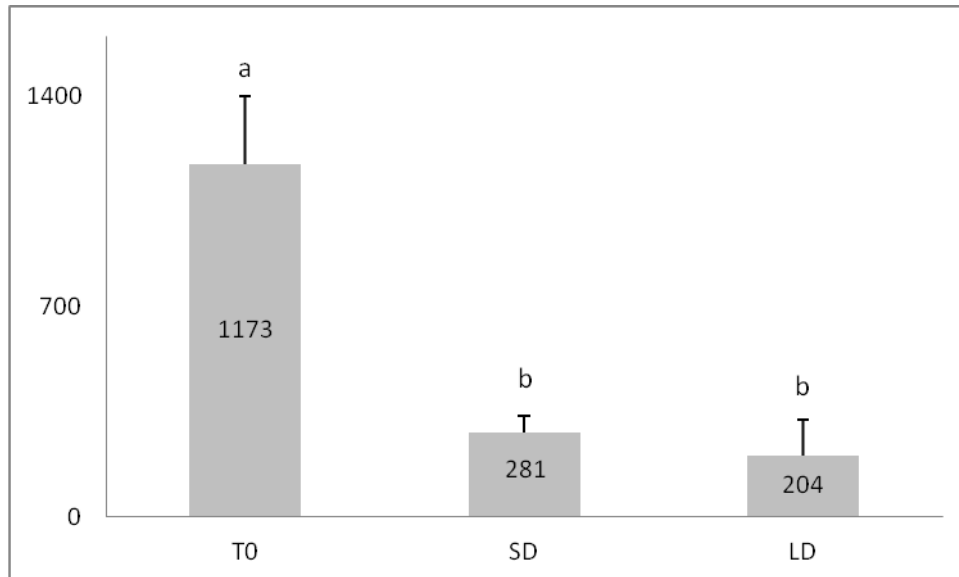


Fig. 2. Total number of progressive spermatozoa (10^6) observed after 15 min filtration (T15) in the two devices (SD – 26 mm and LD – 36 mm diameter). Values represent mean \pm SE. Superscripts (^{a,b}) represent significant ($P < 0.001$) differences between treatments.

4. Discussion

The ideal sperm separation technique should (I) be quick, easy and cost-effective, (II) isolate as many motile spermatozoa as possible, (III) not cause sperm damage or nonphysiological alterations of the separated sperm cells, (IV) eliminate dead spermatozoa and other cells, including leukocytes, (V) eliminate toxic or bioactive substances like decapacitation factors or ROS, and (VI) allow processing large volumes of ejaculates (HENKEL; SCHILL, 2003). No technique can achieve all six characteristics. In this study, samples from both devices showed an improvement in items number I, III, IV and VI when compared with the initial samples, at 7 min and 15 min.

The diameter of 5 μ m pore was selected based on stallion spermatozoa size and shape. Its head is oval, elongated, relatively flat, with the anterior third being the widest part, and a longitudinal section that has an approximately elliptical shape, with a slightly thicker posterior end (BRITO, 2007). Reported means for dimensions of stallion spermatozoon head include 5.3 μ m to 6.6 μ m for length and 2.8 μ m to 3.3 μ m for

maximum width (HIDALGO et al., 2005; BRITO, 2007). In consequence, motile spermatozoon can cross the membrane. The vertical position of the membrane minimizes the passage of immotile spermatozoa by gravity, favoring progressive motile spermatozoa to cross the membrane. This was clear after a couple attempts (unpublished data) positioning the membrane filter in the bottom of the device.

The increase in total motility and progressive motility agrees with many other studies where the selection of viable sperm cells was performed using glass wool, glass beads and single-layer centrifugation (CASEY et al., 1993; ENGEL et al., 2001; MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ; JOHANNISSON, 2010; PESSOA et al., 2017). This increase in motility was demonstrated in prior studies and attributed to elimination of poor-quality spermatozoa (CASEY et al., 1993; SIEME et al., 2003).

In the present experiment, VSL was significantly higher in both devices (SD and LD) at 7 min when compared to initial evaluation. At 15 min no difference was observed. Sperm velocity parameters, especially VSL, have been highly correlated with fertility in rats (MOORE; AKHONDI, 1996), and in pigs VSL affected total number of born piglets (BROEKHUIJSE et al., 2015). Differences between the VSL of sperm with different fertilization rates were also observed in humans (HIRANO et al., 2001). However, in one study with stallions (BARRIER BATTUT et al., 2017) VSL did not significantly differ between three fertility groups.

In the present study, ALH maximum decreased when compared with the initial sample. When considering the use of sperm for AI, high values of ALH may not be desirable, because such movement wastes a lot of unnecessary energy during dislocation through the female reproductive tract (NASCIMENTO et al., 2008). Probably, the low ALH observed in the filtered sperm in relation to the non-filtered optimizes the energy reserves from the spermatozoa and allows the higher VSL observed.

Functional integrity of the plasma membrane is critical to normal spermatozoal metabolism and function; the more spermatozoa identified with these characteristics the better the quality of the semen sample (NIE; WENZEL, 2001). In fact, HOST is thought to have the advantage of indicating not only whether the membrane is intact but whether it is osmotically active (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2003). We expected that both devices would show difference compared to initial sample, but only the LD differed from the initial sample. This results obtained in the HOST might be attributed to fluid dynamics, as the SD had the highest extended semen column, forcing some spermatozoa through the pores.

After semen selection, samples showed higher percentages of membrane integrity, assessed using CFDA/PI. A previous study determined that total motility and sperm membrane integrity values were similar immediately after collection, indicating that in fresh semen, a membrane-intact sperm would most likely be motile (FOSTER et al., 2011), corroborating our findings.

The low concentration obtained after selection in this study, might not be a problem. Concentrations of 4 and 25×10^6 sperm/mL for fresh semen did not affect pregnancy rates (SIEME et al., 2004). Another study using concentration of 2.5×10^6 sperm/mL showed no evidence of an adverse “dilution effect” (HAYDEN et al., 2015).

No differences among devices in regard to the total number of progressive motile spermatozoa (PMS) were observed in the present experiment. This number can be sufficient for an insemination dose containing enough viable spermatozoa (BRINSKO, 2006). The recommendations of the World Breeding Federation of Sport Horses (2016) are 300×10^6 PMS in fresh semen and 600×10^6 PMS in cooled-transported semen. However, the commercially optimal sperm dose may be smaller but is largely dependent on the stallion (SIEME et al., 2003; KATILA, 2005). Low volumes and sperm numbers have been overcome with deep AI techniques, but unexpected good pregnancy rates have been reported also after standard uterine body inseminations using $\leq 50 \times 10^6$ PMS (KATILA, 2005). In one study, doses using 200×10^6 PMS exceeded the optimum fertility threshold value, therefore no differences were seen with respect to per cycle fertility after insemination (SIEME et al., 2003). With one filtration we recovered an average of 204×10^6 PMS in the LD device and 281×10^6 PMS in the SD while on single-layer centrifugation the recovery of total number of spermatozoa obtained was 32×10^6 (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

There might be a way to enhance the proportion of PMS throughout selection. Rheotaxis is the orientation of cells and organisms within a gradient of fluid flow. Positive rheotaxis is the tendency of a cell to swim against the flow (MIKI; CLAPHAM, 2013). It is a major influence in the long distance guidance of mammalian sperm to the egg (MIKI; CLAPHAM, 2013). One study found that 80% of the human sperm orient themselves against the flow at a flow rate of 3 μ L per min (TUNG et al., 2014).

The selection device used in this experiment proved to be a practical and easy alternative for sperm selection. Selection using the chambers allows an improvement in kinetics, and membrane integrity and functionality independent of time and device diameter. One alternative approach to get a more concentrated sample is to use the

concentration filters proposed by Alvarenga et al. (2010; 2012) immediately after selection

Acknowledgments

The authors are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and FAPERGS for funding this study. The authors are thankful also to Maria José Estradé for English review and Cesar Camacho for statistical analysis on the present study.

Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a seleção espermática por membrana sintética é uma alternativa viável para o uso a campo devido a sua facilidade de manejo. A posição da membrana sintética evitou que espermatozoides imóveis a atravessassem por gravidade, sendo um fator fundamental para o resultado obtido.

O número total de espermatozoides com motilidade progressiva, características cinéticas, funcionalidade e integridade de membranas superiores em relação aos padrões iniciais mostram que uma ou até mesmo mais doses inseminantes, dependendo da técnica de inseminação utilizada, sejam obtidas. Assim, tornando ainda mais acessível a utilização deste método de seleção.

Esta forma de selecionar espermatozoides através de membrana sintética ainda é incipiente, com muito para evoluir. O desenvolvimento de novos modelos podem se mostrar mais eficientes, aumentando a proporção de espermatozoides com motilidade progressiva recuperados.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MAGALHÃES, L. C. O.; PAPA, F. O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, V. 121S, p. 186-187, 2010.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; KIEVITSBOSCH, T.; CHAVES, M. M.; NETO, C.R. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 424-429, 2012.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 317-325, 2002.
- AURICH, C. Recent advantages in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v 107; p. 268-275, 2008.
- AURICH, J. E. Artificial insemination in horses – more than a century of practice and research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 458-463, 2012.
- BALL, B. A. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28 (11), p. 650-665, 2008.
- BALL, B. A.; MOHAMMED, H. O. Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. **Theriogenology**, v. 44, p. 367-377, 1995.
- BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.
- BANASZEWSKA, D.; ANDRASZEK, K.; ZDROWOWICZ, E.; DANIELEWICZ, A. The effect of selected staining techniques on stallion sperm morphometry. **Livestock Science**, v. 175, p. 128-132, 2015.
- BARRIER BATTUT, I.; KEMPFER, A.; LEMASSON, N.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 97, p. 186-200, 2017.
- BAUMBER-SKAIFE, J. Evaluation of Semen. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds.). Wiley-Blackwell: West Sussex. **Equine Reproduction**. 2 ed., v. 1, p. 1278-1291, 2011.
- BOWEN, J. M. Historical Perspectives of Artificial Insemination. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds.). Wiley-Blackwell: West Sussex. **Equine Reproduction**. 2 ed., v. 1, p. 1261-1267, 2011.
- BOYLE, M. S. Artificial insemination in the horse. **Annales de Zootechnie**, v. 41, p. 301-308, 1992.

BRISKO, S. P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v. 66, p. 543–550, 2006.

BRISKO, S. P. Semen Collection Techniques and Insemination Procedures. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds.). Wiley-Blackwell: West Sussex. **Equine Reproduction**. 2 ed., v. 1, p. 1268-1277, 2011.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 249-264, 2007.

BRITO, L. T.; ALTHOUSE, G. C.; AURICH, C.; CHENOWETH, P. J.; EILTS, B. E.; LOVE, C. C.; LUVONI, G. C.; MITCHELL, J. R.; PETER, E. T.; PUGH, D. G.; WABERSKI, D. Andrology laboratory review: evaluation of sperm concentration. **Theriogenology**, v. 85, p. 1507-1527, 2016.

BROEKHUIJSE, M. L.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. **Theriogenology**, v. 76, p. 1473-1486, 2011.

BROEKHUIJSE, M. L.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B. M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 779-789, 2015.

CASEY, P. J.; ROBERTSON, K. R.; LIU, I. K. M.; ESPINOZA, S. B.; DROBNIS, E. Z. Column separation of motile sperm from stallion semen. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 142-148, 1993.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 305-311, 2003.

DAVIES MOREL, M. C. G. **Equine Artificial Insemination**. CABI Publishing: Oxon, 406 p. 1999.

EDDY, E. M. The Spermatozoon. In: NEILL, J. D. (Ed.) Elsevier Academic Press: San Diego. **Neill's Physiology of Reproduction**. 3 ed., v. 1, p. 3-54, 2006.

ENGEL, S.; WEBER, H.; PETZOLDT, R.; SEIDL, B.; WIEHE, W.; SPERL, J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 33, p. 223-230, 2001.

FOOTE, R. H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **Journal of Andrology**, v. 3, p. 85-100, 1982.

FOSTER, M. L.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, p. 1499-1505, 2011.

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

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, p. 792-713, 2004.

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

HAYDEN, S. S.; BLANCHARD, L. T.; BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K.; LOVE, C. C. The "dilution effect" in stallion sperm. **Theriogenology**, v. 83, p. 772-777, 2015.

HEAPE, W. The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilization or impregnation of their ova. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 61, p. 52-63, 1897.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14; 1, p. 108, 2003.

HIDALGO, M.; RODRIGUES, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Veterinary Medicine (Prague)**, v. 50, p. 24-32, 2005.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; YAMAGUCHI, C. TSUNODA, H.; SATO, I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, p. 213-218, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; LUKOSEVICIUTE, K.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. **Theriogenology**, v. 63, p. 160-178, 2005.

KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 31-38, 2005.

KIM, S. H.; YU, D. H.; KIM, Y. J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 106-114, 2010.

LAGARES, M. A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v. 32, p. 163-167, 2000.

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 and Fertility**, v. 84, p. 551-556, 1988.

LEWIS, N. Pushing the boundaries in equine breeding. **The Arabian Magazine**, <<http://thearabianmagazineonline.com/issue/october-2012/article/pushing-the-boundaries-in-equine-breeding>> Acesso em: 26 set 2107.

- LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, p. 278-282, 1991.
- MACPHERSON, M.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; THOMPSON, J. A.; VARNER, D. D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallion. **Theriogenology**, v. 58, p. 317-320, 2002.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48, p. 523-530, 1997.
- MATTOS, R. C.; CAVALHEIRO, E. P.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M. Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco diluído em éguas árabe. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 24(2), p. 57-64, 1996.
- MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; SAQLAN NAQVI, S. M. Motility, acrossome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 141-148, 2009.
- METHA, A.; SIGMAN, M. Identification and preparation of sperm for ART. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, p. 169-180, 2014.
- MIKI, K.; CLAPHAM, D. E. Rheotaxis guides mammalian sperm. **Current Biology**, v. 23, p. 443-452, 2013.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 1171-1189, 1998.
- MONTANARO GAUCI, M.; KRUGER, T. F.; COETZEE, K.; SMITH, K.; VAN DER MERWE, J. P.; LOMBARD, C. J. Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. **Andrologia**, v. 33, p. 135-141, 2001.
- MOORE, H. D.; AKHONDI, M. A. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 50-60, 1996.
- MORRELL, J. M.; RICHTER, J.; MARTINSSON, G.; STUHTMANN, G.; HOOGEWIJS, M.; ROELS, K.; DALIN, A. M. Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without single layer centrifugation. **Theriogenology**, v. 82, p. 1102-1105, 2014.

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

MORREL, 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.

MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. An overview of low dose insemination in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 206-210, 2002.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma acrosomal and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

NETO, C. R.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 40-43, 2013.

NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 103–109, 2003.

NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to asses functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005-1018, 2001.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PERRY, E. J. Historical background. In: _____. (Ed). Rutgers University Press: New Brunswick. **The Artificial Insemination of Farm Animals**. 4 ed., p. 3-12. 1968.

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

PESSOA, G. A.; MARTINI, A. P.; TRENTIN, J. M.; MINELLA, T.; FIORENZA, M. F.; RUBIN, M. I. B. Response to cooling of pony stallion sêmen selected by glass wool filtration. **Andrologia**, 00:e12771, 2017.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SERRES, C.; FENEUX, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. **Gamete Research**, v. 9, p. 183-195, 1984.

SIEME, H. Semen Evaluation. In: SAMPER, J. C. (Ed.) Saunders Elsevier: Saint Louis. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2 ed., p. 57-74, 2009.

SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v. 62, p. 915-928, 2004.

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

SQUIRES, E. L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, p. 268-273, 2009.

TREIN, C. R. Percoll e plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C. 2004, 70 f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TREIN, C. R.; NEVES, A. P.; BRITO, E. L. R.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; GREGORY, R. M.; MATOS, R. C. Percoll and seminal plasma during cooled storage of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 353, 2008.

TUNG, C. K.; ARDON, F.; FIORE, A. G.; SUAREZ, S. S.; WU, M. Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. **Lab on a Chip**, v. 14, p. 1348-1356, 2014.

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

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 16-24, 2015.

VARNER, D. D.; LOVE, C. C. Semen Evaluation. In: Annual meeting of the italian association of equine veterinarians, 9, 2003, Pisa, Italy. **Proceedings...** Pisa, Italy: SIVE, 2003.

VERBECKMOES, S.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Intra-uterine insemination in farm animals and human. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 195-204, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. WHO Press: Geneva, 271p. 2010.

WORLD BREEDING FEDERATION OF SPORT HORSES, 2016,
<<http://www.wbfs.org/files/Semen%20standards.pdf>>. Acesso em: 20 mar 2107.

YELUMALAI, S.; KASHIR, J.; JONES, C. BAGHERI, H.; OO, S. L.; MCLAREN, L.; COWARD, K. Clinician induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and functional of human sperm. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 1, p. 69-75, 2012.