

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Segregação de células somáticas seminais de bovinos e ovinos  
frente a diferentes diluentes para resfriamento e congelamento  
de sêmen**

Autora: Ana Laura da Silva Feijó

PORTO ALEGRE, março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Segregação de células somáticas seminais de bovinos e ovinos  
frente a diferentes diluentes para resfriamento e congelamento  
de sêmen**

Autor: Ana Laura da Silva Feijó

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

PORTO ALEGRE, março de 2022.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

### CIP - Catalogação na Publicação

Feijó , Ana Laura da Silva

Segregação de células somáticas seminais de bovinos e ovinos frente a diferentes diluentes para resfriamento e congelamento de sêmen / Ana Laura da Silva Feijó . -- 2022.

90 f.

Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. glicerol. 2. segregação celular. 3. sêmen bovino e ovino. 4. gradiente de Percoll®. 5. bovinos e ovinos. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ana Laura da Silva Feijó

**Segregação de células somáticas seminais de bovinos e ovinos  
frente a diferentes diluentes para resfriamento e congelamento  
de sêmen**

Aprovado em 29 de março de 2022, às 9 h.

Aprovado por:

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini – FAVET/UFRGS  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr. – FAGRO/UFRGS  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior – FAVET/UEMA  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Luís Henrique de Aguiar – Cornell University, EUA  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, Sandro e Silvia por serem sempre um exemplo de caráter e dedicação e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Karen e Marcela, por todo o incentivo, amor, conselhos.

Aos meus sobrinhos e afilhados, Érica, Pedro, Sara, Guilherme, Leonardo e Augusto, pelos ensinamentos e pelo amor sincero, a tia/dinda ama vocês.

Ao meu noivo, William, que me incentiva a ser uma pessoa melhor todos os dias. A ti, meu amor, agradeço por todos os conselhos, companheirismo e demonstrações de amor.

Ao meu orientador Professor Marcelo Bertolini, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança, por compartilhar seus conhecimentos e principalmente pelo empenho em tornar este trabalho possível. Obrigada, além de tudo, pela amizade e incansável disposição em me ajudar.

Ao Prof. Dr. José Luiz R. Rodrigues por todas as valiosas correções e dicas para continuidade do trabalho, que me ajudaram a tomar decisões importantes.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelo aprendizado, pela amizade, pelos conselhos e pela educação de qualidade.

Aos colegas e amigos do laboratório de embriologia, pelo companheirismo, amizade, pela colaboração no trabalho e pelas boas conversas na hora do café.

Aos amigos, Morgana, Tia Helena, Tio Mogar, Higor, Victor e César obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por tornar esta caminhada mais divertida e cheia de boas histórias.

Muito obrigada!

## RESUMO

A ocorrência de células somáticas no sêmen possibilita seu uso para a produção *in vitro* (PIV) de embriões pela clonagem animal por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Visando o melhor aproveitamento desta fonte de material biológico, Nel-Themaat e colaboradores propuseram em 2008 um protocolo com o gradiente de Percoll<sup>®</sup> que possibilita o isolamento de células somáticas seminais (CSS) e espermatozoides (STPZ) de uma mesma dose de sêmen para uso na clonagem animal e na fecundação *in vitro* (FIV), respectivamente. Porém, ao aplicarmos tal protocolo para o sêmen bovino e ovino, observamos diferentes resultados de segregação celular, dependendo das características da amostra. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes diluentes para refrigeração e congelamento de sêmen bovino e ovino frente ao processo de segregação de CSS e SPTZ viáveis utilizando um gradiente de Percoll<sup>®</sup>. Para tanto, foi utilizado o sêmen de três carneiros cruzas Texel e de quatro touros Brangus, todos machos adultos e férteis. O ejaculado de cada macho foi dividido em oito grupos, sendo uma amostra de sêmen fresco e sete amostras diluídas em cinco diluentes comuns para ambas as espécies (Tris-Gema, TG; Citrato-Gema, CG; Tris-Gema-Glicerol, TGG; Citrato-Gema-Glicerol, CGG; e um diluente comercial), e em dois diluentes específicos para cada espécie (Leite Desnatado, LD e Leite Desnatado-Glicerolado, LDG, para ovinos; ou Lactose-Gema, LG e Lactose-Gema-Glicerol, LDG, para bovinos), para a refrigeração por 24 h (diluente sem glicerol TG, CG, LD) ou para a congelamento (diluente com glicerol TGG, CGG, LDG, comercial). A avaliação do perfil de segregação de CSS foi realizada após a coleta do sêmen fresco (-3 h), quando o sêmen diluído atingiu o equilíbrio a 5°C (0 h), e 24 h após o equilíbrio a 5°C (sêmen refrigerado), ou após o descongelamento (sêmen congelado). Cada uma das oito amostras distintas de cada ejaculado, nos diferentes tempos, foi submetida à centrifugação para a segregação celular em gradiente de 20/50/90% de Percoll<sup>®</sup>. Cada amostra foi então coletada em quatro frações do gradiente, sendo a FTI a fração superficial do gradiente de 20% de Percoll<sup>®</sup>; a FTII a fração entre os gradientes de 20% e 50% de Percoll<sup>®</sup>; a FTIII a fração remanescente do gradiente de 50% de Percoll<sup>®</sup>; e a FTIV a fração contendo o *pellet* formado no gradiente de 90% de Percoll<sup>®</sup>. Cada fração foi analisada quanto à presença de CSS, espermatozoides e debris celulares, com os dados analisados por ANOVA e Tukey, e pelos testes de Kruskal-Wallis, X<sup>2</sup> e correlação simples de Pearson (P<0,05). Nos ovinos e bovinos, não houve diferença no número total de CSS obtidas entre os diluentes, em cada tempo de análise (0 h e 24 h), mas houve diferença entre diluentes quanto à segregação de acordo com as frações de Percoll<sup>®</sup>, indicando uma migração celular distinta entre os diluentes, para cada espécie, sendo em geral semelhantes entre os tempos, para o mesmo diluente. Em ovinos, o diluente à base de leite desnatado, quando sem glicerol, rendeu um elevado número e proporção de CSS na FTI (LG, 78,1%), enquanto que a adição de glicerol concentrou as CSS na FTII (LDG, 70,5%). Já o sêmen fresco e os diluentes com gema de ovo e sem glicerol apresentaram um maior número e proporção de CSS na FTIII (Fresco, 61,9%; CG, 68,1%; TG, 68,3%). A adição de glicerol ao citrato-gema (CGG) concentrou as CSS na FTII (62,5%). Por fim, os diluentes TGG e o comercial segregaram as CSS na FTIV no t=0 h (64,6% e 66,6%, respectivamente) e na FTIII no t=24 h (70,2% e 50,7%, respectivamente). Em bovinos, o sêmen fresco e o diluente CG concentraram as CSS na FTI (49,1 e 57,5%), enquanto os diluentes TG e LG concentraram as CSS na FTIII (TG, 60,7%) e FTIV (LG, 68,0%). A adição de glicerol alterou o perfil de migração do TGG para a fração FTIV (52,1%) e do LDG para a FTIII (63,9%). O diluente comercial, com glicerol, segregou as CSS em maior proporção nas frações FTIII (31,1%) e FTIV (44,6%). Já o diluente CGG, com glicerol, segregou as CSS na FTIII no t=0 h (46,7%) e na FTIV no t=24 h (42,0%). Em resumo, concluímos que a migração das CSS (número e proporção por frações) se manteve semelhante entre os animais de cada espécie. Porém, a proporção de CSS segregadas dos ejaculados de bovinos e ovinos utilizando o gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi influenciada pela composição do diluente, em especial pelo uso da gema de ovo ou do leite desnatado, e principalmente pela presença ou não de glicerol nos diluentes.

**Palavras-chave:** glicerol, segregação celular, sêmen, gradiente de Percoll<sup>®</sup>, bovinos, ovinos.

## ABSTRACT

The occurrence of somatic cells in semen enables their use for *in vitro* production (IPV) of cloned embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedures. To make better use of such source of biological material, in 2008 Nel-Themaat and collaborators proposed a protocol using the Percoll<sup>®</sup> gradient that allows the isolation of both seminal somatic cells (SSC) and sperm cells (STPZ) from the same dose of semen for use in animal cloning and *in vitro* fertilization (IVF), respectively. However, when applying this protocol to bovine and ovine semen, we observed different cell segregation patterns, depending on the characteristics of the sample. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different semen extenders for the refrigeration and freezing of bovine and ovine semen on the process of segregation of viable CSS and SPTZ using a Percoll<sup>®</sup> gradient. Thus, semen from adult and fertile Texel crossbred rams (n=3) and Brangus bulls (n=4) was used for cell segregation. The ejaculate of each male was divided into eight groups, one of fresh semen and seven samples diluted in five common extenders for both species (Tris-Yolk, TY; Citrate-Yolk, CY; Tris-Yolk-Glycerol, TYG; Citrate-Yolk-Glycerol, CYG; and a commercial extender), and in two specific extenders for each species (Skimmed Milk, SM and Skimmed Milk-Glycerol, LDG, for sheep; or Lactose-Yolk, LY and Lactose-Yolk-Glycerol, LYG, for cattle), either for refrigeration for up to 24 h (without glycerol: TY, CY, SM) or for freezing (with glycerol: TYG, CYG, SMG, commercial). The evaluation of the CSS segregation profile was performed after fresh semen collection (-3 h), when the diluted semen reached equilibrium at 5°C (0 h), and 24 h after equilibrium at 5°C (refrigerated semen), or after thawing (frozen semen). Each of the eight different samples from each ejaculate, at different times, were submitted to centrifugation for cell segregation in a 20/50/90% Percoll<sup>®</sup> gradient. Each sample was then collected in four gradient fractions, the FTI being the surface fraction of the 20% Percoll<sup>®</sup> gradient; the FTII as the fraction between the of 20% and 50% Percoll<sup>®</sup> gradient; the FTIII as the remaining fraction of the 50% Percoll<sup>®</sup> gradient; and the FTIV as the fraction containing the pellet formed in the 90% Percoll<sup>®</sup> gradient. Each fraction was analyzed for the presence of SSC, sperm cells and cell debris, with data analyzed by ANOVA and Tukey, and by the Kruskal-Wallis, the  $X^2$  and the Pearson's simple correlation tests ( $P < 0.05$ ). In sheep and cattle, no differences were observed in the total number of CSS obtained between the extenders, at each time (0 h and 24 h), but a difference between extenders was observed between Percoll<sup>®</sup> fractions, indicating a cell migration pattern distinct between extenders, for each species, being generally similar between times, for the same extender. In sheep, the skimmed milk-based extender, when with no glycerol, yielded a high number and proportion of CSS in the FTI (LG, 78.1%), while the addition of glycerol concentrated the CSS in the FTII (SMG, 70.5%). Fresh semen and extenders with egg yolk and without glycerol had a higher number and proportion of CSS in the FTIII (Fresh, 61.9%; CY, 68.1%; TY, 68.3%). The addition of glycerol to citrate-yolk (CYG) concentrated the CSS in the FTII (62.5%). Finally, the TGG and commercial extenders segregated the SSC in the FTIV at t=0 h (64.6% and 66.6%, respectively) and in the FTIII at t=24 h (70.2% and 50.7%, respectively). In cattle, fresh semen and the CY extender concentrated CSS in the FTI (49.1 and 57.5%), while the TG and LG extenders concentrated SSC in the FTIII (TG, 60.7%) and FTIV (LY, 68.0%). The addition of glycerol altered the migration profile of SSC in the TYG to the FTIV (52.1%) and in the SMG to the FTIII (63.9%) Fractions. The commercial extender, with glycerol, segregated the SSC in greater proportion in both the FTIII (31.1%) and FTIV (44.6%) fractions. Finally, the CYG extender, with glycerol, segregated the SSC in the FTIII at t=0 h (46.7%) and in the FTIV at t=24 h (42.0%). In summary, we concluded that the migration of SSC (number and proportion of cells by fraction) remained similar between animals of each species. However, the proportion of SSC segregated from the bovine and ovine semen using the Percoll<sup>®</sup> gradient was influenced by the composition of the extender, especially by the use of egg yolk or skimmed milk, and mainly by the presence or absence of glycerol in the extenders.

**Keywords:** glycerol, cell segregation, semen, Percoll<sup>®</sup> gradient, cattle, sheep.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais etapas da clonagem reprodutiva e terapêutica em comparação com a fecundação natural. Topo-fecundação natural: Os oócitos em metáfase II (estágio de MII) são fecundados e ativados por espermatozoides, formando os pronúcleos (PN) paterno e materno, passando por clivagens sucessivas até atingirem o estágio de blastocisto. Abaixo-clonagem reprodutiva: Os núcleos das células somáticas doadoras são introduzidos em oócitos enucleados, sofrendo rapidamente a quebra da membrana nuclear (QMN) e uma condensação cromossômica prematura (CCP). Os oócitos reconstruídos por TNCS são ativados artificialmente para iniciar o desenvolvimento embrionário (Adaptado de MATOBA & ZHANG, 2018)..... 19
- Figura 2.** Representação esquemática do processo de segregação celular utilizado neste estudo, estando à esquerda disposta a representação do gradiente de Percoll® com três camadas de 250 µL, nas concentrações de 20%, 50% e 90%, onde foram dispostas as amostras de sêmen para segregação em volume de 10 µL para sêmen fresco de ovinos, 100 µL para sêmen fresco de bovinos e 150 µL para cada amostras diluída, de ovinos e bovinos. Após a centrifugação a 400 G por 20 min, eram formadas camadas (halos) visíveis da segregação celular, sendo retiradas quatro frações de 150 µL para análise, de cada fração total (FTI, FTII, FTIII, FTIV)..... 34
- Figura 3.** Representação esquemática dos grupos experimentais, sendo exemplificado apenas para um macho de cada espécie e para um tratamento. Fresco: sêmen fresco após a coleta e avaliação macro- e microscópica. Diluentes de sêmen a base de Tris-Gema (TG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado (LD, para carneiros), Tris-Gema Glicerol (TGG), Citrato-Gema Glicerol (CGG), Leite Desnatado Glicerolado (LDG, para carneiros), Lactose-Gema (LG, para touros), Lactose-Gema Glicerol (LGG, para touros) e BotuBOV® (diluente comercial)..... 35
- Figura 4.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm). <sup>a,b</sup>: Colunas com diferentes superescritos em cada fração total diferem estatisticamente (P<0,05). <sup>A,B,C</sup>: Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada método de conservação de sêmen diferem estatisticamente (P<0,05)..... 47
- Figura 5.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm). <sup>a,b</sup>: Colunas com diferentes superescritos em cada fração entre métodos de conservação de sêmen diferem estatisticamente (P<0,05). <sup>A,B,C</sup>: Colunas com diferentes

superescritos entre frações totais para cada método de conservação de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )..... 49

**Figura 6.** Porcentagem de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos em cada fração total, entre os tempos de análises, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada tempo de análise de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )..... 52

**Figura 7.** Porcentagem de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos em cada fração total, entre os tempos de análises, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada tempo de análise de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )..... 54

**Figura 8.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração (I, II, IV) e nos totais de frações (I+II+IV e Total) de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, em apenas no  $t=0$  h ou  $t=24$  h ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, para ambos os tempos ( $P < 0,05$ )..... 57

**Figura 9.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração (I, II, IV) e nos totais de frações (I+II+IV e Total) de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média  $\pm$  epm;  $P > 0,05$ )..... 58

**Figura 10.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração (I, II, IV) e nos totais de frações (I+II+IV e Total) de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente, visto não haver diferença entre os tempos de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, em apenas no  $t=0$  h ou  $t=24$  h ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, para ambos os tempos ( $P < 0,05$ ). \*tendência estatística entre diluentes ( $P < 0,1$ )... 61

**Figura 11.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração (I, II, IV) e nos totais de frações (I+II+IV e Total) de 150  $\mu\text{L}$  retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de

diluyente, visto não haver diferença entre os tempos de análise (média  $\pm$   
epm;  
P>0,05)..... 62

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características seminais após avaliação macroscópica dos ejaculados ovino e bovino\* ..... 37
- Tabela 2.** Características seminais após avaliação microscópica dos ejaculados ovino e bovino\* ..... 37
- Tabela 3.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm)..... 44
- Tabela 4.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm, em %)..... 44
- Tabela 5.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm)..... 45
- Tabela 6.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm, em %)..... 45
- Tabela 7.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)..... 46
- Tabela 8.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)..... 47
- Tabela 9.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)..... 48
- Tabela 10.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)..... 49
- Tabela 11.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm)..... 51

<b>Tabela 12.</b> Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm).....	51
<b>Tabela 13.</b> Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm) .....	53
<b>Tabela 14.</b> Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm) .....	53
<b>Tabela 15.</b> Número de células somáticas seminais ovinas obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média ± epm).....	55
<b>Tabela 16.</b> Número (média ± epm) e proporção (%) de células somáticas seminais bovinas obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise.....	60
<b>Tabela 17.</b> Proporção de células somáticas seminais ovinas viáveis, não viáveis e totais obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação do sêmen ovino (média ± epm).....	64
<b>Tabela 18.</b> Proporção de células somáticas seminais bovinas viáveis, não viáveis e totais obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação do sêmen ovino (média ± epm).....	65
<b>Tabela 19.</b> Motilidade e vigor dos espermatozoides ovinos pré- e pós-segregação com o gradiente de Percoll®, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média ± epm).....	68
<b>Tabela 20.</b> Motilidade e vigor dos espermatozoides bovinos pré- e pós-segregação com o gradiente de Percoll®, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média ± epm).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AT	Azul de tripano
BSA	Albumina Sérica Bovina
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
CG	Citrato-Gema
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
EG	Etilenoglicol
EN	Eosina-Nigrosina
epm	Erro padrão médio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
GG	Glicina-Gema
GGG	Glicina-Gema-Glicerol
GLI	Glicerol
IA	Inseminação Artificial
kDa	QuiloDalton
LD	Leite Desnatado
LDG	Leite Desnatado Glicerolado
LG	Lactose-Gema
LGG	Lactose-Gema-Glicerol
PBS	Solução Salina Fosfatada
PI	Peça Intermédia
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
TG	TRIS-Gema
TGG	TRIS-Gema-Glicerol
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Célula Somática
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
UI	Unidade internacional
ZP	Zona pelúcida

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Células somáticas e clonagem animal .....	18
2.1.1 Células somáticas seminais (CSS).....	21
2.2 Criopreservação de sêmen .....	24
2.2.1 Diluentes ou diluidores de sêmen.....	25
2.2.2 Protetores de membrana celular.....	27
2.2.3 Agentes crioprotetores permeáveis .....	29
3. HIPÓTESES.....	32
4. OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo geral .....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
5.1 Local de realização do estudo.....	33
5.2 Meios e Reagentes .....	33
5.3 Delineamento experimental.....	33
5.4 Grupos experimentais .....	34
5.5 Metodologia.....	35
5.5.1 Coleta, avaliação e processamento do sêmen ovino e bovino .....	35
5.5.2 Segregação celular .....	39
5.6 Identificação, quantificação e avaliação da viabilidade celular.....	40
5.6.1 Avaliação da concentração e da viabilidade celular .....	40
5.6.2 Avaliação citológica .....	41
5.6.3 Avaliação da motilidade e vigor de motilidade espermáticos.....	41
5.7 Análise estatística .....	41

6. RESULTADOS.....	43
6.1 Recuperação de células somáticas seminais ovinas e bovinas .....	43
6.1.1 Efeito biológico dos animais .....	43
6.1.2 Método de preservação do sêmen .....	46
6.1.3 Efeito do tempo para a análise na segregação celular .....	50
6.1.4 Tipo de diluente e tempo de análise .....	53
6.1.5 Correlações entre a segregação de células viáveis por fração ....	63
6.2.1 Proporção de células somáticas seminais viáveis e não viáveis ..	63
6.2.2 Proporção de tipos celulares após a segregação por Percoll® .....	66
6.2.3 Motilidade e vigor dos espermatozoides.....	67
7. DISCUSSÃO .....	70
8. CONCLUSÕES .....	77
9. PERSPECTIVAS.....	78
10. REFERÊNCIAS.....	79
11. ANEXOS .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o último século, as biotécnicas da reprodução têm sido ferramentas importantes na produção pecuária mundial, tendo resultado em grandes avanços que têm auxiliado na resolução dos novos desafios do mundo moderno (VISHWANATH *et al.*, 2003; MOORE & HASLER, 2017; HINRICHS *et al.*, 2018). Tais tecnologias podem apresentar aplicações clássicas, como a inseminação artificial (IA) com sêmen congelado, ou abordagens inovadoras, como a validação do valor genético e a edição gênica (CORNELISSEN *et al.*, 2017; GEORGES *et al.*, 2019). Dentre as biotécnicas de maior relevância no mundo, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE) pela técnica de fecundação *in vitro* (FIV). Esta tecnologia consolida tecnicamente o melhor aproveitamento do valor ou mérito genético de ambos os reprodutores, pelo uso de sêmen congelado (até sexado) e de oócitos aspirados *in vivo*, contribuindo para o melhoramento de rebanhos comerciais (KNOX, 2014). De fato, mais de 878 mil embriões bovinos produzidos pela FIV foram transferidos em todo o mundo em 2020, em um aumento significativo no uso desta tecnologia nos últimos anos em todo o mundo (VIANA, 2021). A PIVE pela FIV também tem sido importante em estudos relacionados à infertilidade humana (GIANAROLI *et al.*, 2012), além de ser utilizada no ramo da ciência reprodutiva para monitorar e preservar espécies animais e sua biodiversidade (HOLT; BROWN; COMIZZOLI, 2014).

Outra biotécnica de destaque para a PIVE é a clonagem animal por transferência nuclear (TN), a qual também vem sendo utilizada para a conservação e resgate genético de raças ou espécies animais em perigo de extinção (KIM *et al.*, 2007; PERLEBERG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018). A clonagem animal também tem sido utilizada como técnica base para a produção de animais geneticamente modificados (YIN *et al.*, 2008; PRATHER *et al.*, 2017), além de agregar vantagens econômicas com a preservação e disseminação de linhagens genéticas superiores (WILMUT *et al.*, 1997; BREM *et al.*, 2002; KLINGER & SCHNIEKE, 2021). Uma das principais tecnologias utilizadas para o processo de clonagem é a transferência nuclear de célula somática (TNCS; PIERCE, 2012). Diferentes células somáticas podem ser isoladas para uso como doadoras de núcleo (carioplastos) no processo da

clonagem pela TNCS (GURDON, 1962; MCGRATH & SOLTER, 1983; WILMUT *et al.*, 1997; POLEJAEVA *et al.*, 2000; MATOBA & ZHANG, 2018; KLINGER & SCHNIEKE, 2021), podendo por sua vez serem obtidas de distintas origens, a partir de tecidos, órgãos ou mesmo de fluidos corporais, como o líquido seminal e o sêmen (PHILLIPS *et al.*, 1978; WOLFF & ANDERSON, 1988; HOMYK *et al.*, 1990; NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008).

Dentre as quatro gerações de biotécnicas da reprodução animal (THIBIER, 1995), e ao contrário da clonagem animal por TNCS, a qual possui uma aplicação mais limitada e pontual, a inseminação artificial (IA) já se consolidou como a biotécnica de amplo sucesso. Tal biotécnica pode por sua vez ser sub-dividida no que se refere à tecnologia do sêmen, com a coleta, avaliação e processamento do sêmen, e a IA propriamente dita, que se refere à deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea (IVANOFF, 1922; PERRY, 1945). Neste contexto, a criopreservação do sêmen animal é componente essencial da indústria de comercialização de sêmen para IA em escala global, especialmente em ruminantes, beneficiando também a sua aplicação na PIVE pela FIV. A crioconservação de sêmen permite um armazenamento em caráter *ad eternum*, o que propicia a disseminação de genética animal entre as mais diversas regiões geográficas no mundo (HASLER *et al.*, 2014). Interessantemente, a criopreservação de sêmen obviamente sempre visou a preservação adequada dos espermatozoides do ejaculado, células de pequeno tamanho com elevada proporção superfície/volume em comparação a células somáticas, as quais por sua vez apresentam uma presença seminal praticamente incidental. Interessantemente, a presença de células somáticas no sêmen ou ejaculado animal permite seu potencial uso como carioplastos pela clonagem por TNCS. Assim, células somáticas seminais (CSS) de amostras criopreservadas de sêmen de animais vivos, mortos ou mesmo extintos, tanto com interesse zootécnico quanto preservacionista, podem permitir o resgate genético de reprodutores machos de modo direto pela clonagem por TNCS (MIR *et al.*, 2005). A possibilidade combinada da segregação de CSS viáveis a partir de doses de sêmen animal, seja fresco, resfriado ou congelado, associada ao uso dos espermatozoides para a PIVE pela FIV, representa uma alternativa ainda mais interessante para o resgate genético de animais de interesse, em especial aqueles em que já não exista a

possibilidade de coleta de células somáticas de origens mais habituais para a clonagem. Desta forma, nosso grupo vem desenvolvendo protocolos de isolamento e caracterização de CSS presentes no sêmen bovino e ovino, bem como tem iniciado esforços para o cultivo *in vitro* e utilização de CSS em protocolos de clonagem animal por TNCS. O presente trabalho faz parte desta linha de pesquisa de nosso grupo, envolvendo aspectos essenciais quanto aos métodos de segregação de CSS do sêmen bovino e ovino fresco, resfriado e congelado.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

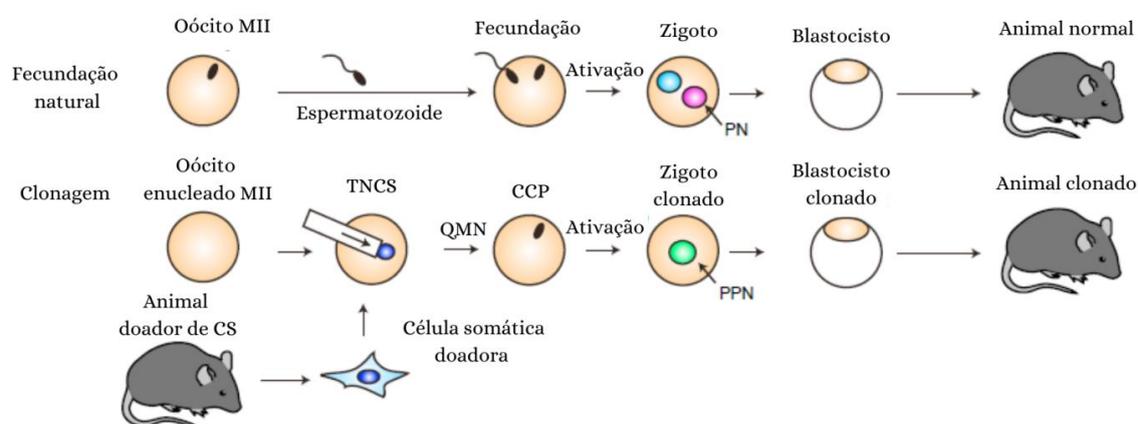
### 2.1 Células somáticas e clonagem animal

Tem-se por definição que as células somáticas são todas as células de um organismo multicelular, com exceção das linhagens germinativas (HIRSCH, 1963; PIERCE, 2012). A função deste tipo celular fez parte de um dos dogmas da biologia, onde era proposto que tais células, uma vez diferenciadas, não poderiam ser reprogramadas a um estado de toti- ou pluripotente (WILMUT *et al.*, 1997). Tal dogma acima se baseia no fato de que a totipotência é definida como a capacidade de uma célula em dar origem a todos os tipos de célula de um organismo, incluindo os tecidos extraembrionários, enquanto a pluripotência se dá pela capacidade de diferenciação em qualquer um dos três tipos de folheto embrionário: endoderma, mesoderma e ectoderma (LU & ZHANG, 2015).

Em condições normais do desenvolvimento de mamíferos, tais características são limitadas a zigotos ou blastômeros de embriões em estádios de pré-implantação, sendo a totipotência, então, gradualmente perdida durante o desenvolvimento pré-implantação para dar origem a células da massa celular interna (ICM) e do trofotoderma (TE; MATOBA & ZHANG, 2018). Porém, com o desenvolvimento da clonagem animal, tal dogma passou a ser questionado e refutado.

Com a ideia de avaliar em que ponto o potencial de desenvolvimento dos núcleos se tornaria restrito, surgiu em 1938, por Hans Spemann, estudos que deram base para a clonagem animal (TAGARELLI *et al.*, 2004). Mais de uma década depois, Robert Briggs e Thomas King (1952), ao estudarem sobre a ativação e desativação de genes durante o desenvolvimento celular de girinos, estabeleceram um experimento semelhante ao proposto por Hans Spemann, onde girinos foram clonados a partir de células diferenciadas. Entretanto, os clones, apresentaram um padrão de desenvolvimento anormal (BRIGGS & KING, 1952). Com isso, os autores concluíram que o potencial genético reduz à medida em que a diferenciação celular aumenta, impossibilitando a clonagem de um organismo com células diferenciadas, com o dogma da biologia persistindo por quase 50 anos.

Já na década de 1960, John Gurdon demonstrou que anuros podiam ser clonados a partir de células somáticas diferenciadas através da tecnologia de transferência nuclear de célula somática (TNCS; GURDON, 1962; Figura 1). Não obstante, após três décadas de estudos essencialmente em anfíbios, os primeiros mamíferos (espécie ovina) foram clonados por TN com sucesso primeiramente utilizando blastômeros (WILLADSEN, 1986), culminando posteriormente no nascimento da ovelha Dolly utilizando células somáticas diferenciadas, pela clonagem por TNCS (WILMUT *et al.*, 1997). Desde então, a clonagem por TNCS foi repetida em mais de 20 espécies mamíferas. Porém, ainda há vários obstáculos técnicos e biológicos que limitam a uso prático da tecnologia de clonagem por TNCS, como a baixa eficiência e a presença de anormalidades em tecidos extraembrionários (OGURA *et al.*, 2013); anormalidades pré-natais e mesmo após o nascimento, incluindo obesidade, imunodeficiência, deficiências respiratórias e maior mortalidade (OGURA *et al.*, 2013; LOI *et al.*, 2016), embora tais fenótipos não sejam aparentemente transmitidos para a prole (FULKA *et al.*, 2004; TAMASHIRO *et al.*, 2002; WAKAYAMA *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Principais etapas da clonagem reprodutiva e terapêutica em comparação com a fecundação natural. Topo-fecundação natural: Os oócitos em metáfase II (estágio de MII) são fecundados e ativados por espermatozoides, formando os pronúcleos (PN) paterno e materno, passando por clivagens sucessivas até atingirem o estágio de blastocisto. Abaixo-clonagem reprodutiva: Os núcleos das células somáticas doadoras são introduzidos em oócitos enucleados, sofrendo rapidamente a quebra da membrana nuclear (QMN) e uma condensação cromossômica prematura (CCP). Os oócitos reconstruídos por TNCS são ativados artificialmente para iniciar o desenvolvimento embrionário (Adaptado de MATOBA & ZHANG, 2018).

Mesmo que ainda ineficiente, a técnica de clonagem por TNCS vem sendo agregada a outras biotécnicas, como a produção de animais

geneticamente modificados (YIN *et al.*, 2008), tornando-se, também, uma alternativa de grande interesse para a conservação e recuperação de raças ou espécies animais em risco de extinção, ou mesmo já extintas, e para animais exóticos (KIM *et al.*, 2007). A clonagem por TNCS também pode agregar um impacto socioeconômico favorável na produção pecuária como ferramenta de inovação para a preservação de linhagens genéticas, como a oferta comercial de material genético qualificado e como resgate genético, sendo possível a utilização de diversos tecidos como material doador de células somáticas (WILMUT *et al.*, 1997; BREM *et al.*, 2002). Porém, vale ressaltar que a eficiência da técnica está comumente relacionada ao tipo, ao estado de diferenciação, à qualidade e à viabilidade da célula, sendo estas algumas das características mais importantes para a reprogramação epigenética adequada do núcleo doador, o que apresenta uma relação direta com o desempenho e a eficiência da clonagem por TNCS (BERTOLINI *et al.*, 2012).

Apesar de a capacidade de reaquisição de totipotência em células somáticas já ser possível experimentalmente há mais de meio século (GURDON & MELTON, 2008; MOURA, 2012; MATOBA & ZHANG, 2018), a clonagem por TNCS ainda apresenta diversas limitações (MOORE & HASLER, 2017; MOURA *et al.*, 2019). Há inclusive questões sociológicas, com relutância de segmentos da sociedade em aceitar produtos provenientes de animais clonados no ramo alimentar, mesmo que isto já tenha sido comprovado seguro por agências de padrões alimentares internacionais. Por exemplo, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA publicou em janeiro de 2008 a comprovação técnico-científica da segurança do consumo de carne e do leite de clones bovinos, suínos e caprinos, e também da prole de qualquer clone de animal (*Food and Drug Administration*, 2014). A aplicação da clonagem também deve levar em conta as questões econômicas de implementação e execução, devido ao alto custo do procedimento em si, em uma média de US\$ 15.000 a US\$ 20.000 cada (MOORE & HASLER, 2017).

Outro fator de extrema relevância é a baixa taxa de sucesso da técnica, com a presença de anormalidades, como altas taxas de perdas embrionárias e fetais, aborto, gestação prolongada, aumento do peso ao nascer, anomalias e redução da sobrevivência neonatal (BERTOLINI & ANDERSON, 2002; EDWARDS *et al.*, 2003; MIGLINO *et al.*, 2007; OBACK & WELLS 2007; MOORE &

HASLER, 2017; MOURA *et al.*, 2019). Tais eventos são resultantes de um perfil de expressão gênica e *status* epigenético alterados, que levam a anomalias como a hidropisia e hiperplasia cotiledonar em embriões derivados de TNCS (DEAN *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004; EVERTS *et al.*, 2008). Tais dados foram bem demonstrados por Heyman *et al.* (2005), em um estudo de transferência de embriões (TE) comparando os embriões produzidos *in vitro*, clonados a partir de células embrionárias, clonados com células fetais, e clonados com células adultas. Os autores relataram diferenças significativas na taxa de prenhez aos 70 dias, e até o parto, obtendo 49% de prenhez para os embriões produzidos *in vitro*, 37% para os clones de células embrionárias, 23% para os clones de células fetais, e 14% para os clones de células adultas, com as taxas parto de sendo, respectivamente, de 49%, 34%, 15% e 7%. Desta forma, foi observada uma frequência de perda fetal precoce, antes dos dois meses, duas vezes maior nos grupos de embriões clonados a partir de células fetais e células adultas em comparação aos clones de células embrionárias e aos produzidos *in vitro* pela FIV (HEYMAN *et al.*, 2005). De fato, cerca de 50% das gestações de clones não chegam a termo de forma fisiológica, variando de acordo com a linhagem celular (HEYMAN *et al.*, 2005). Além de apresentar perdas ao nascimento ou nos primeiros dias de vida, geralmente associada a gestações prolongadas com neonatos com excesso de peso e tamanho, um dos sintomas da *Large Offspring Syndrome* (LOS) ou *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS) com neonatos mais suscetíveis a afecções diversas (RENARD *et al.*, 1999; WELLS; MISICA; TERVIT, 1999; KATO *et al.*, 2000; HEYMAN *et al.*, 2005; MOORE & HASLER, 2017). Com isso, apenas cerca de 10% dos embriões transferidos levam a animais saudáveis e produtivos após o nascimento (MOORE & HASLER, 2017; MOURA *et al.*, 2019).

### **2.1.1 Células somáticas seminais (CSS)**

Como já mencionado, as células somáticas de um organismo multicelular são responsáveis pela formação de tecidos e órgãos. Estudos presentes na literatura comprovam a existência de células somáticas também em fluídos, tais como no líquido seminal de diversas espécies (PHILLIPS *et al.*, 1978; WOLFF & ANDERSON, 1988; HOMYK *et al.*, 1990; NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008). As CSS parecem apresentar distintas origens e funções. Em

humanos, por exemplo, foram encontradas células epiteliais e várias subpopulações de leucócitos, incluindo granulócitos, monócitos/macrófagos, linfócitos B, linfócitos T auxiliares e supressores/citotóxicos (PHILLIPS *et al.*, 1978; WOLFF & ANDERSON, 1988; HOMYK *et al.*, 1990). O mesmo ocorre em ovinos, onde células cultivadas de sêmen de carneiros foram identificadas como epiteliais ou semelhantes a epiteliais pela presença de citoqueratina (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008). Também podem ser observadas diferentes populações celulares no sêmen bovino, mas suas origens se encontram sob investigação (dados não publicados). Além disto, CSS podem ser encontradas com viabilidade tanto no conteúdo seminal fresco, quanto em doses de sêmen congeladas (dados não publicados).

Considerando-se que há muitos casos de machos de valor genético desejado, seja para a produção, seja para a preservação, e que já morreram, por vezes o único material genético disponível é o sêmen congelado. Nestes casos, as CSS presentes em doses de sêmen podem ser uma fonte potencial de núcleos para a clonagem animal por TNCS. Tal estratégia pode favorecer o retorno do potencial genético de animais de exceção para a produção pecuária, gerando uma progênie normal e saudável (MIR *et al.*, 2005). O padrão racial e genético do animal clonado a partir de CSS será similar ou idêntico ao do animal doador da célula em sua transmissibilidade das características produtivas genéticas nas futuras descendências (WELLS *et al.*, 2004). Estas características agregam valor ao setor pecuário, representando a possibilidade de produção ou recuperação de animais zootecnicamente importantes ou relevantes, além do grande potencial de resgate de animais de espécies ou raças em risco de extinção. O desenvolvimento de procedimentos que permitam o uso tanto das células espermáticas para a PIVE pela FIV, quanto as CSS para a clonagem animal por TNCS ampliaria ainda mais o potencial uso de doses raras de sêmen de um macho de valor genético de interesse.

#### 2.1.1.1 Segregação de células somáticas seminais

Para a utilização das CSS para a clonagem por TNCS, o primeiro passo necessário é realizar o processo de segregação *per se* das células do sêmen. O método mais comumente descrito para tal isolamento se dá pelo processamento das amostras seguido do cultivo celular. Temos como exemplo

o método descrito por Liesl Nel-Themaat *et al.* (2007), onde as amostras de sêmen foram lavadas em PBS sem  $\text{Ca}^{2+}$  e sem  $\text{Mg}^{2+}$ , e centrifugadas e cultivadas *in vitro* em placas revestidas com colágeno tipo 1. Porém, em casos de amostras raras de sêmen, uma grande limitação desta técnica é o descarte das células espermáticas presentes nas amostras, uma vez que tais células poderiam ser utilizadas na FIV, por exemplo, aproveitando tanto os espermatozoides quanto as CSS. Desta forma, como alternativa, os mesmos autores, propuseram um método para segregação de CSS que também permite a utilização dos espermatozoides (NEL-THEMAAT *et al.*, 2008). Tal protocolo consiste na segregação dos tipos de células por centrifugação em um gradiente de densidade de Percoll<sup>®</sup>, em processo modificado dos procedimentos utilizados comumente para a segregação de espermatozoides para a FIV em bovinos.

O gradiente de Percoll<sup>®</sup> tem sido amplamente utilizado de forma eficaz para a segregação de vários tipos de células, como por exemplo, na segregação de células de Leydig (SCHUMACHER *et al.*, 1978), de diferentes tipos de leucócitos (GUTIERREZ *et al.*, 1979; ULMER & FLAD, 1979), de eritrócitos (RENNIE *et al.*, 1979), de células epiteliais (CARBALLADA e SALING, 1997), de células endoteliais (BOWMAN *et al.*, 1981; NEES *et al.*, 1981), de células tumorais (BOSSLET *et al.*, 1981) e de espermatozoides (GORUS & PIPELEERS, 1981). Apesar deste reagente ser comumente utilizado para segregar espermatozoides móveis e imóveis (GORUS e PIPELEERS, 1981; MAKLER *et al.*, 1998), tal procedimento também apresentou resultados positivos em relação à segregação de CSS de ovinos (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007).

O protocolo proposto por Liesl Nel-Themaat *et al.* (2007) utiliza três concentrações diferentes de Percoll<sup>®</sup>, sendo de 20%, 50% e 90% em DPBS, dispostos em colunas de 2,5 mL em tubo de centrífuga de 15 mL. Deposita-se 2,5 mL de sêmen lavado no topo do gradiente Percoll<sup>®</sup>, centrifugando-se em seguida. Após a centrifugação haverá a formação de diferentes halos referentes nas interfaces das colunas de Percoll<sup>®</sup> (sêmen-20%, 20-50%, 50-90%), com a coluna de 90% retendo o *pellet* de espermatozoides viáveis para a PIVE, e na coluna de 20% estando as CSS viáveis para cultivo. Tal protocolo indicou que as células somáticas viáveis para cultivo e posterior TNCS

estariam localizadas na camada de 20% de Percoll<sup>®</sup>, após a segregação celular. Porém ao utilizar esta metodologia em nosso grupo de pesquisa, averiguou que havia diferença na migração celular quando utilizadas amostras de sêmen em distintos diluentes. Com isso, foi levantada a hipótese de que os componentes presentes nos diluentes de sêmen influenciam na segregação celular utilizando o protocolo com Percoll<sup>®</sup>. Para investigar tal hipótese, foram realizados os experimentos apresentados nesta dissertação, comparando diferentes soluções-base e constituintes nos diluentes de sêmen bovino e ovino, bem como foi verificado o efeito da presença de glicerol nas amostras de sêmen diluído.

## 2.2 Criopreservação de sêmen

A criopreservação é uma técnica de armazenamento de células ou tecidos empregada com sucesso em diferentes áreas, sendo fundamental não somente para a pesquisa científica, como também para a indústria (KOPEIK, THORNHIL & KHALAF, 2015). Tal técnica tem como princípio a redução de temperatura que leva a uma diminuição dos processos metabólicos até o estado de anabiose, o que possibilita preservar, por um longo prazo, materiais biológicos estruturalmente intactos (ARMITAGE, 1987; GAO *et al.*, 2000; PEGG, 2007). Desta forma, com o surgimento da criobiologia, as técnicas reprodutivas como a IA, a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões pela FIV foram otimizadas, acarretando em avanços econômicos para a produção animal, para a pesquisa científica, e para o desenvolvimento de conhecimento na área da reprodução, tanto em animais quanto em humanos (MEDEIROS *et al.*, 2002; MANDAWALA *et al.*, 2016).

Dentre as diversas biotécnicas da reprodução empregadas em animais que utilizam a abordagem da criobiologia, destaca-se a criopreservação de sêmen, a qual permite o uso de gametas do macho em diferentes áreas, bem como a validação do valor genético e de edições de genomas (CORNELISSEN *et al.*, 2017; GEORGES *et al.*, 2018). A criopreservação de sêmen vem sendo estudada e aprimorada por décadas (LUYET & GEHENIO, 1940), sabendo-se hoje que diversos fatores devem ser controlados a fim de se obter resultados satisfatórios pelo uso da técnica (WANG & DONG, 2017; HEZAVEHEI *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2021). Dentre tais fatores, destacam-se os diluentes e a

diluição do sêmen, os processos de criopreservação e descongelamento *per se*, além das características intrínsecas do sêmen de cada espécie animal (TRALDI, 1994).

Diversos protocolos foram desenvolvidos conforme a espécie para a obtenção de índices satisfatórios de sucesso pelo uso do sêmen preservado. Porém, de maneira geral, a criopreservação de sêmen apresenta quatro etapas principais: a diluição e o subsequente resfriamento, a desidratação celular, o congelamento e o descongelamento (MEDEIROS *et al.*, 2002). Os eventos físico-químicos que ocorrem em cada estágio deste processo visam a manutenção da integridade e o prolongamento da vida das células espermáticas, mas também podem danificar a estrutura e a funcionalidade celular (PARKS; GRAHAM, 1992). Os danos celulares resultantes do processo da criopreservação também variam de acordo com a taxa de resfriamento e aquecimento, ou seja, a velocidade com que se diminui e se restaura a temperatura no processo em função do tempo (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Para o sucesso na criopreservação de sêmen, há a necessidade de utilização de diluentes contendo moléculas crioprotetoras e componentes das soluções que protejam as membranas espermáticas e que auxiliem no prolongamento da viabilidade do sêmen e na manutenção de suas funções (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Dentre tais elementos protetores de membrana dos espermatozoides, destacam-se macromoléculas como a caseína do leite e as proteínas e lipídeos da gema de ovo, e agentes crioprotetores permeáveis à célula, como o glicerol, descoberto por Polge e colaboradores em 1949 (POLGE *et al.*, 1949; EVANS & MAXWELL, 1987). No entanto, tais agentes crioprotetores também podem causar danos às células por apresentarem toxicidade em altas concentrações, sendo também dependente da temperatura de exposição (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002).

### **2.2.1 Diluentes ou diluidores de sêmen**

Para viabilizar o processo de criopreservação, o sêmen coletado deve passar por uma diluição a fim de estender a durabilidade e a viabilidade do sêmen a ser congelado (LAYEK *et al.*, 2016). O diluidor ou diluente de sêmen deve manter a integridade biológica funcional das células, e deve proteger a

membrana do espermatozoide contra o choque térmico e dos danos do processo da criopreservação (VERSTEGEN *et al.*, 2005). Para cumprir tal finalidade, os diluentes devem atender a uma série de requisitos como, por exemplo, devem possuir pH e osmolaridade adequados, possuir capacidade tamponante e, principalmente, proteger as células de lesões físico-químicas e alterações criogênicas (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

A composição dos diluentes de sêmen geralmente inclui macromoléculas protetoras de membrana, crioprotetores permeáveis, substratos energéticos, eletrólitos ou substâncias osmoticamente ativas, substâncias tamponantes e antibióticos (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Ademais, segundo Silva (2001) e Gibbons (2002), um diluente pode ser constituído por substâncias que mantenham a isotonia, como a lactose, e outras que também atuem como tampões orgânicos, como o citrato de sódio, o tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) ou o N-tris(hidroximetil) metil 2-aminoetanosulfônico (TES). Um diluente também pode conter substratos energéticos, como a glicose e a frutose, macromoléculas não-permeáveis, como constituintes da gema de ovo, e agentes crioprotetores permeáveis, como o Glicerol (GLI) e o Etilenoglicol (EG). O leite desnatado (LD) possui ação diluente completa, pois tem as características de isotônica, tamponamento, fornecimento de substratos energéticos e de proteção de membrana, além de possuir uma infinidade não definida de componentes potencialmente protetores ou benéficos às células (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). Dentre as substâncias antimicrobianas, destacam-se a penicilina e a estreptomicina, ou a gentamicina como as mais utilizadas (RURANGWA *et al.*, 2004).

Além da criopreservação, o sêmen também pode ser mantido no estado refrigerado por determinado tempo, sem passar pelo processo de congelamento *per se*. Para tanto, o material biológico também necessita ser diluído, mas sem a necessidade de agentes crioprotetores permeáveis como o glicerol (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002). Desta forma, ocorre a manutenção da viabilidade espermática por determinado tempo, sem a redução significativa da capacidade fecundante dos espermatozoides (MEDEIROS, 2008). Na espécie ovina, a refrigeração de sêmen resulta em uma fertilidade mais

elevada quando comparada à congelação (NUNES *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2002).

Durante o processo de refrigeração, os espermatozoides de espécies domésticas, como os ruminantes, são armazenados a 5°C, fazendo com que as necessidades metabólicas decresçam a aproximadamente 10%, tendo como consequência uma menor produção de catabólitos que faz com que o desgaste da célula não ocorra de forma tão rápida (McKINNON, 1996). Para tal processamento, os diluentes utilizados em geral são compostos por meios isotônicos, sendo os mais comuns àqueles preparados à base de LD ou gema de ovo, com a adição de soluções tampões, açúcares e antibióticos aos diluentes finais (AISEN, 2008). Desta forma, não se faz uso de agentes crioprotetores, necessários somente quando há a formação de cristais de gelo. A presença de glicerol no diluente, por exemplo, pode levar a danos às células por apresentar potencial toxicidade em temperatura ambiente, por exemplo, (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002).

### **2.2.2 Protetores de membrana celular**

Protetores de membrana celular são substâncias que atuam exercendo um efeito extracelular, agindo, de maneira geral, através da estimulação osmótica e da desidratação celular (MEDEIROS *et al.*, 2002). Tais componentes, normalmente macromoléculas de origem animal, costumam interagir com a membrana plasmática ou agir como soluto, deprimindo o ponto de congelamento do meio extracelular, diminuindo a formação de cristais de gelo no meio e, em alguns casos, atuando de modo estrutural (MEDEIROS *et al.*, 2002). Nesta categoria, os principais compostos biológicos utilizados em diluentes para a diluição, refrigeração e criopreservação de sêmen são a gema de ovo e o LD.

#### 2.2.2.1 Gema de ovo

Há décadas, a gema de ovo, normalmente sozinha ou em combinação com o LD, e em solução contendo glicerol, têm formado a base mais comum para os diluentes de criopreservação de sêmen (PHILLIPS & LARDY, 1940; SALISBURY *et al.*, 1941; ALMQUIST *et al.*, 1949; FOOTE & BRATTON, 1950; FOOTE *et al.*, 1960; DAVIS *et al.*, 1963; MARTIN, 1963, 1965; GEBAUER *et al.*, 1970; RODRIGUEZ *et al.*, 1975; IRITANI, 1980; COCHRAN *et al.*, 1984; DE

LEEuw *et al.*, 1993; HOLT, 2000; VISHWANATH & SHANNON, 2000; STRADAIOLI *et al.*, 2007), uma vez que a gema de ovo é a principal substância não permeável usada para proteção da membrana plasmática da célula espermática contra o choque de congelamento durante o processo de resfriamento (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; MEDEIROS *et al.*, 2002; BUSTANI e BAIEE, 2021). Assim, a gema de ovo também tem sido a base para a diluição de sêmen para a refrigeração, sem glicerol, a exemplo da criopreservação (BUSTANI & BAIEE, 2021).

O efeito protetor de membrana da gema de ovo é atribuído a uma fração fosfolipídica de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL) presente na gema do ovo, denominada fosfatidilcolina (AMIRAT *et al.*, 2005; LAYEK *et al.*, 2016). Durante o choque térmico, a fração com carga (positiva pela colina e negativa pelo fosfato e grupos carbonil) dessa lipoproteína se liga à membrana celular, enquanto a fração fosfolipídica, denominada lecitina, age como um isolante térmico, evitando danos maiores provenientes do choque térmico (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Além disso, a lipoproteína interage com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas, desta forma restaurando fosfolipídios porventura perdidos durante a mudança de temperatura que ocorre no resfriamento do sêmen (AMIRAT *et al.*, 2005; LAYEK *et al.*, 2016; BUSTANI & BAIEE, 2021).

Além da ação protetora da membrana espermática, a gema de ovo é também conhecida por servir como uma fonte proteica para o diluente, atuando também como um reservatório de colesterol e fosfolipídios, o que também protege a membrana da célula espermática e o acrossoma contra lesões criogênicas, bem como previne a perda de fosfolipídios da membrana durante o processo de congelamento (LAYEK *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2019). Outras substâncias têm sido utilizadas também com este mesmo propósito, tais como o LD (ROTA *et al.*, 2001) e a Albumina Sérica Bovina (BSA; HASLER, 2009). A proporção de gema de ovo utilizada nos diluentes varia de 15 a 30% (VISHWANATH & SHANNON, 2000; RAJAPAKSHA; BOSWALL; ANZAR, 2019) e, apesar dos efeitos benéficos, a gema de ovo apresenta um inconveniente que é o risco de contaminações microbianas e transmissão de doenças, além de dificultar o exame microscópico do sêmen após a diluição

(SILVA *et al.*, 2002; AMIRAT-BRIAND *et al.*, 2010; RAJAPAKSHA; BOSWALL; ANZAR, 2019).

#### 2.2.2.2 Leite desnatado (LD)

O LD surgiu como uma alternativa à gema de ovo, com um mecanismo de ação semelhante. O LD também pode ser utilizado na forma reconstituída, combinada com arabinose, frutose ou mesmo com a gema de ovo (BARBAS & MASCARENHAS, 2009; RAHEJA *et al.*, 2018). A proteção do leite, assim como a da gema do ovo, ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que tal ação, por sua vez, ocorre pela presença de macromoléculas responsáveis pela ação crioprotetora, como a lactose, que é hidrofílica e osmoticamente ativa (TUKARAM *et al.*, 2010), a qual por não se difundir pela membrana celular dos espermatozoides, protege a membrana celular e previne o choque por congelamento (TUKARAM *et al.*, 2010; PEREA *et al.*, 2017; RAHMAN *et al.*, 2018). Outro componente protetor são as caseínas, que apresentam capacidade de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides, além de ser semelhante ao LDL da gema, encapsulando lipídios (BERGERON *et al.*, 2007; BUSTANI & BAIEE, 2021).

O LD também possui proteínas com capacidade tamponante do pH, também podendo quelar íons de metais pesados (AMANN & PICKETT, 1987). Desta forma, o LD é um meio isotônico, contendo muitos componentes favoráveis à manutenção e conservação da viabilidade do espermatozoide, além de possuir abundância de carboidratos, utilizados pelos espermatozoides na geração de energia (BUSTANI & BAIEE, 2021). Entretanto, o LD apresenta como desvantagem a diminuição da visibilidade do sêmen sob microscopia, dificultando a avaliação espermática no pós-descongelamento (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

#### **2.2.3 Agentes crioprotetores permeáveis**

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores, de modo geral, é baseado em permitir que as células desidratem o suficiente para impedir ou diminuir a formação de gelo intracelular nas temperaturas abaixo do ponto de congelação, mas ainda promovendo uma pequena retenção de água intracelular, evitando a desidratação excessiva (BALL & VO, 2001; SANTOS *et al.*, 2008; HOLT, 2000). Dentre os diferentes tipos de crioprotetores, existem

os denominados não-permeáveis, os quais não permeiam à célula, atuando osmoticamente externamente à célula, e os permeáveis, capazes de permear a membrana das células por possuírem características físico-químicas ideais, como o baixo peso molecular e a alta solubilidade em meio aquoso (BUSTANI & BAIEE, 2021). Os agentes crioprotetores permeáveis atuam também na modificação de propriedades coligativas e não-coligativas da solução (MAZUR, 1976). Entre os principais agentes crioprotetores permeáveis estão o glicerol, o dimetil sulfóxido (DMSO), o propilenoglicol e o etilenoglicol, porém tais agentes podem ser tóxicos quando à temperatura ambiente ou temperaturas próximas às corporais (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002; SANTOS, 2007).

#### 2.2.3.1 Glicerol

O glicerol é um álcool poliol que possui ação crioprotetora. Tal característica foi descoberta em 1949 por Polge e colaboradores (POLGE *et al.*, 1949), o que permitiu a evolução da criobiologia e dos processos de criopreservação de espermatozoides de diferentes animais. Embora diferentes agentes crioprotetores também possam ser utilizados, incluindo o DMSO, o propanodiol e o etilenoglicol, o glicerol continua sendo o crioprotetor de eleição para a criopreservação de sêmen (FOROUZANFAR *et al.*, 2010), sendo o agente crioprotetor mais conhecido e utilizado na criopreservação de sêmen bovino (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

O glicerol possui a capacidade de atravessar a membrana celular, atuando em diversos aspectos para proteger a célula de lesões criogênicas (FOROUZANFAR *et al.*, 2010). Foi proposto que seu mecanismo de ação ocorre por meio da diminuição do ponto de congelamento das soluções, resultando em uma diminuição da concentração de solutos na fração não congelada (LOVELOCK & POLGE, 1954). Acredita-se também que o glicerol seja capaz de se ligar à membrana plasmática através de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas do crioprotetor e os grupamentos fosfato da membrana, acarretando na estabilidade da membrana celular (KUNDU *et al.*, 2000). Além disso, o glicerol também pode exercer função energética em segundo plano, uma vez que pode ser metabolizado pela célula, sendo convertido em uma fonte de energia alternativa para os espermatozoides (MOHRI, 1966). Também há relatos que sugerem uma capacidade de substituição de água em condições

de desidratação intensa, por ser um poliol (WOELDERS, 1997). Apesar das diversas vantagens, o glicerol possui atividade citotóxica, sendo necessário controlar a concentração utilizada nas soluções e diluentes, variando entre 2,25 e 9% na criopreservação de sêmen (VISHWANATH & SHANNON, 2000). Além disso, por apresentar um peso molecular que determina uma passagem lenta pela membrana, o glicerol pode causar danos osmóticos à célula, dependendo da circunstância (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002).

### **3. HIPÓTESES**

- a) A segregação de células somáticas do sêmen de bovinos e ovinos utilizando o gradiente de Percoll<sup>®</sup> é influenciada diferencialmente pela composição básica do diluente em que o sêmen está diluído.
- b) A segregação de células somáticas do sêmen de bovinos e ovinos utilizando o gradiente de Percoll<sup>®</sup> é influenciada diferencialmente pela presença de glicerol no diluente em que o sêmen está diluído.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo geral**

- a) Avaliar os efeitos de diferentes diluentes para a refrigeração e congelação de sêmen bovino e ovino frente ao processo de segregação de células somáticas do sêmen e espermatozoides viáveis utilizando um protocolo com gradiente de Percoll<sup>®</sup>.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Comparar o efeito de diluentes de sêmen com distintas composições frente à quantificação, localização e viabilidade das células somáticas e espermáticas do sêmen refrigerado de bovinos e ovinos após segregação em protocolo com gradiente de Percoll<sup>®</sup>;
- b) Comparar o efeito da presença ou não de glicerol em diluentes de sêmen com distintas composições frente à quantificação, localização e viabilidade das células somáticas e espermáticas do sêmen refrigerado e congelado de bovinos e ovinos após segregação em protocolo com gradiente de Percoll<sup>®</sup>.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Local de realização do estudo

Os experimentos foram realizados junto ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

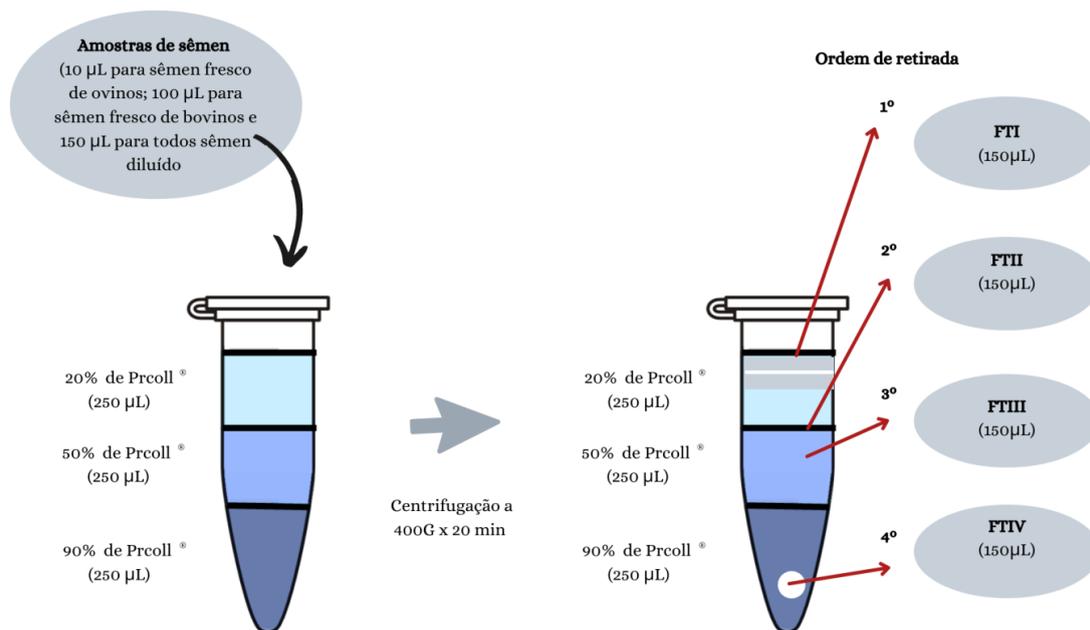
### 5.2 Meios e Reagentes

Foram utilizados reagentes da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), salvo quando referidos diferentemente. Todos os meios foram preparados com água purificada pelo sistema Direct-Q3/Milli-Q Synthesis (Millipore, Bedford, EUA).

### 5.3 Delineamento experimental

Com o objetivo de identificar se a composição do diluente em que o sêmen bovino ou de ovino é diluído, afeta o processo de segregação de CSS, foram realizados ensaios de segregação celular. Cada ejaculado coletado de cada animal foi dividido em oito grupos de acordo com a diluição de cada amostra (subitem 5.5.1). Além das avaliações macro e microscópica após a coleta do sêmen, avaliou-se também o *status* da segregação de CSS após: a refrigeração a 5°C (t=0 h); 24 h do equilíbrio a 5°C (t=24 h, sêmen refrigerado) e após o congelamento (sêmen congelado), em protocolo modificado de Liesl Nel-Themaat *et al.* (2008).

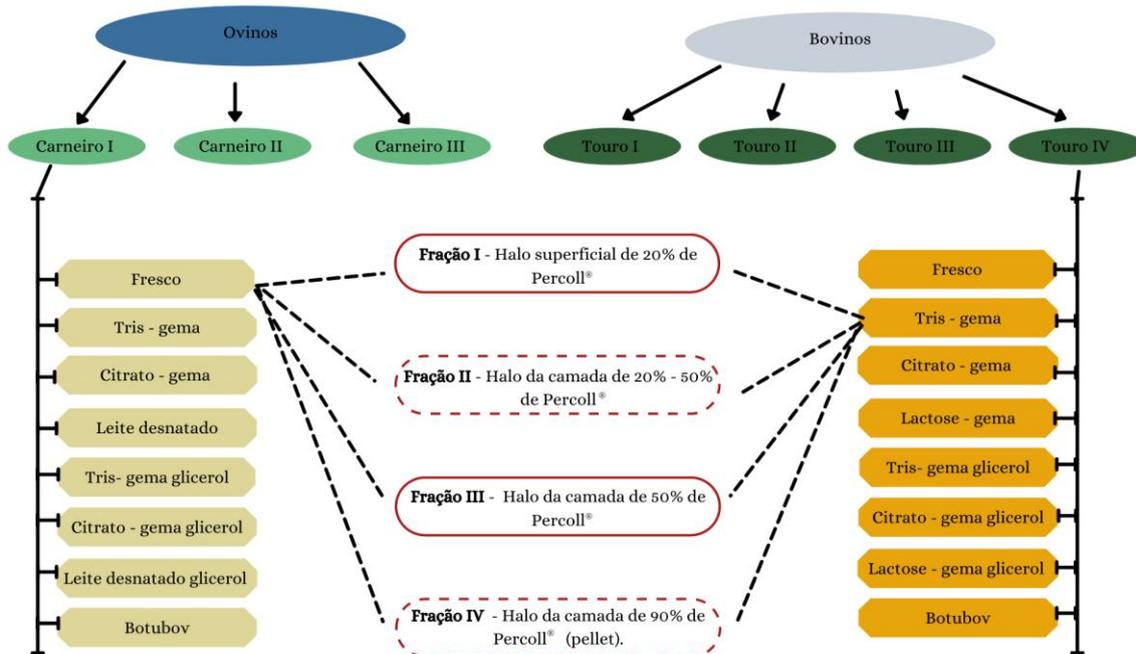
Alíquotas de sêmen fresco (10 e 100 µL para sêmen fresco ovino e bovino, respectivamente), diluídos (150 µL, independente do grupo experimental) foram depositadas sobre um gradiente com camada tripla de 250 µL de Percoll<sup>®</sup> a 20, 50 e 90% em D-PBS, sendo centrifugadas a 400 G/20 min. Após a centrifugação, observou-se a formação de halos nas interfaces entre as colunas de Percoll<sup>®</sup>. Foram cuidadosamente recolhidas quatro frações de 150 µL, coletando os halos respectivamente da parte mais superficial do gradiente de 20%, da parte intermediária entre os gradientes de 20 e 50%, do restante do gradiente de 50%, e do *pellet* formado no gradiente de 90% de Percoll<sup>®</sup> (Figura 2). Cada fração de 150 µL foi isolada, quantificada e analisada quanto à viabilidade celular, e descrita conforme a separação dos componentes, em CSS, espermatozoides e debris celulares.



**Figura 2.** Representação esquemática do processo de segregação celular utilizado neste estudo, estando à esquerda disposta a representação do gradiente de Percoll<sup>®</sup> com três camadas de 250  $\mu$ L, nas concentrações de 20%, 50% e 90%, onde foram dispostas as amostras de sêmen para segregação em volume de 10  $\mu$ L para sêmen fresco de ovinos, 100  $\mu$ L para sêmen fresco de bovinos e 150  $\mu$ L para cada amostras diluída, de ovinos e bovinos. Após a centrifugação a 400 G por 20 min, eram formadas camadas (halos) visíveis da segregação celular, sendo retiradas quatro frações de 150  $\mu$ L para análise, de cada fração total (FTI, FTII, FTIII, FTIV).

#### 5.4 Grupos experimentais

Foram utilizados três carneiros de cruzada Texel, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, e quatro touros da raça Brangus, da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, todos sendo machos adultos e férteis. O ejaculado de cada macho, de cada espécie, foi dividido em oito grupos para a segregação celular por gradiente de Percoll<sup>®</sup>, compostos de uma amostra de sêmen fresco e de sete amostras diluídas em sete diluentes distintos, utilizados para o processamento do sêmen em refrigerado e congelado (subitem 5.5.1.2). Cada uma das oito amostras de cada macho, após o processo de segregação celular (subitem 5.5.2), foi sub-dividida em quatro novos grupos, referentes a cada fração de Percoll<sup>®</sup> coletada após a centrifugação, resultando em um total de 32 amostras (frações), para cada macho, em 224 amostras totais (frações; Figura 3). Os gradientes foram ajustados para favorecer a recuperação de células vivas para a clonagem por TNCS e de espermatozoides viáveis para a FIV.



**Figura 3.** Representação esquemática dos grupos experimentais, sendo exemplificado apenas para um macho de cada espécie e para um tratamento. Fresco: sêmen fresco após a coleta e avaliação macro- e microscópica. Diluentes de sêmen a base de Tris-Gema (TG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado (LD, para carneiros), Tris-Gema Glicerol (TGG), Citrato-Gema Glicerol (CGG), Leite Desnatado Glicerolado (LDG, para carneiros), Lactose-Gema (LG, para touros), Lactose-Gema Glicerol (LGG, para touros) e BotuBOV<sup>®</sup> (diluyente comercial).

## 5.5 Metodologia

### 5.5.1 Coleta, avaliação e processamento do sêmen ovino e bovino

#### 5.5.1.1 Coleta do sêmen ovino e bovino

O sêmen dos três carneiros (1, 2 e 3), já condicionados ao manejo reprodutivo, foi obtido pelo método da vagina artificial (VA), de acordo com Mies Filho (1987). A temperatura da VA foi aferida em 42°C, a coleta do sêmen foi asséptica e com material e copo coletor de vidro graduado e estéril, em tronco de coleta utilizando uma fêmea ovina como manequim de coleta.

O sêmen dos quatro touros (1, 2, 3 e 4) foi coletado pelo método de eletroejaculação (Eletroejaculador Duboi, MS, Brasil), de acordo com Mies Filho (1987). Após o início da estimulação elétrica via retal, o sêmen foi coletado após exposição peniana diretamente em um funil de látex acoplado a um tubo de centrífuga de 15 mL em um suporte manual, em coleta asséptica e com material estéril, em tronco de contenção de bovinos.

### 5.5.1.2 Avaliação do sêmen ovino e bovino

Após cada coleta, os copos coletores ou tubos de centrífuga de 15 mL contendo os ejaculados foram mantidos em banho-maria em uma temperatura de 30°C durante o tempo necessário para as avaliações macroscópicas (volume, cor, aspecto e movimento de massa quando presente; Tabela 1) e microscópicas (motilidade espermática total, vigor de motilidade espermática, e concentração e morfologia espermática; Tabela 2), de acordo com Mies Filho (1987) e conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Para a avaliação da motilidade e do vigor de motilidade espermáticas, foi diluída uma microgota de 10 µL do sêmen de cada macho em solução de PBS aquecida a 37°C, disposta em uma lâmina aquecida, sendo em seguida coberta por uma lamínula aquecida, com a imediata avaliação sob microscopia de contraste de fase (magnitudes de 100 a 400X).

Para a determinação da concentração espermática, diluiu-se uma amostra de cada ejaculado em um tubo de microcentrífuga contendo uma solução de formol-citrato (4% de formalina em solução de 2,94% de citrato de sódio, pH 7,2) aquecido a 37°C, para a obtenção de uma diluição final de 1:400 (carneiros) ou 1:20 (touros). Para o sêmen dos carneiros, realizou-se uma pré-diluição (1:40) com 10 µL de sêmen em 390 µL de formol-citrato. Após cuidadosa homogeneização diluiu-se 20 µL do sêmen pré-diluído em 180 µL de formol citrato (1:400). Para o sêmen dos touros, realizou-se uma diluição com 10 µL de sêmen em 190 µL de formol-citrato (1:20). Contou-se o número de células espermáticas, em mm<sup>3</sup>, com o uso da câmara de Neubauer. Uma vez determinada a concentração espermática por mL de cada ejaculado, estimou-se o número total de espermatozoides por ejaculado, considerando o volume total de cada ejaculado.

**Tabela 1.** Características seminais após avaliação macroscópica dos ejaculados ovino e bovino\*

Macho	Características macroscópicas			
	Volume (mL)	Cor	Aspecto	Movimento de massa (0-5)
<b>Carneiro 1</b>	3,5	Branco	Creoso	3-4
<b>Carneiro 2</b>	2,3	Branco	Creoso	3-4
<b>Carneiro 3</b>	1,5	Branco	Creoso	3-4
<b>Touro 1</b>	3,0	Branco	Leitoso	0
<b>Touro 2</b>	6,0	Branco	Aquoso	0
<b>Touro 3</b>	7,0	Branco	Aquoso	0
<b>Touro 4</b>	5,5	Branco	Opalescente	0

\*Conforme padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

**Tabela 2.** Características seminais após avaliação microscópica dos ejaculados ovino e bovino\*

Macho	Características microscópicas			
	Motilidade espermática (%)	Vigor de motilidade (1-5)	Concentração espermática/mL ( $\times 10^6$ )	Concentração espermática final/mL ( $\times 10^6$ )**
<b>Carneiro 1</b>	75	3,5	1.110	140
<b>Carneiro 2</b>	75	3,5	1.650	140
<b>Carneiro 3</b>	75	3,5	2.400	140
<b>Touro 1</b>	70	4,0	665	60
<b>Touro 2</b>	60	3,0	176	60
<b>Touro 3</b>	70	3,0	135	60
<b>Touro 4</b>	60	3,0	430	60

\*Conforme padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

\*\*Após diluição final

### 5.5.1.3 Processamento do sêmen ovino e bovino para refrigeração e congelação

Após a análise do sêmen, cada ejaculado foi dividido em oito grupos para segregação em gradientes de Percoll<sup>®</sup>, iniciando com uma amostra de 10  $\mu$ L (carneiros) ou 100  $\mu$ L (touros) de sêmen fresco (t=-3 h). Durante a realização dos experimentos, foram utilizados os mesmos procedimentos para as amostras provenientes tanto dos carneiros quanto dos touros. Entretanto, houve modificação com respeito aos diluentes Leite Desnatado (LD) e Leite Desnatado Glicerolado (LDG), utilizados para o sêmen dos carneiros, e diluentes Lactose-Gema (LG) e Lactose-Gema Glicerol (LGG), utilizados para o sêmen dos touros, conforme abaixo.

Após a coleta das amostras do sêmen fresco para a segregação celular, foi realizada a diluição isotérmica a 27°C de sete frações de igual volume de cada ejaculado, de acordo com Mies Filho (1987), em sete diferentes diluentes (Formulações no Anexo I). Os diluentes utilizados foram: Tris-Gema (TG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado (LD) para o sêmen de carneiros ou Lactose-Gema (LG) para o sêmen de touros; Tris-Gema Glicerol (TGG), Citrato-Gema Glicerol (CGG), Leite Desnatado Glicerolado (LDG) para o sêmen de carneiros ou Lactose-Gema-Glicerol (LGG) para o sêmen de touros, e meio comercial BotuBOV<sup>®</sup> (Botupharma, SP, Brasil). O sêmen ovino e bovino foi diluído a uma concentração final de 140 e 60 x 10<sup>6</sup>/mL, respectivamente. As doses congeladas (TGG, CGG, LDG, BotuBOV<sup>®</sup>) de 0,5 mL (palhetas médias, IMV, França) alcançaram uma concentração final de 70 e 30 x 10<sup>6</sup>/dose, respectivamente para ovinos e bovinos.

Após as diluições, as frações de sêmen diluído foram submetidas a novas análises de motilidade e vigor (M/V) espermáticos. Os tubos devidamente identificados (carneiro ou touro e tipo de diluente) foram resfriados gradualmente de 27 até 5°C (t=0 h) em câmara de refrigeração (geladeira) em aproximadamente 3 h, em uma curva de resfriamento média de 0,12°C/min. O sêmen diluído foi novamente analisado quanto à M/V no equilíbrio a 5°C (t=0 h), quando também foram retiradas alíquotas de 150  $\mu$ L de todas as amostras diluídas para a segregação celular por gradiente de Percoll<sup>®</sup>.

As amostras diluídas nos diluentes sem glicerol, constituídos de Tris-Gema (TG), Citrato-Gema (CG), Leite Desnatado (LD, carneiros) ou Lactose-

Gema (LG, touros) foram destinadas ao armazenamento por refrigeração. Desta forma, os tubos foram mantidos em resfriamento controlado a 5°C/24 h (t=24 h) a partir do tempo de equilíbrio a 5°C (t=0 h). Já as amostras diluídas nos meios com glicerol, constituídos de Tris-Gema-Glicerol (TGG), Citrato-Gema-Glicerol (CGG), Leite Desnatado Glicerolado (LDG, carneiros), Lactose-Gema-Glicerol (LGG, touros), e meio comercial BotuBOV<sup>®</sup> foram destinadas ao armazenamento por criopreservação. Desta forma, cada amostra após a estabilização a 5°C, foi envasada em palhetas médias (0,5 mL), em uma concentração final de:  $70 \times 10^6$  (doses dos carneiros) e de  $30 \times 10^6$  (doses dos touros), conforme acima, submetidas horizontalmente ao vapor de nitrogênio por 30 min, e então armazenadas em um botijão criogênico.

Após 24 h, o sêmen diluído refrigerado a 5°C foi novamente analisado quanto à M/V (t=24 h), havendo também a coleta de alíquotas de 150 µL de todas as amostras diluídas refrigeradas para a segregação celular por gradiente de Percoll<sup>®</sup>. As amostras criopreservadas também foram analisadas quanto à M/V e para segregação celular (150 µL/amostra) 24 h pós-criopreservação (PC), após descongelamento das palhetas em banho-maria a 37°C/50 s. A concentração espermática de todas as amostras foi aferida no t=0 h e no t=24 h, conforme acima, na diluição de 1:20 em formol-citrato.

### 5.5.2 Segregação celular

Para o processo de segregação celular foi utilizado o protocolo descrito por Liesl Nel-Themaat *et al.* (2008), com modificações, principalmente pela adaptação de volumes das colunas do gradiente de Percoll<sup>®</sup>. Brevemente, foram utilizadas três colunas de 250 µL de Percoll<sup>®</sup> a 20, 50 e 90% em D-PBS, depositadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de forma cautelosa para não ocorrer a mistura das colunas (90%, fundo; 50%, meio; 20%, topo do tubo). Os tubos contendo as três colunas de Percoll<sup>®</sup> eram aquecidos em incubadora a 38°C/1 h, antes do uso.

As amostras de sêmen utilizadas foram processadas conforme o subitem 5.5.1.3. Todas as amostras de sêmen fresco (10 µL para carneiros e 100 µL para touros), diluído e refrigerado (150 µL/amostra, t= 0 h e t=24 h), e diluído e criopreservado (150 µL/amostra, t=0 h e PC), foram cuidadosamente

dispostas na parte superior dos tubos com as colunas de Percoll<sup>®</sup>, seguida da centrifugação a 400 G/20 min.

## **5.6 Identificação, quantificação e avaliação da viabilidade celular**

Após a centrifugação de cada tubo contendo as amostras e os gradientes de Percoll<sup>®</sup>, foram retiradas quatro frações, conforme segue: Fração I: 150 µL da porção superficial do gradiente de 20% de Percoll<sup>®</sup>; Fração II: 150 µL da porção intermediária entre os gradientes de 20 e 50% de Percoll<sup>®</sup>; Fração III: 150 µL da porção remanescente do gradiente de 50% de Percoll<sup>®</sup>; e Fração IV: 150 µL da porção contendo o *pellet* formado no gradiente de 90% de Percoll<sup>®</sup>. As frações coletadas de cada tubo foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 500 µL para a avaliação quantitativa e qualitativa dos componentes celulares (espermatozoides, células somáticas) e não celulares (debris celulares, do diluente e do plasma seminal), conforme os subitens 5.6.1 e 5.6.2. Para diminuir a influência das avaliações entre observadores, todas as avaliações foram realizadas de forma independente por dois observadores, sendo os dados (Anexo II) para cada amostra de sêmen tabulados por um terceiro operador. As avaliações eram feitas de modo independente, onde cada avaliador teve acesso apenas a sua avaliação, sendo os resultados comparados ao final.

### **5.6.1 Avaliação da concentração e da viabilidade celular**

Cada fração obtida de cada amostra após a segregação celular foi avaliada sob microscopia com relação à presença de células e quanto à viabilidade celular utilizando a coloração de azul de tripano (Anexo III). Para tanto, uma alíquota de 10 µL foi coletada da suspensão de cada fração (150 µL), sendo adicionada a 10 µL de azul de tripano a 0,4%, em uma diluição 1:2, conforme protocolo descrito por Kovacs e Foote (1992; anexo IV) Desta suspensão corada, foi retirado um total de 10 µL para a contagem de células viáveis (não coradas com azul de tripano), inviáveis (coradas com azul de tripano) e totais (vivas, mortas, totais) em câmara de Neubauer. Além disso, durante o processo de contagem, foi analisada a presença de espermatozoides vivos e mortos em cada campo, sendo classificados em uma escala de 0 a 5, onde: (0): Ausentes; (1): Raros (quando a estrutura analisada esteve presente em uma proporção menor do que 10% por campo); (2): Poucos (quando a

estrutura analisada esteve presente em uma proporção entre 10 a 25% por campo); (3): Médio (quando a estrutura analisada esteve presente em uma proporção entre 25 e 40% por campo); (4) Muitos (quando a estrutura analisada esteve presente em uma proporção entre 40 e 60% por campo); e (5) Abundantes (quando a estrutura analisada esteve presente em uma proporção maior do que 60% por campo).

### **5.6.2 Avaliação citológica**

Após a retirada das alíquotas de 10  $\mu$ L de cada fração de 150  $\mu$ L, os volumes remanescentes foram centrifugados a 620 G/5 min para a formação de um *pellet* do conteúdo em suspensão no tubo. Um total de 10  $\mu$ L do *pellet* formado foi utilizado para o preparo de um esfregaço em lâminas, os quais foram corados com corante panótipo rápido (HOROBIN, 2011), seguindo protocolo de citologia (Anexo III). Após a coloração, as lâminas foram avaliadas sob microscopia de luz em magnitude de 1000x, e descritos conforme os achados citológicos, com a avaliação da presença de debris celulares, de espermatozoides e de células somáticas em uma escala de 0 a 5, conforme acima.

### **5.6.3 Avaliação da motilidade e vigor de motilidade espermáticos**

Imediatamente antes e depois da segregação celular em gradiente de Percoll<sup>®</sup>, cada amostra foi submetida à análise de M/V, conforme descrito no subitem 5.5.1.3. A análise de M/V posterior à segregação foi avaliada na Fração IV, a qual é comumente destinada ao uso na FIV.

## **5.7 Análise estatística**

A análise dos dados por amostra entre tratamentos, considerando os fatores macho dentro de cada espécie (três carneiros, quatro touros), tipo de preservação do sêmen (sêmen fresco, resfriado, congelado), diluentes (sem diluição/fresco, TG, CG, LD, TGG, CGG, LDG, BotuBOV<sup>®</sup>), tempo (fresco/t=-3 h, t=0 h, t=24 h), e interação diluente\*tempo (sem diluição/fresco, TG-0h, TG-24h, CG-0h, CG-24h, LD-0h, LD-24h, TGG-0h, TGG-24h, CGG-0h, CGG-24h, LDG-0h, LDG-24h, BotuBOV<sup>®</sup>-0h, BotuBOV<sup>®</sup>-24h), para os dados relativos ao número de células somáticas e espermáticas vivas, mortas e totais por fração e total das frações de Percoll<sup>®</sup>; a proporção de células somáticas e espermáticas

por fração de Percoll<sup>®</sup>; a proporção de células somáticas, espermáticas e debris celulares por fração de Percoll<sup>®</sup>; e a motilidade e o vigor de motilidade espermáticos antes e depois da segregação pelo gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de  $X^2$  (Minitab, State College, PA, EUA), para  $P < 0,05$ , com análises pareadas quando significativas. Os dados relativos ao número de células somáticas e espermáticas vivas, mortas e totais por fração e total das frações de Percoll<sup>®</sup> e a proporção de células somáticas e espermáticas por fração de Percoll<sup>®</sup> foram testados quanto à normalidade pelo teste de Anderson-Darling, e submetidos à transformação logarítmica ou por arcoseno, para então serem submetidos ao *General Linear Model* (Minitab), considerando os fatores descritos acima, com comparações pareadas pelo teste de Tukey. O teste de correlação simples de Pearson foi utilizado para a avaliação da inter-relação entre os dados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Recuperação de células somáticas seminais ovinas e bovinas

#### 6.1.1 Efeito biológico dos animais

O primeiro resultado a ser analisado levou em conta o fator macho, buscando verificar um efeito biológico de cada animal em relação às amostras de sêmen, uma vez que foi analisado um ejaculado por animal. Desta forma, foi realizada uma média da concentração de células viáveis presentes em cada fração: FTI, FTII, FTIII, FTIV, FTI+II+III (somatório das frações FTI, FTII e FTIII) e FTotal (somatório das frações FTI, FTII, FTIII e FTIV). Para isso, foram utilizados os resultados de todas as amostras de sêmen processadas, sendo sêmen fresco e diluído nos diluentes TG, CG, LD, TGG, CGG, LDG e BotuBOV<sup>®</sup> em distintos tempos de análises.

##### 6.1.1.1 Ovinos

A análise do sêmen dos três carneiros apresentaram semelhança com relação à quantidade e proporção de células presentes em cada fração. Entretanto, houve apenas uma tendência ( $P=0,072$ ) do sêmen do Carneiro 2 em apresentar uma quantidade de células maior no somatório de todas as frações (FTI, FTII, FTIII e FTIV) do que o Carneiro 3, sem tendência em relação ao Carneiro 1. Desta forma, não houve diferença estatística entre a quantidade e proporção de células por fração entre os carneiros, não havendo efeito biológico causado pelos animais sobre as amostras analisadas (Tabelas 3 e 4).

O comportamento entre a proporção de células viáveis presentes em cada fração, com a proporção e distribuição das células nas frações entre os três carneiros foi similar (Tabela 4). Isto demonstra não ter havido influência biológica dos animais sobre o processo de segregação celular no protocolo utilizado. Sendo assim, os machos nas análises foram tratados como repetições.

Entre as frações, houve diferença tanto no número de células como na proporção de células por fração, em cada carneiro, principalmente entre as frações totais III e IV (Tabelas 3 e 4). Em geral, mais de 50% do total de células foi obtido nas frações I e II, com pouco mais de 1/3 das células sendo isoladas na fração III.

**Tabela 3.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm)

Frações	Carneiro 1	Carneiro 2	Carneiro 3
FTI	3.550 ± 931 <sup>aA</sup>	3.450 ± 931 <sup>aAB</sup>	3.050 ± 931 <sup>aAB</sup>
FTII	3.600 ± 1.008 <sup>aA</sup>	4.800 ± 1.008 <sup>aAB</sup>	3.700 ± 1.008 <sup>aA</sup>
FTIII	5.067 ± 1.260 <sup>aA</sup>	5.900 ± 1.260 <sup>aA</sup>	4.150 ± 1.260 <sup>aA</sup>
FTIV	1.700 ± 811 <sup>aB</sup>	2.890 ± 811 <sup>aB</sup>	1.810 ± 811 <sup>aB</sup>
FTI+II+III	12.217 ± 1.356 <sup>a</sup>	14.150 ± 1.356 <sup>a</sup>	10.900 ± 1.356 <sup>a</sup>
FTotal	13.917 ± 1.247 <sup>a</sup>	17.040 ± 1.247 <sup>a*</sup>	12.710 ± 1.247 <sup>a*</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha indicam tendência estatística (P=0,072).

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

\*tendência estatística na linha (p<0,1)

**Tabela 4.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com os animais (média ± epm, em %)

Frações	Carneiro 1	Carneiro 2	Carneiro 3
FTI (%)	24,9 ± 6,2 <sup>aA</sup>	22,9 ± 6,2 <sup>aAB</sup>	21,8 ± 6,2 <sup>aAB</sup>
FTII (%)	27,6 ± 6,9 <sup>aA</sup>	26,3 ± 6,9 <sup>aAB</sup>	27,2 ± 6,9 <sup>aA</sup>
FTIII (%)	34,9 ± 8 <sup>aA</sup>	34,0 ± 8 <sup>aA</sup>	36,5 ± 8 <sup>aA</sup>
FTIV (%)	12,7 ± 5,7 <sup>aB</sup>	16,9 ± 5,7 <sup>aB</sup>	14,4 ± 5,7 <sup>aB</sup>
FTI+II+III (%)	87,3 ± 5,7 <sup>a</sup>	83,1 ± 5,7 <sup>a</sup>	85,6 ± 5,7 <sup>a</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

### 6.1.1.2 Bovinos

Diferentemente do que foi observado nos ovinos com sêmen coletado por VA, os resultados do número de CSS a partir do sêmen de touros coletado por EE, apresentaram diferenças em relação à quantidade de células presentes em cada fração. Também foi observado na fração total, onde foi indicada uma menor concentração total de CSS viáveis no Touro 1 quando comparado aos Touros 3 e 4, sendo o Touro 2, semelhante aos Touros 1, 3 e 4 (Tabela 5). Tais achados demonstram ter havido uma diferença no número de CSS presentes nos ejaculados, mas que não interferiu significativamente na segregação celular. Neste caso, a proporção das CSS viáveis nos touros em cada fração (FTI, FTII, FTIII, FTIV e FTI+II+III) em relação à fração total (FTotal) foi relativamente similar entre os ejaculados dos animais, indicando um perfil de migração celular semelhante entre os touros, independente da concentração de CSS de cada animal (Tabela 6). Porém, algumas diferenças foram observadas

entre os Touros 1 e 2 com respeito à proporção de CSS nas frações FTIV e FTI+II+III. No Touro 2, uma maior proporção de CSS migraram até a FTIV em relação ao Touro 1, sendo ambos semelhantes aos demais. Obviamente, tal fator reduziu a proporção de CSS na fração FTI+II+III no Touro 2 em relação ao Touro 1. Dentro de cada touro e entre as frações, em geral, a fração FTII apresentou uma menor proporção de CSS em todos os touros em comparação às demais. Os Touros 1 e 3 apresentaram uma maior proporção de CSS na FTIII, seguida das frações FTI e FTIV, com o Touro 4 concentrando mais células nas frações FTIII e FTIV, com menos células nas frações FTI e FTII. Já o Touro 2 apresentou uma maior proporção de células na FTIV, seguida das frações FTI e FTIII.

**Tabela 5.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com os animais (média  $\pm$  epm)

Frações	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4
FTI	5.150 $\pm$ 2.356 <sup>bAB</sup>	8.200 $\pm$ 2.356 <sup>abB</sup>	16.000 $\pm$ 2.356 <sup>aA</sup>	9.350 $\pm$ 2356 <sup>abB</sup>
FTII	4.200 $\pm$ 1.414 <sup>abB</sup>	4.950 $\pm$ 1.414 <sup>aC</sup>	8.000 $\pm$ 1.414 <sup>abB</sup>	7.550 $\pm$ 1.414 <sup>abB</sup>
FTIII	9.700 $\pm$ 3.560 <sup>aA</sup>	9.700 $\pm$ 3.560 <sup>abB</sup>	23.100 $\pm$ 3.560 <sup>bA</sup>	25.000 $\pm$ 3.560 <sup>bA</sup>
FTIV	8.150 $\pm$ 4.059 <sup>aA*</sup>	22.200 $\pm$ 4.059 <sup>aA*</sup>	15.250 $\pm$ 4.059 <sup>bA</sup>	20.000 $\pm$ 4.059 <sup>bA</sup>
FTI+II+III	19.050 $\pm$ 4.758 <sup>a</sup>	22.850 $\pm$ 4.758 <sup>a</sup>	47.100 $\pm$ 4.758 <sup>b</sup>	41.900 $\pm$ 4.758 <sup>b</sup>
FTotal	27.200 $\pm$ 5.373 <sup>a</sup>	45.050 $\pm$ 5.373 <sup>ab</sup>	62.350 $\pm$ 5.373 <sup>b</sup>	61.900 $\pm$ 5.373 <sup>b</sup>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha indicam tendência estatística (P=0,072).

A,B,C: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

\*tendência estatística na linha ( $p < 0,1$ )

**Tabela 6.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com os animais (média  $\pm$  epm, em %)

Frações	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4
FTI (%)	24,2 $\pm$ 5,0 <sup>abB</sup>	20,9 $\pm$ 5,0 <sup>aBC</sup>	24,2 $\pm$ 5,0 <sup>aA</sup>	15,8 $\pm$ 5,0 <sup>abB</sup>
FTII (%)	13,3 $\pm$ 2,1 <sup>aC</sup>	11,2 $\pm$ 2,1 <sup>aC</sup>	11,7 $\pm$ 2,1 <sup>abB</sup>	11,4 $\pm$ 2,1 <sup>abB</sup>
FTIII (%)	38,0 $\pm$ 6,2 <sup>aA</sup>	27,1 $\pm$ 6,2 <sup>abB</sup>	36,0 $\pm$ 6,2 <sup>aA</sup>	38,8 $\pm$ 6,2 <sup>aA</sup>
FTIV (%)	24,5 $\pm$ 6,7 <sup>abB</sup>	40,8 $\pm$ 6,7 <sup>bA</sup>	28,2 $\pm$ 6,7 <sup>abA</sup>	34,0 $\pm$ 6,7 <sup>abA</sup>
FTI+II+III (%)	75,5 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	59,2 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>	71,8 $\pm$ 6,7 <sup>ab</sup>	66,0 $\pm$ 6,7 <sup>ab</sup>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

A,B: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

## 6.1.2 Método de preservação do sêmen

### 6.1.2.1 Ovinos

As amostras também foram comparadas quanto ao método de preservação do sêmen, sendo divididas em sêmen fresco, congelado e resfriado. Não houve diferença na segregação de células por Percoll® com relação à média de concentração celular no total recuperado em todas as frações (FTotal) e no somatório das frações FTI, FTII e FTIII (FTI+II+III), conforme a Tabela 7. Um maior número de células foi obtido na fração III no sêmen fresco e congelado, enquanto no sêmen congelado, as células foram distribuídas em todas as frações, havendo uma predominância na fração total II. De fato, no sêmen congelado, houve uma redução no número de células nas frações I e III e aumento na fração II em relação ao sêmen refrigerado, sendo ambos semelhantes ao fresco, por fração. Entre as frações, um maior número de células foi obtido na fração III do sêmen fresco e refrigerado, com um baixo número de células na fração IV. Interessantemente, houve uma redução no número e na proporção de células nas frações I e III e um aumento nas frações II e IV nas amostras de sêmen congelado. Também houve diferença na fração FTI+II+III em relação à proporção de células recuperadas, com as amostras do sêmen congelado apresentando uma proporção menor de CSS nestas três primeiras frações em comparação às amostras de sêmen fresco e refrigerado (Tabela 8, Figura 5).

**Tabela 7.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)

Frações	Fresco	Refrigerado	Congelado
FTI	2.250 ± 1.941 <sup>abB</sup>	4.916,7 ± 793 <sup>bAB</sup>	2.313 ± 686 <sup>aB</sup>
FTII	3.250 ± 2.081 <sup>abB</sup>	2.250 ± 849 <sup>bB</sup>	5.469 ± 736 <sup>aA</sup>
FTIII	8.500 ± 2.599 <sup>abA</sup>	6.847,2 ± 1.061 <sup>bA</sup>	3.250 ± 919 <sup>aAB</sup>
FTIV	200 ± 1.701 <sup>aC</sup>	1.000,0 ± 694 <sup>aB*</sup>	3.225 ± 601 <sup>aAB*</sup>
FTI+II+III	14.000 ± 3.006 <sup>a</sup>	14.014 ± 1.227 <sup>a</sup>	11.031 ± 1063 <sup>a</sup>
FTotal	14.200 ± 2.985 <sup>a</sup>	15.014 ± 1.219 <sup>a</sup>	14.256 ± 1.056 <sup>a</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A,B,C:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

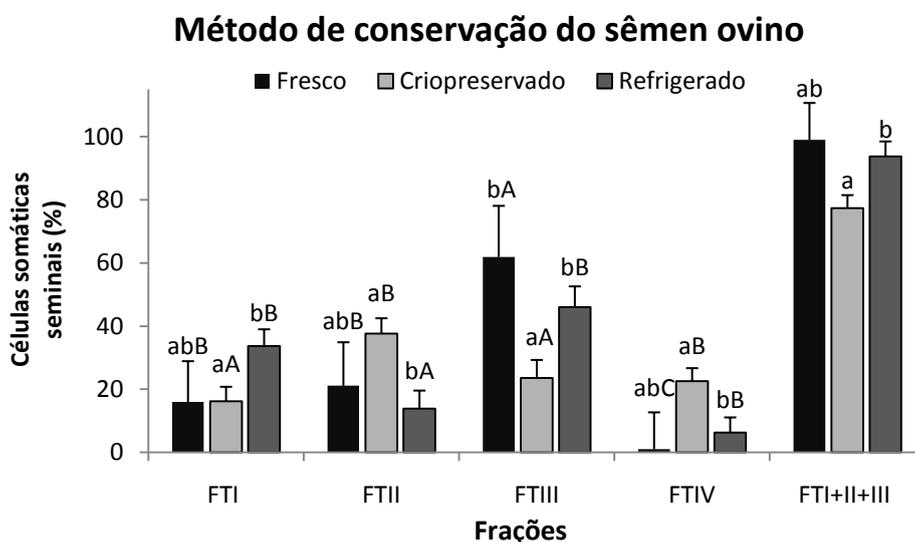
\*tendência estatística na linha (p<0,1)

**Tabela 8.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média  $\pm$  epm)

Frações	Fresco	Refrigerado	Congelado
FTI (%)	16,0 $\pm$ 12,9 <sup>abB</sup>	33,7 $\pm$ 5,3 <sup>bA</sup>	16,2 $\pm$ 4,6 <sup>aB</sup>
FTII (%)	21,1 $\pm$ 13,8 <sup>abB</sup>	13,9 $\pm$ 5,7 <sup>bB</sup>	37,6 $\pm$ 4,9 <sup>aA</sup>
FTIII (%)	61,9 $\pm$ 16,2 <sup>bA</sup>	46,0 $\pm$ 6,6 <sup>bA</sup>	23,6 $\pm$ 5,7 <sup>aB</sup>
FTIV (%)	1,0 $\pm$ 11,7 <sup>abC</sup>	6,3 $\pm$ 4,8 <sup>bB</sup>	22,6 $\pm$ 4,1 <sup>aB</sup>
FTI+II+III (%)	99,0 $\pm$ 11,7 <sup>ab</sup>	93,7 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	77,4 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

<sup>A,B,C:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos em cada fração total diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada método de conservação de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Visto que o total de células (FTotal) foi similar entre os grupos analisados, podemos inferir que, no sêmen refrigerado, as células que estavam em maior quantidade e proporção nas frações FTI e FTIII, quando expostas a diluentes de congelamento, foram distribuídas para outras frações (FTII e FTIV). Tais resultados indicaram uma possível ação do glicerol e da criopreservação *per se* sobre o processo de segregação celular.

### 6.1.2.2 Bovinos

Houve diferenças quanto ao método de preservação do sêmen (sêmen fresco, refrigerado ou congelado) na segregação (número e proporção) de CSS de touros por Percoll<sup>®</sup> (Tabelas 9 e 10, Figura 5). Com relação ao número de CSS, o grupo com sêmen congelado apresentou uma menor concentração de CSS na fração FTI do que o grupo com sêmen fresco, com o grupo refrigerado sendo semelhante aos demais, sem observação de diferenças entre grupos nas frações FTII e FTI+II+III. Já nas frações FTIII e FTIV, o grupo do sêmen fresco apresentou uma menor quantidade de CSS do que o grupo congelado, com o grupo refrigerado sendo semelhantes entre os demais. Na fração FTtotal, o grupo de sêmen refrigerado apresentou uma menor concentração do que o congelado, com ambos sendo semelhantes ao sêmen fresco.

**Tabela 9.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média ± epm)

Frações	Fresco	Refrigerado	Congelado
<b>FTI</b>	19.500 ± 4.332 <sup>aA</sup>	11.500 ± 1.769 <sup>abA</sup>	7.078 ± 1.532 <sup>bB</sup>
<b>FTII</b>	6.938 ± 2.788 <sup>aB</sup>	4.656 ± 1.138 <sup>aB</sup>	7.219 ± 986 <sup>aB</sup>
<b>FTIII</b>	6.563 ± 6.930 <sup>bB</sup>	13.625 ± 2.829 <sup>abA</sup>	20.602 ± 2.450 <sup>aA</sup>
<b>FTIV</b>	5.813 ± 7.700 <sup>bB</sup>	11.813 ± 3.144 <sup>abA</sup>	21.164 ± 2.722 <sup>aA</sup>
<b>FTI+II+III</b>	33.000 ± 9.796 <sup>a</sup>	29.781 ± 3.999 <sup>a</sup>	34.898 ± 3.463 <sup>a</sup>
<b>FTtotal</b>	38.813 ± 10.221 <sup>ab</sup>	41.5934 ± 4.173 <sup>b</sup>	56.063 ± 3.614 <sup>a</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

Também houve diferenças na proporção de CSS segregadas entre o sêmen fresco, refrigerado e congelado na fração FTI, havendo uma maior proporção de células no sêmen fresco (49,2%), reduzindo no sêmen refrigerado (28,2%) e no sêmen congelado (12,6%). Assim, uma menor proporção de CSS foi observada na fração FTIII no sêmen fresco em relação ao congelado, e nas frações FTIV e FTI+II+III no sêmen fresco em relação a ambos os grupos. Não houve diferenças na proporção de CSS entre métodos de conservação na fração FTII, a qual apresentou a menor proporção de obtenção de CSS (Tabela 9).

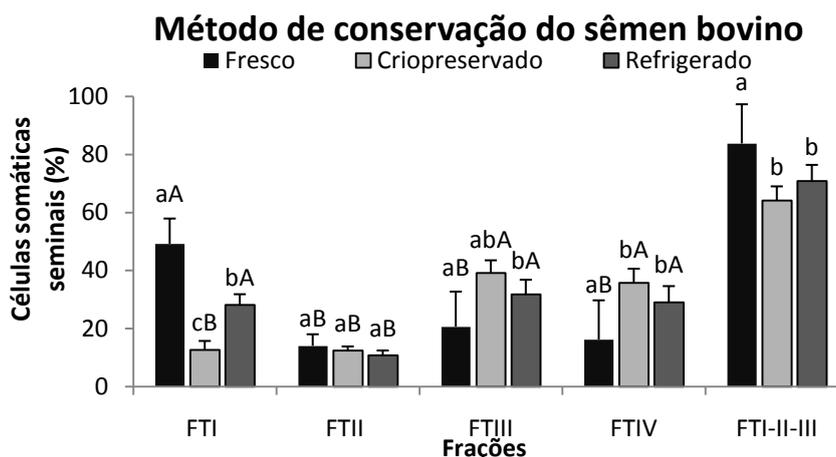
**Tabela 10.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média  $\pm$  epm)

Frações	Fresco	Refrigerado	Congelado
FTI (%)	49,2 $\pm$ 8,7 <sup>aA</sup>	28,2 $\pm$ 3,6 <sup>bA</sup>	12,6 $\pm$ 3,1 <sup>cB</sup>
FTII (%)	14,0 $\pm$ 4,0 <sup>aB</sup>	10,8 $\pm$ 1,6 <sup>aB</sup>	12,4 $\pm$ 1,4 <sup>aB</sup>
FTIII (%)	20,6 $\pm$ 12,1 <sup>aB</sup>	31,8 $\pm$ 5,0 <sup>abA</sup>	39,2 $\pm$ 4,3 <sup>bA</sup>
FTIV (%)	16,2 $\pm$ 13,5 <sup>aB</sup>	29,1 $\pm$ 5,5 <sup>bA</sup>	35,8 $\pm$ 4,8 <sup>bA</sup>
<b>FTI+II+III (%)</b>	<b>83,8 <math>\pm</math> 13,5<sup>a</sup></b>	<b>70,9 <math>\pm</math> 5,5<sup>b</sup></b>	<b>64,2 <math>\pm</math> 4,8<sup>b</sup></b>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

A,B: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Entre as frações dentro de cada método de conservação do sêmen, quase metade das CSS segregadas foram obtidas na fração FTI no sêmen fresco em relação as demais (Tabela 10, Figura 5). Já no sêmen congelado, as CSS se concentraram em maior proporção nas frações FTIII e FTIV, com as CSS no sêmen refrigerado se concentraram igualmente nas frações FTI, FTII e FTIV. Desta forma, as células que estavam em maior quantidade e proporção nas frações superiores no sêmen fresco (FTI) e mais inferiores no sêmen refrigerado (FTIII e FTIV) foram distribuídas para outras frações no sêmen congelado. Tais resultados demonstram novamente a possível ação do glicerol e criopreservação sobre o processo de segregação celular.



**Figura 5.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação (média  $\pm$  epm). <sup>a,b</sup>: Colunas com diferentes superescritos em cada fração entre métodos de conservação de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C</sup>: Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada método de conservação de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

### 6.1.3 Efeito do tempo para a análise na segregação celular

Para avaliar o efeito do tempo de realização das análises de segregação celular, as amostras foram divididas, de acordo com a metodologia, em três principais tempos, sendo  $t=-3$  h - para as amostras de sêmen fresco (sem a adição de diluentes),  $t=0$  h - para as amostras processadas e diluídas (TG, CG, LD, TGG, CGG, LDG e BotuBOV<sup>®</sup>), referente ao momento em que as amostras estabilizaram a 5°C na curva de resfriamento, e  $t=24$  h - após a estabilização a 5°C, tanto para o sêmen refrigerado por 24 h, ou para o congelado, após 24 h. Porém, para a análise estatística, os tempos de  $t=0$  h e  $t=24$  h foram subdivididos em 0 e 0g (sêmen diluído sem ou com glicerol, respectivamente, no momento da estabilização a 5°C), e 24 e PC (sêmen refrigerado, sem glicerol, e sêmen congelado, com glicerol, após 24 h, refrigerado ou congelado, respectivamente).

#### 6.1.3.1 Ovinos

Não houve diferença entre os tempos de análises quanto ao número e proporção de células viáveis nas frações FTI e FTII, bem como no total de células nas quatro frações (Tabelas 11 e 12). Porém, houve diferença no número de células nas frações FTIII, FTIV e FTI+II+III (Tabela 11), onde nas frações FTIII e FTI+II+III (por consequência da FTIII), as amostras do tempo 0g (TGG, CGG, LDG, BotuBOV<sup>®</sup>; com glicerol) apresentaram uma média de células viáveis inferior à do tempo 0h (TG, CG, LD; sem glicerol). Já o oposto ocorreu na fração FTIV, onde o tempo 0g apresentou uma média de células viáveis superior ao tempo 0. Já os tempos de 24, PC e -3 se mantiveram semelhantes entre si, sendo também o 0 e o 0g semelhantes ao -3, com apenas uma tendência ( $P=0,079$ ) entre o 0g e o -3 na fração FTIII. As amostras congeladas (TGG, CGG, LDG, BotuBOV<sup>®</sup>), independentemente do fator tempo, apresentaram uma menor concentração celular na fração FTIII e uma maior concentração na fração FTIV. Tais resultados corroboram com a observação da influência do glicerol na migração celular. Considerando o fator tempo, observamos que o 0g também demonstrou diferença na migração celular em relação aos grupos sem glicerol, ocasionando uma menor concentração na fração FTIII e uma maior concentração na fração FTIV, com tais efeitos associados à presença de glicerol no tempo 0 h durante a segregação celular.

**Tabela 11.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm)

Frações	Tempos de análises				
	-3 h	0 h	0g	24 h	PC
FTI	2.250 ± 1.972 <sup>ab</sup>	5.583 ± 1.138 <sup>aA</sup>	2.188 ± 986 <sup>ab</sup>	4.250 ± 1.138 <sup>aA</sup>	2.438 ± 986 <sup>aAB</sup>
FTII	3.250 ± 2.122 <sup>ab</sup>	2.500 ± 1.225 <sup>ab</sup>	5.063 ± 1.061 <sup>aA</sup>	2.000 ± 1.225 <sup>ab</sup>	5.875 ± 1.061 <sup>aA</sup>
FTIII	8.500 ± 2.486 <sup>aA</sup>	7.083 ± 1.435 <sup>aA</sup>	1.125 ± 1.243 <sup>bB</sup>	6.611 ± 1.435 <sup>aA</sup>	5.375 ± 1.243 <sup>abA</sup>
FTIV	200 ± 1.636 <sup>abC</sup>	917 ± 945 <sup>ab</sup>	4.563 ± 818 <sup>bA</sup>	1.083 ± 945 <sup>ab</sup>	1.886 ± 818 <sup>abB</sup>
FTI+II+III	14.000 ± 2.807 <sup>ab</sup>	15.167 ± 1.620 <sup>a</sup>	8.375 ± 1.403 <sup>b</sup>	12.861 ± 1.620 <sup>ab</sup>	13.688 ± 1.403 <sup>a</sup>
FTotal	14.200 ± 2.973 <sup>a</sup>	16.083 ± 1.716 <sup>a</sup>	12.938 ± 1.487 <sup>a</sup>	13.944 ± 1.716 <sup>a</sup>	15.575 ± 1.487 <sup>a</sup>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

A,B,C: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

\*tendência estatística na linha (p<0,1).

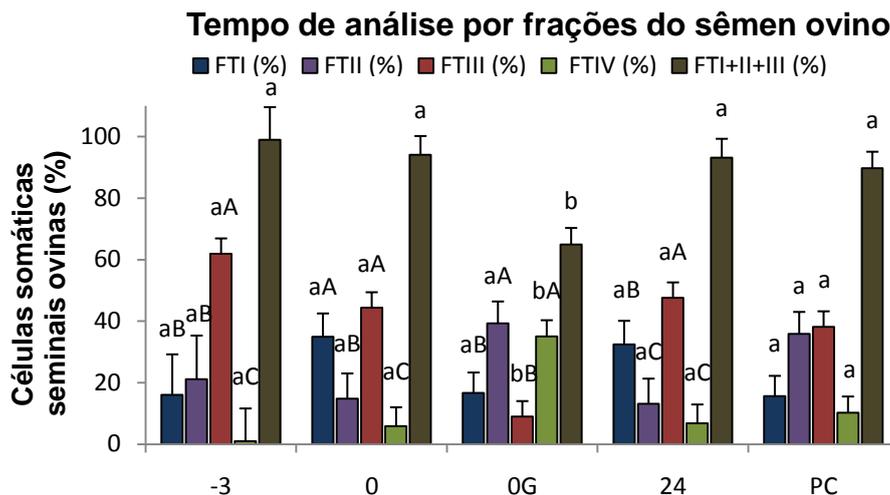
**Tabela 12.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm)

Frações	Tempo				
	-3 h	0 h	0g	24 h	PC
FTI (%)	16,0 ± 13,2 <sup>ab</sup>	34,9 ± 7,6 <sup>aA</sup>	16,7 ± 6,6 <sup>ab</sup>	32,5 ± 7,6 <sup>ab</sup>	15,6 ± 6,6 <sup>ab</sup>
FTII (%)	21,1 ± 14,2 <sup>ab</sup>	14,8 ± 8,2 <sup>ab</sup>	39,3 ± 7,1 <sup>aA</sup>	13,1 ± 8,2 <sup>aC</sup>	35,9 ± 7,1 <sup>aA</sup>
FTIII (%)	61,9 ± 15,3 <sup>aA</sup>	44,4 ± 8,8 <sup>aA</sup>	9,0 ± 7,6 <sup>bB</sup>	47,6 ± 8,8 <sup>aA</sup>	38,2 ± 7,6 <sup>aA</sup>
FTIV (%)	1,0 ± 10,6 <sup>aC</sup>	5,9 ± 6,1 <sup>aC</sup>	35,0 ± 5,3 <sup>bA</sup>	6,8 ± 6,1 <sup>aC</sup>	10,2 ± 5,3 <sup>ab</sup>
FTI+II+III (%)	99,0 ± 10,6 <sup>a</sup>	94,1 ± 6,1 <sup>a</sup>	65,0 ± 5,3 <sup>b</sup>	93,2 ± 6,1 <sup>a</sup>	89,8 ± 5,3 <sup>a</sup>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

A,B,C: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

Entre as frações, houve um maior número e proporção de células recuperadas na fração total III, e menor na fração total IV, no sêmen fresco. No sêmen refrigerado, tanto no t=0 h quanto no t=24 h, houve uma redução não significativa de células na fração total III e um aumento na fração total I. Já no sêmen congelado, as frações totais II e IV e II e III tiveram um maior número e proporção de células no t=0 h e após a descongelação (PC), respectivamente, diferindo do padrão observado no sêmen fresco e refrigerado (Tabelas 11 e 12, Figura 6).



**Figura 6.** Porcentagem de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos em cada fração total, entre os tempos de análises, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada tempo de análise de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

#### 6.1.3.2 Bovinos

Diferente dos ovinos, nos bovinos não foi observada diferença estatística em relação à concentração de CSS nas frações FTI, FTII, FTIII, FTIV e FTI+II+III em função do tempo de análise, mas sim na FTTotal no  $t=0$  h, a qual apresentou uma concentração celular menor do que no tempo pós-descongelamento (PC), conforme a Tabela 13. Entre as frações, em função de cada tempo, um maior número de CSS foi obtido na fração FTI no  $t=-3$  h, e nas frações FTIII e FTIV nos tempos 0g, 24 h e PC, não havendo diferenças entre frações no  $t=0$  h.

Em termos de proporção de CSS por tempo e por fração, em geral, uma menor proporção de CSS foi obtida na fração FTII, independente do tempo. Houve uma menor proporção de CSS nas frações FTI no  $t=0$ g e PC do que nos demais tempos (Tabela 14, Figura 7), com a presença de glicerol no diluente (0g e PC) parecendo ter reduzido a proporção de CSS na FTI. Ainda na fração FTI, o  $t=-3$  h apresentou uma maior proporção de CSS frente as demais, o que reduziu a proporção de CSS nas frações FTIII e FTIV, sendo menores do que no  $t=0$ g (FTII) e nos  $t=24$  h e PC (FTIV). A refrigeração por 24 h e/ou a presença de glicerol e/ou o processo de congelamento estiveram associados ao aumento da proporção de CSS nestas frações mais baixas (FTIII e FTIV) do gradiente de Percoll<sup>®</sup>.

**Tabela 13.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm)

Frações	Tempos de análises				
	-3 h	0 h	0g	24 h	PC
FTI	14.000 ± 318 <sup>aA</sup>	7.917 ± 2.493 <sup>aA</sup>	4.313 ± 2.159 <sup>aB</sup>	9.667 ± 2.493 <sup>aA</sup>	7.375 ± 2.159 <sup>aB</sup>
FTII	5.250 ± 2.908 <sup>aB</sup>	5.250 ± 1.679 <sup>aA</sup>	6.125 ± 1.454 <sup>aB</sup>	3.583 ± 1.679 <sup>aB</sup>	6.813 ± 1.454 <sup>aB</sup>
FTIII	7.000 ± 8.096 <sup>aAB</sup>	10.250 ± 4.674 <sup>aA</sup>	17.500 ± 4.048 <sup>aA</sup>	11.750 ± 4.674 <sup>aA</sup>	19.750 ± 4.048 <sup>aA</sup>
FTIV	7.750 ± 10.087 <sup>aAB</sup>	8.417 ± 5.824 <sup>aA</sup>	21.813 ± 5.044 <sup>aA</sup>	14.083 ± 5.824 <sup>aA</sup>	22.313 ± 5.044 <sup>aA</sup>
FTI+II+III	26.250 ± 9.242 <sup>a</sup>	23.417 ± 5.336 <sup>a</sup>	27.938 ± 4.621 <sup>a</sup>	25.000 ± 5.336 <sup>a</sup>	33.938 ± 4.621 <sup>a</sup>
FTotal	34.000 ± 10.698 <sup>ab</sup>	31.833 ± 6.177 <sup>a</sup>	49.750 ± 5.349 <sup>ab</sup>	39.083 ± 6.177 <sup>ab</sup>	56.250 ± 5.349 <sup>b</sup>

a,b: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

A,B: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

**Tabela 14.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150 µL retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média ± epm)

Frações	Tempo				
	-3 h	0 h	0g	24 h	PC
FTI (%)	43,0 ± 11,2 <sup>aA</sup>	29,5 ± 6,4 <sup>bA</sup>	10,1 ± 5,6 <sup>cB</sup>	26,1 ± 6,4 <sup>bA</sup>	13,6 ± 5,6 <sup>cB</sup>
FTII (%)	11,2 ± 5,0 <sup>aC</sup>	14,9 ± 2,9 <sup>aB</sup>	12,5 ± 2,5 <sup>aB</sup>	8,5 ± 2,9 <sup>aB</sup>	12,0 ± 2,5 <sup>aB</sup>
FTIII (%)	24,1 ± 16,1 <sup>bB</sup>	26,9 ± 9,3 <sup>abA</sup>	39,9 ± 8 <sup>aA</sup>	34,1 ± 9,3 <sup>abA</sup>	38,2 ± 8,0 <sup>abA</sup>
FTIV (%)	21,6 ± 17,4 <sup>bB</sup>	28,7 ± 10,0 <sup>abA</sup>	37,5 ± 8,7 <sup>abA</sup>	31,3 ± 10,0 <sup>aA</sup>	36,2 ± 8,7 <sup>aA</sup>
FTI+II+III (%)	78,4 ± 17,4 <sup>a</sup>	71,3 ± 10,0 <sup>ab</sup>	62,5 ± 8,7 <sup>b</sup>	68,7 ± 10,0 <sup>ab</sup>	63,8 ± 8,7 <sup>b</sup>

a,b,c: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

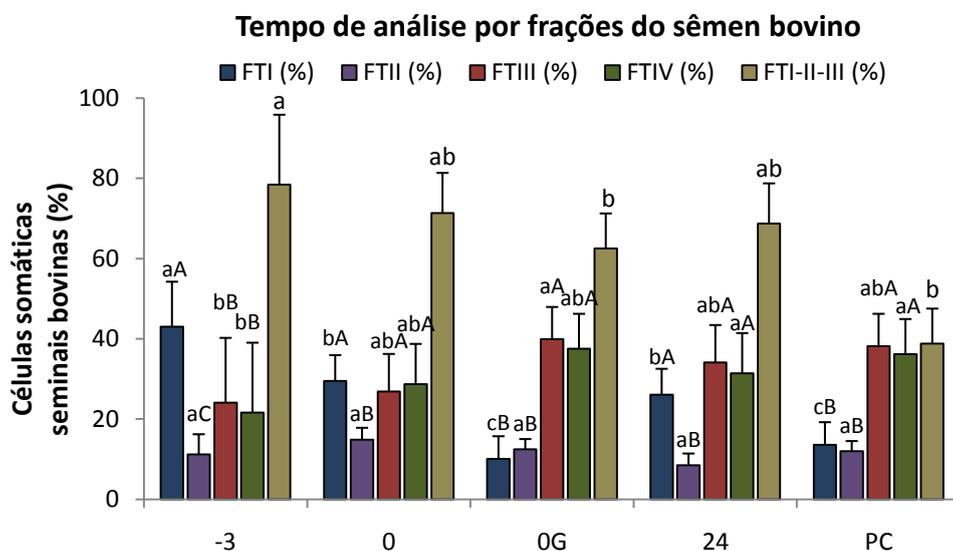
A,B: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

#### 6.1.4 Tipo de diluente e tempo de análise

##### 6.1.4.1 Ovinos

Houve diferença significativa no número e proporção de células viáveis obtidas por fração de acordo com os diluentes e os tempos de realização das segregações celulares (t=0 h e t=24 h), conforme evidenciado na Tabela 15 e Figuras 8 e 9. Observou-se uma concentração de células na fração FTIII quando se segregou uma amostra de sêmen fresco, assim como os diluentes TG e CG. Porém, e de modo geral, os diluentes se comportaram de maneira semelhante entre os distintos tempos de avaliação, em termos de segregação

de CSS por fração, com o número e proporção de CSS nas frações e tempos sendo semelhantes dentro do mesmo diluente, com variações entre diluentes com respeito às frações predominantes de obtenção de CSS, com exceção dos diluentes TGG e o diluente comercial (BotuBOV<sup>®</sup>) entre os tempos t=0 h e t=24 h nas frações FTIII, FTIV e FTI+II+III. Ambos os diluentes renderam uma concentração e proporção maiores de CSS na fração FTIV no t=0 h, o que reduziu o número e proporção de CSS na fração I+II+III no t=0 h, e na fração FTIII na pós-descongelamento (t=24 h). Em ambos os diluentes acima, os quais contém glicerol, houve uma maior concentração de CSS na FTIV antes da congelação (t=0 h), havendo uma mudança para a FTIII após a congelação (t=24 h). Já o diluente TG, contendo a mesma base do TGG, porém sem glicerol, e o diluente CG, concentraram a segregação das células na fração FTIII, independente do tempo de análise. A adição de glicerol ao diluente CG (CGG) mudou a concentração das CSS para a fração anterior (FTII), em ambos os tempos de análise.



**Figura 7.** Porcentagem de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b</sup>: Colunas com diferentes superescritos em cada fração total, entre os tempos de análises, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C</sup>: Colunas com diferentes superescritos entre frações totais para cada tempo de análise de sêmen diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 15.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média ± epm)

Diluentes	Fração I		Fração II		Fração III		Fração IV		Frações I + II + III*		Fração Total* (I + II + III + IV)	
	0 h	24 h	0h	24 h	0 h	24 h	0 h	24h	0 h	24 h	0 h	24 h
<b>Fresco</b> t=3 h	2.250 <sup>b</sup> (16,0%) <sup>bBCD</sup>	----	3.250 <sup>b</sup> (21,1%) <sup>bB</sup>	----	8.500 <sup>a</sup> (61,9%) <sup>aA</sup>	----	200 <sup>b</sup> (1,0%) <sup>cC</sup>	----	14.000 <sup>a</sup> (99,0%) <sup>A</sup>	----	14.200 <sup>a</sup>	----
<b>TG</b>	2.000 <sup>bC</sup> (12,9%) <sup>bCD</sup>	1.500 <sup>bC</sup> (14,1%) <sup>bBC</sup>	2.250 <sup>bC</sup> (14,2%) <sup>bBC</sup>	1.250 <sup>bC</sup> (8,3%) <sup>bC</sup>	10.500 <sup>aA</sup> (65,6%) <sup>aA</sup>	8.500 <sup>aB</sup> (70,9%) <sup>aA</sup>	1.250 <sup>bC</sup> (7,3%) <sup>cBC</sup>	1.000 <sup>aC</sup> (6,7%) <sup>cBC</sup>	14.750 <sup>aA</sup> (92,7%) <sup>aAB</sup>	11.250 <sup>aA</sup> (93,3%) <sup>aAB</sup>	16.000 <sup>a</sup>	12.250 <sup>a</sup>
<b>CG</b>	2.000 <sup>bB</sup> (12,0%) <sup>bCD</sup>	1.250 <sup>bB</sup> (7,2%) <sup>bC</sup>	2.000 <sup>bCB</sup> (11,8%) <sup>bBC</sup>	1.750 <sup>bB</sup> (13,2%) <sup>bBC</sup>	10.750 <sup>aA</sup> (67,6%) <sup>aA</sup>	10.833 <sup>aA</sup> (68,5%) <sup>aA</sup>	1.250 <sup>bB</sup> (8,6%) <sup>bB</sup>	1.750 <sup>aB</sup> (11,1%) <sup>aAB</sup>	14.750 <sup>aA</sup> (91,4%) <sup>aB</sup>	13.833,3 <sup>aA</sup> (88,9%) <sup>aBC</sup>	16.000 <sup>a</sup>	15.583 <sup>a</sup>
<b>LD</b>	12.750 <sup>aA</sup> (79,9%) <sup>aA</sup>	10.000 <sup>aA</sup> (76,3%) <sup>aA</sup>	3.250 <sup>bCB</sup> (18,5%) <sup>bB</sup>	3.000 <sup>bB</sup> (17,7%) <sup>bB</sup>	0 <sup>bD</sup> (0,0%) <sup>cD</sup>	500 <sup>bC</sup> (3,3%) <sup>cD</sup>	250 <sup>bC</sup> (1,7%) <sup>cC</sup>	500 <sup>aC</sup> (2,7%) <sup>cC</sup>	16.000 <sup>aA</sup> (98,3%) <sup>aA</sup>	13.500 <sup>aA</sup> (97,3%) <sup>aA</sup>	16.250 <sup>a</sup>	14.000 <sup>a</sup>
<b>TGG</b>	1.000 <sup>bCD</sup> (7,3%) <sup>cdD</sup>	1.250 <sup>bC</sup> (14,2%) <sup>bcBC</sup>	1.000 <sup>bCD</sup> (5,1%) <sup>dC</sup>	1.000 <sup>bC</sup> (9,7%) <sup>cBC</sup>	2.750 <sup>bB</sup> (22,9%) <sup>bB</sup>	6.000 <sup>aA</sup> (70,2%) <sup>aA</sup>	8.750 <sup>aA</sup> (64,6%) <sup>aA</sup>	500 <sup>aBD</sup> (5,9%) <sup>dBC</sup>	4.750 <sup>aC</sup> (35,4%) <sup>bC</sup>	8.250 <sup>aA</sup> (94,1%) <sup>aA</sup>	13.500 <sup>a</sup>	8.750 <sup>a</sup>
<b>CGG</b>	2.000 <sup>bC</sup> (12,3%) <sup>ccD</sup>	1.250 <sup>bC</sup> (7,9%) <sup>cC</sup>	7.750 <sup>aA</sup> (70,5%) <sup>aA</sup>	9.250 <sup>aA</sup> (54,4%) <sup>aA</sup>	1.250 <sup>bC</sup> (10,0%) <sup>cC</sup>	4.250 <sup>bBC</sup> (24,2%) <sup>bC</sup>	750 <sup>bC</sup> (7,1%) <sup>cBC</sup>	2.750 <sup>aBC</sup> (13,5%) <sup>bcAB</sup>	10.500 <sup>aB</sup> (92,9%) <sup>aAB</sup>	14.750 <sup>aA</sup> (86,5%) <sup>aBC</sup>	11.250 <sup>a</sup>	17.500 <sup>a</sup>
<b>LDG</b>	3.000 <sup>bB</sup> (20,9%) <sup>bBC</sup>	3.500 <sup>bB</sup> (21,5%) <sup>bB</sup>	10.500 <sup>aCA</sup> (74,3%) <sup>aA</sup>	10.250 <sup>aCA</sup> (66,6%) <sup>aA</sup>	500 <sup>bC</sup> (3,2%) <sup>cdCD</sup>	1.250 <sup>bBC</sup> (8,0%) <sup>cD</sup>	250 <sup>bC</sup> (1,6%) <sup>dC</sup>	550 <sup>aC</sup> (3,8%) <sup>cdC</sup>	14.000 <sup>aA</sup> (98,4%) <sup>aA</sup>	15.000 <sup>aA</sup> (96,2%) <sup>aA</sup>	14.250 <sup>a</sup>	15.550 <sup>a</sup>
<b>BotuBOV</b> ®	3.250 <sup>bB</sup> (20,9%) <sup>bBC</sup>	3.750 <sup>bB</sup> (18,9%) <sup>bcB</sup>	1.000 <sup>b</sup> (7,2%) <sup>dC</sup>	3.000 <sup>bB</sup> (12,7%) <sup>cdBC</sup>	0 <sup>bC</sup> (0,0%) <sup>ed</sup>	10.000 <sup>aA</sup> (50,7%) <sup>aB</sup>	8.500 <sup>aA</sup> (66,6%) <sup>aA</sup>	3.750 <sup>aB</sup> (17,7%) <sup>bcA</sup>	4.250 <sup>aB</sup> (33,4%) <sup>bC</sup>	16.750 <sup>aA</sup> (33,4%) <sup>aC</sup>	12.750 <sup>a</sup>	20.500 <sup>a</sup>
<i>e.p.m.</i>	± 806 (± 4,9%)		± 1.228 (± 6,0%)		± 1.514 (± 5,3%)		± 1.025 (± 4,3%)		± 2.595 (± 4,3%)		± 2.992	

<sup>a-e</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A-E</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

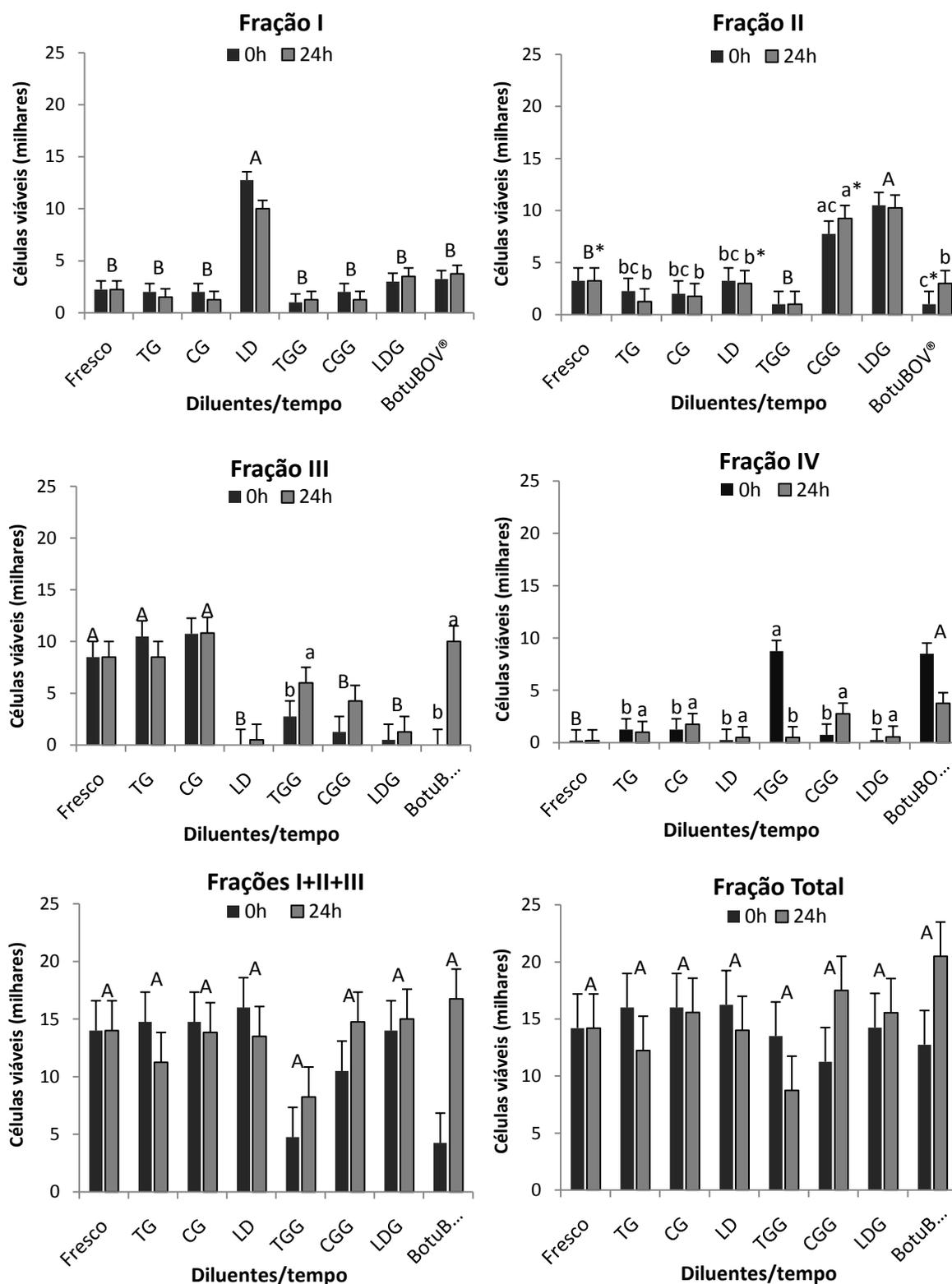
\*Superescritos denotam somente comparações estatísticas entre o t=0 h e o t= 24 h dentro do somatório das frações I, II e III (Frações I + II + III) e frações I, II, III e IV (Fração Total, I + II + III + IV).

*e.p.m.*: erro padrão médio por fração ou totais das frações, para ambos os tempos (t=0 h e t=24 h).

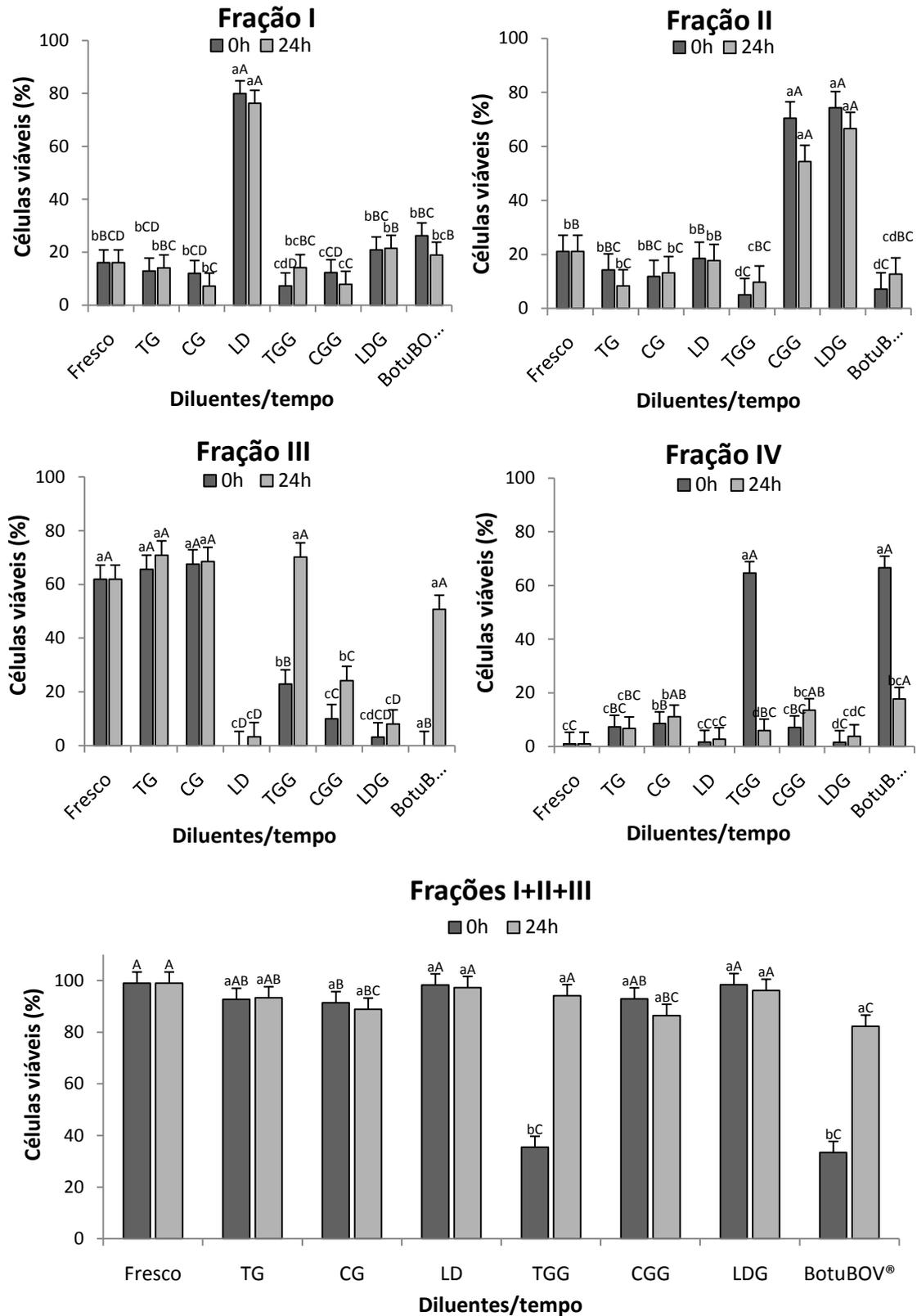
Marcados na tabela estão os padrões mais predominantes de migração de células somáticas seminais bovinas nas frações de acordo com os tempos de avaliação em cada diluente utilizado, com a segregação do sêmen fresco utilizada como referência.

As diferenças observadas quanto à segregação das CSS também puderam ser evidenciadas de acordo com a composição base dos diluentes, em especial quanto ao material de origem biológica em uso (solução base com gema de ovo ou leite). Os diluentes à base de gema (TG e CG), sem glicerol, apresentaram uma maior concentração e proporção de CSS na fração FTIII, enquanto o diluente à base de leite (LD), sem glicerol, apresentou uma maior concentração e proporção de células na fração FTI. Porém, com a adição do glicerol aos diluentes TG (TGG), CG (CGG) e LD (LDG), houve uma mudança de comportamento após a segregação celular. Houve um comportamento semelhante entre o TGG, o CGG e o LDG em concentrar as CSS em frações distintas dos diluentes homônimos sem glicerol da coluna de Percoll<sup>®</sup>. Por outro lado, o diluente LD à base de leite desnatado apresentou um padrão distinto dos diluentes à base de gema de ovo, com a obtenção 78,1% de todas as CSS recuperadas estando presentes na fração FTI (79,9% no t=0 h e 76,3% no t=24 h), com apenas 18,1%, 1,7% e 2,2% das CSS sendo recuperadas nas frações FTII, FTIII e FTIV, respectivamente. Já o diluente LDG, com a mesma base do diluente LD, exceto pela adição de glicerol, apresentou uma maior porcentagem de células na fração FTII (70,4%) e, conseqüentemente, menor concentração nas demais frações FTI, FTIII, FTIV.

Não houve diferença em relação ao número de CSS totais (FTotal) obtidas das quatro frações de Percoll<sup>®</sup> entre os grupos de diluentes, mas houve diferença quanto ao número de CSS por fração (FTI, FTII, FTIII e FTIV). Um relativo baixo número e proporção de CSS foi obtido na FTI para os diluentes TG, TGG, CG, CGG, LDG e BotuBOV<sup>®</sup>, não diferindo entre si. Tais resultados corroboram com a hipótese de que a composição do diluente e a presença de glicerol influenciam na distribuição das células durante a segregação celular, visto que houve diferença tanto entre os diluentes com bases diferentes, quanto para diluentes de bases iguais acrescidos ou não de glicerol, demonstrando o efeito do glicerol no processo de segregação celular. A influência do glicerol também foi evidenciada pela distribuição das CSS por fração nos diluentes à base de citrato-gema, conforme acima.



**Figura 8.** Número de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração (I, II, III, IV) e nos totais de frações (I+II+III e Total) de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b</sup>: Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, em apenas no t=0 h ou t=24 h ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C</sup>: Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, para ambos os tempos ( $P < 0,05$ ). \*tendência estatística entre diluentes ( $P < 0,1$ ).



**Figura 9.** Proporção de células somáticas seminais ovinas obtidas em cada fração (I, II, III, IV) e nos totais de frações (I+II+III e Total) de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média  $\pm$  epm;  $P > 0,05$ ).

#### 6.1.4.2 Bovinos

Houve diferença significativa no número e proporção de células viáveis obtidas por fração de acordo com os diluentes e os tempos (t=0 h e t=24 h) de realização das segregações celulares (Tabela 16, Figuras 10 e 11). Diferente do que foi observado no sêmen ovino, houve uma concentração de células na fração FTI quando se segregou uma amostra de sêmen fresco, assim como com o diluente CG. Porém, e de modo geral, os diluentes com o sêmen bovino também se comportaram de maneira semelhante entre os distintos tempos de avaliação, em termos de segregação de CSS por fração, com o número e proporção de CSS nas frações e tempos sendo semelhantes dentro do mesmo diluente, com variações entre diluentes com respeito às frações predominantes de obtenção de CSS, com exceção do diluente CGG entre os tempos t=0 h e t=24 h nas frações FTIII, FTIV e FTI+II+III. O diluente CGG rendeu uma concentração e proporção maiores de CSS na fração FIII no t=0 h, e na fração FTIV na pós-descongelação (t=24 h), o que reduziu o número e proporção de CSS na fração I+II+III no t=24 h. Já o diluente CG, contendo a mesma base do TGG, porém sem glicerol, concentrou a segregação das células na fração FTI, independente do tempo de análise. Esta mudança de fração de coleta de CSS com a presença de glicerol também ocorreu nos diluentes à base de Tris-gema, com o diluente TG concentrando as células na fração FTIII, e o TGG na fração FTIV. Curiosamente, o diluente à base de lactose-gema também mudou de fração com a adição de glicerol, exceto que houve uma concentração em uma fração anterior quando da adição de glicerol (LDG, fração FTIII), enquanto que o diluente sem glicerol concentrou CSS na fração FTIV. Por fim, o diluente comercial (BotuBOV<sup>®</sup>), que contém glicerol, concentrou as CSS na fração FTIV, a exemplo do que ocorreu com outros diluentes com glicerol e à base de gema de ovo, exceto para o diluente lactose-gema-glicerol (LDG). Um baixo número e proporção de CSS foi obtido na FTII para o sêmen bovino, independente do tipo de sêmen, diluente ou tempo de avaliação. Porém, houve variação do sêmen bovino quanto ao número de CSS por fração (FTI, FTIII e FTIV), de acordo com o sêmen (fresco ou diluído) e diluentes. A composição do diluente e a presença de glicerol influenciaram na distribuição das CSS durante a segregação celular, tanto para o sêmen ovino quanto bovino.

**Tabela 16.** Número (média ± epm) e proporção (%) de células somáticas seminais bovinas obtidas nas frações de 150 µL retirados do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise

Diluentes	Fração I		Fração II		Fração III		Fração IV		Frações I + II + III*		Fração Total (I + II + III + IV)	
	0 h	24 h	0h	24 h	0 h	24 h	0 h	24h	0 h	24 h	0 h	24 h
<b>Fresco</b> <b>t=3 h</b>	19.500 <sup>a</sup> (49,1%) <sup>ab</sup>	-----	6.938 <sup>a</sup> (14,0%) <sup>ba</sup>	-----	6.563 <sup>a</sup> 20,6% <sup>bc</sup>	-----	5.813 <sup>ab</sup> (16,2%) <sup>bcd</sup>	-----	33.000 <sup>ab</sup> (83,8%) <sup>bc</sup>	-----	38.813 <sup>a</sup>	-----
<b>TG</b>	8.438 <sup>ab</sup> (22,7%) <sup>bc</sup>	8.625 <sup>ab</sup> (18,6%) <sup>b-B</sup>	5.063 <sup>abc</sup> (11,9%) <sup>ca</sup>	3.188 <sup>ac</sup> (10,1%) <sup>ca</sup>	27.750 <sup>ba</sup> (63,9%) <sup>aa</sup>	22.313 <sup>aa</sup> (57,4%) <sup>aa</sup>	938 <sup>bd</sup> (1,5%) <sup>de</sup>	5.250 <sup>abc</sup> (13,9%) <sup>bcc</sup>	41.250 <sup>aba</sup> (98,5%) <sup>aa</sup>	34.125 <sup>aba</sup> (86,1%) <sup>ba</sup>	42.188 <sup>a</sup>	39.375 <sup>a</sup>
<b>CG</b>	21.938 <sup>aa</sup> (64,9%) <sup>aa</sup>	24.188 <sup>aa</sup> (50,0%) <sup>ba</sup>	6.375 <sup>ac</sup> (14,8%) <sup>cdA</sup>	8.250 <sup>ac</sup> (10,6%) <sup>da</sup>	5.625 <sup>ac</sup> (12,8%) <sup>cdC</sup>	12.000 <sup>ab</sup> (23,5%) <sup>bcB</sup>	3.938 <sup>bc</sup> (7,5%) <sup>dD</sup>	11.063 <sup>ab</sup> (15,9%) <sup>cdC</sup>	3.393 <sup>aba</sup> (92,5%) <sup>ab</sup>	44.438 <sup>aba</sup> (84,2%) <sup>ba</sup>	37.875 <sup>a</sup>	55.500 <sup>a</sup>
<b>LG</b>	1.500 <sup>ac</sup> (4,3%) <sup>dE</sup>	4.313 <sup>ab</sup> (9,0%) <sup>bcdC</sup>	2.438 <sup>ac</sup> (11,2%) <sup>bcd</sup>	2.625 <sup>ac</sup> (6,4%) <sup>cdA</sup>	4.875 <sup>ab</sup> (14,5%) <sup>bcc</sup>	9.188 <sup>ab</sup> (18,6%) <sup>bc</sup>	19.500 <sup>ba</sup> (70,0%) <sup>aa</sup>	30.188 <sup>aa</sup> (66,0%) <sup>aa</sup>	8.813 <sup>bb</sup> (30,0%) <sup>aE</sup>	16.125 <sup>bb</sup> (34,0%) <sup>ac</sup>	28.313 <sup>a</sup>	46.313 <sup>a</sup>
<b>TGG</b>	9.938 <sup>abc</sup> (14,7%) <sup>ccd</sup>	6.563 <sup>ac</sup> (16,3%) <sup>cbc</sup>	9.188 <sup>abc</sup> (10,1%) <sup>ca</sup>	5.250 <sup>ac</sup> (7,8%) <sup>ca</sup>	11.063 <sup>ab</sup> (13,2%) <sup>cc</sup>	14.250 <sup>ab</sup> (33,9%) <sup>bb</sup>	46.875 <sup>aa</sup> (62,1%) <sup>aa</sup>	23.063 <sup>ab</sup> (42,0%) <sup>bb</sup>	30.188 <sup>aa</sup> (37,9%) <sup>be</sup>	26.063 <sup>aa</sup> (58,0%) <sup>ab</sup>	77.063 <sup>a</sup>	49.125 <sup>a</sup>
<b>CGG</b>	8.813 <sup>ac</sup> (12,2%) <sup>ccd</sup>	10.688 <sup>abc</sup> (13,8%) <sup>cbc</sup>	12.750 <sup>ab</sup> (20,1%) <sup>bcA</sup>	10.125 <sup>ab</sup> (14,4%) <sup>ca</sup>	33.188 <sup>aa</sup> (46,7%) <sup>ab</sup>	18.938 <sup>ab</sup> (29,8%) <sup>abb</sup>	10.125 <sup>bbc</sup> (21,0%) <sup>bcc</sup>	33.000 <sup>aa</sup> (42,0%) <sup>ab</sup>	54.750 <sup>aa</sup> (79,0%) <sup>ac</sup>	39.750 <sup>aa</sup> (58,0%) <sup>bb</sup>	64.875 <sup>a</sup>	72.750 <sup>a</sup>
<b>LGG</b>	6.000 <sup>ac</sup> (9,9%) <sup>bDE</sup>	3.750 <sup>ac</sup> (8,5%) <sup>bc</sup>	5.063 <sup>ac</sup> (12,1%) <sup>ba</sup>	4.125 <sup>ac</sup> (11,3%) <sup>ba</sup>	31.875 <sup>aa</sup> (61,9%) <sup>aa</sup>	33.375 <sup>aa</sup> (65,8%) <sup>aa</sup>	10.125 <sup>bb</sup> (16,2%) <sup>bcd</sup>	5.438 <sup>ac</sup> (14,4%) <sup>bc</sup>	42.938 <sup>aba</sup> (83,8%) <sup>abc</sup>	41.250 <sup>aba</sup> (85,6%) <sup>aa</sup>	53.063 <sup>a</sup>	46.688 <sup>a</sup>
<b>BotuBOV®</b>	6.000 <sup>ac</sup> (13,9%) <sup>ccd</sup>	4.875 <sup>ac</sup> (11,3%) <sup>cbc</sup>	5.813 <sup>ac</sup> (11,5%) <sup>ca</sup>	5.438 <sup>ac</sup> (12,2%) <sup>ca</sup>	10.875 <sup>ab</sup> (36,0%) <sup>bb</sup>	11.250 <sup>ab</sup> (26,1%) <sup>bbc</sup>	18.000 <sup>aba</sup> (38,6%) <sup>abb</sup>	22.688 <sup>aa</sup> (50,5%) <sup>ab</sup>	22.688 <sup>aba</sup> (61,4%) <sup>ad</sup>	21.563 <sup>aba</sup> (49,5%) <sup>ab</sup>	40.688 <sup>a</sup>	44.250 <sup>a</sup>
<i>e.p.m.</i>	± 4.079 (± 4,7%)		± 2.763 (± 4,2%)		± 6.595 (± 8,2%)		± 5.861 (± 8,1%)		± 10.396 (± 8,1%)		± 12.142	

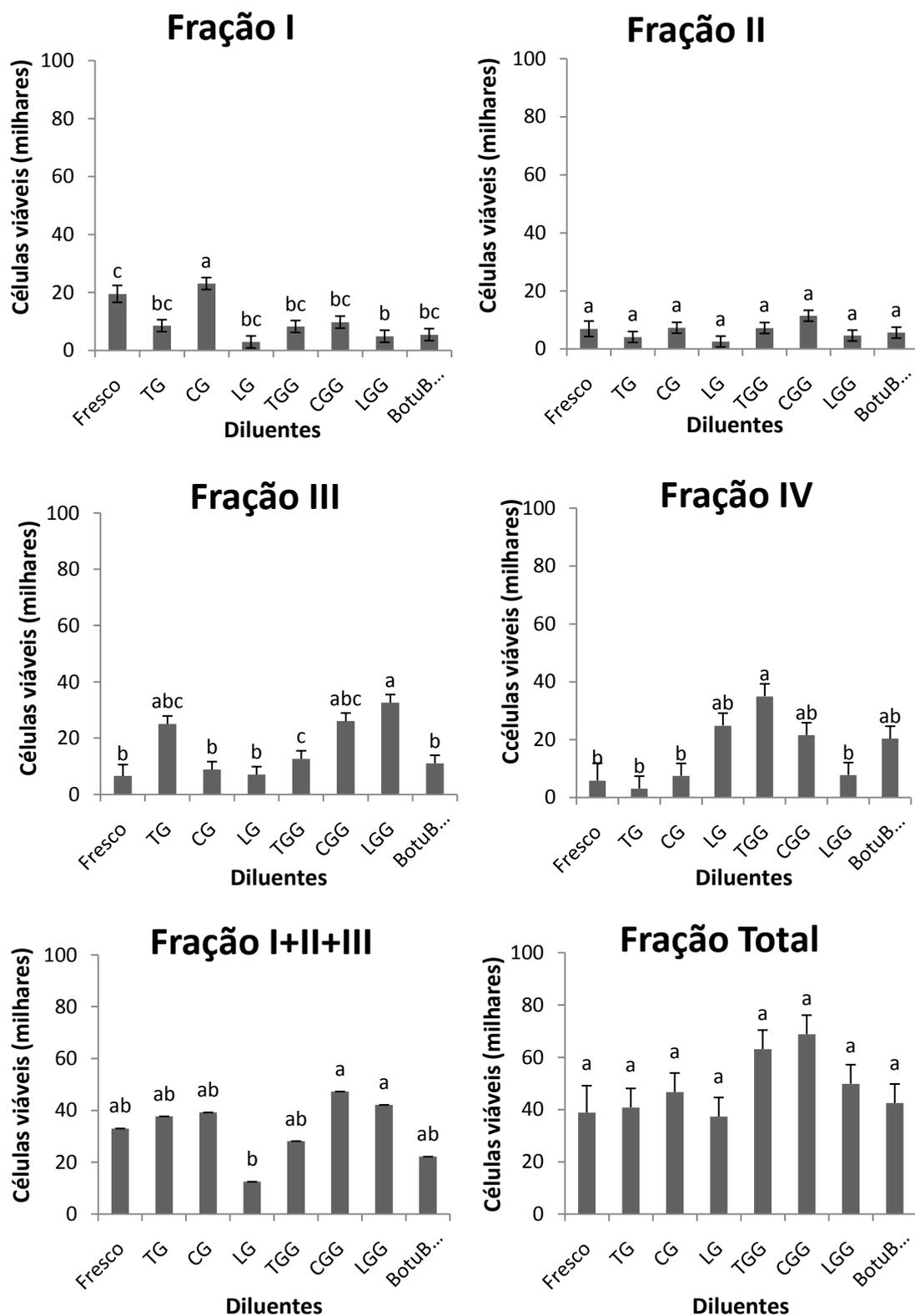
<sup>a-e</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A-E</sup>: Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

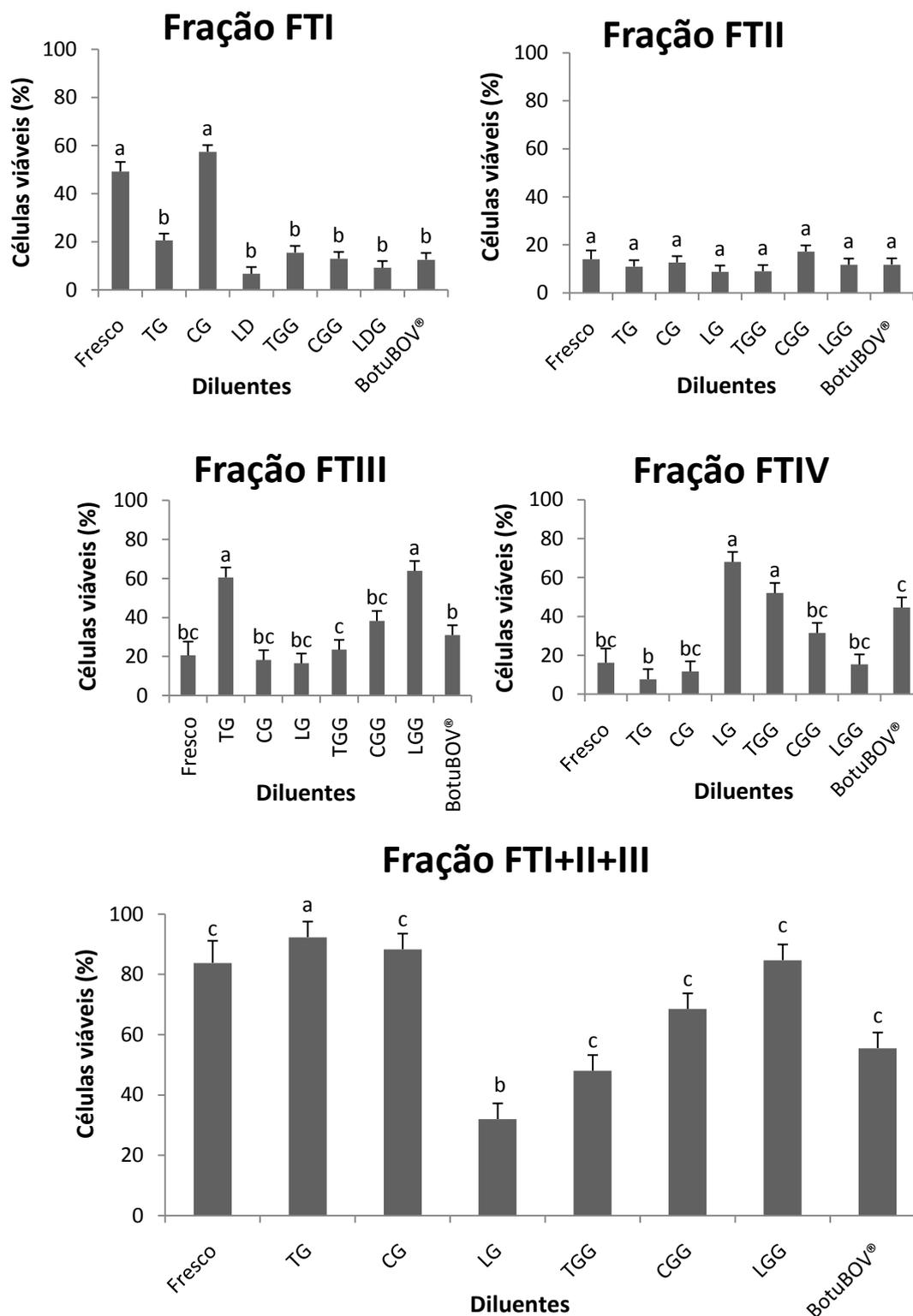
\*Superescritos denotam somente comparações estatísticas entre o t=0 h e o t= 24 h dentro do somatório das frações I, II e III (Frações I + II + III).

*e.p.m.*: erro padrão médio por fração ou totais das frações, para ambos os tempos (t=0 h e t=24 h).

Marcados na tabela estão os padrões mais predominantes de migração de células somáticas seminais bovinas nas frações de acordo com os tempos de avaliação em cada diluente utilizado, com a segregação do sêmen fresco utilizada como referência.



**Figura 10.** Número de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração (I, II, III, IV) e nos totais de frações (I+II+III e Total) de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente, visto não haver diferença entre os tempos de análise (média  $\pm$  epm). <sup>a,b:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, em apenas no t=0 h ou t=24 h ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C:</sup> Colunas com diferentes superescritos entre diluentes diferem estatisticamente, para ambos os tempos ( $P < 0,05$ ). \*tendência estatística entre diluentes ( $P < 0,1$ ).



**Figura 11.** Proporção de células somáticas seminais bovinas obtidas em cada fração (I, II, III, IV) e nos totais de frações (I+II+III e Total) de 150  $\mu$ L retiradas do gradiente de Percoll® após a segregação celular, de acordo com o tipo de diluente, visto não haver diferença entre os tempos de análise (média  $\pm$  epm;  $P > 0,05$ ).

### **6.1.5 Correlações entre a segregação de células viáveis por fração**

Nos ovinos, foram observadas correlações positivas ( $r > 0,5$ ,  $P < 0,05$ ) com relação à quantidade e proporção de células somáticas viáveis obtidas em cada fração, sendo evidentes entre as frações FTI, FTII e FTIII com relação ao somatório das frações FTI, FTII e FTIII. Tal observação é esperada, visto que o aumento da concentração de células em uma destas frações acarreta um aumento também no somatório de todas. O mesmo tipo de correlação também ocorreu entre as frações FTII e FTIII com o somatório total das quatro frações. No entanto, também foram encontradas correlações negativas ( $r > -0,5$ ,  $P < 0,05$ ) entre o número e a proporção de CSS obtidas nas frações FTI e FTIII, ou seja, o aumento da concentração de células em uma fração acarreta a diminuição na outra, e vice-versa. O mesmo ocorreu entre a fração IV e o somatório das frações I, II e III. Tais resultados também corroboram a hipótese de que a composição do diluente interfere na distribuição das células pelas frações, visto que quando ocorre uma diminuição de células em uma das frações com o aumento em outra fração, podemos observar esta redistribuição de células nas diferentes colunas do gradiente de Percoll®.

Nos bovinos, correlações positivas ( $r > 0,5$ ,  $P < 0,05$ ) também foram observadas entre as frações FTI e FTII, entre as frações FTI, FTII e FTIII com a fração FTI+II+III, e entre as frações FTI, FTII, FTIII e FTIV com a FTot, conforme esperado. Também foram evidenciadas correlações negativas ( $r > -0,5$ ,  $P < 0,05$ ) entre a proporção de CSS (%) nas frações FTIII e a FTIV, indicando uma relação inversa entre estas frações. O mesmo ocorreu entre a fração FTIV e a FTI+II+III (%). Tais resultados também corroboram a hipótese de que a composição do diluente interfere na distribuição das células pelas frações, visto que quando ocorre uma diminuição de células em uma das frações com o aumento em outra fração, podemos observar esta redistribuição das células nas distintas frações do gradiente de Percoll®.

## **6.2 Proporção de células e debris celulares**

### **6.2.1 Proporção de células somáticas seminais viáveis e não viáveis**

#### 6.2.1.1 Ovinos

Uma menor proporção de CSS totais ovinas foi observada na fração FTI+II+III ( $P = 0,014$ ) e na fração FTIII ( $P = 0,05$ ), respectivamente, em amostras

congeladas (Tabela 17). Da mesma forma, também houve uma maior proporção de células inviáveis na fração FTtotal ( $P < 0,05$ ) oriundas de amostras congeladas (Tabela 17). Uma maior proporção de células totais foi observada na fração FTIV no tempo 0g (35,9%) em comparação aos tempos 0 e 24 (5,9% e 6,6%). No tempo -3 (sêmen fresco), houve uma menor proporção de células totais (35,3%) na FTI+II+III em relação aos tempos 0 e 24 (94,1% e 93,4%). Também houve uma maior proporção de células inviáveis na fração FTtotal nos tempos 0g e PC, referentes as amostras congeladas.

**Tabela 17.** Proporção de células somáticas seminais ovinas viáveis, não viáveis e totais obtidas nas frações de 150  $\mu$ L retirados do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação do sêmen ovino (média  $\pm$  epm)

Frações	Células	Método de preservação		
		Fresco	Refrigerado	Congelado
FTI	Viáveis	100 <sup>a</sup>	94,5 <sup>a</sup>	86,9 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>
	Total	15,9 <sup>a</sup>	32,8 <sup>a</sup>	16,1 <sup>a</sup>
FTII	Viáveis	100 <sup>a</sup>	81,8 <sup>a</sup>	78,3 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>
	Total	21,0 <sup>ab</sup>	15,2 <sup>a</sup>	35,9 <sup>b</sup>
FTIII	Viáveis	100 <sup>a</sup>	72,6 <sup>a</sup>	67,3 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	20,2 <sup>a</sup>
	Total	61,9 <sup>a</sup>	46,1 <sup>a</sup>	24,8 <sup>a</sup>
FTIV	Viáveis	33,3 <sup>a</sup>	47,4 <sup>a</sup>	73,5 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	14,0 <sup>a</sup>
	Total	1,0 <sup>a</sup>	5,9 <sup>a</sup>	23,2 <sup>a</sup>
FTI+II+III	Viáveis	100 <sup>a</sup>	97,4 <sup>a</sup>	95,4 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>
	Total	99,0 <sup>a</sup>	94,1 <sup>a</sup>	76,8 <sup>b</sup>
Total	Viáveis	100 <sup>a</sup>	97,5 <sup>a</sup>	76,8 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	5,5 <sup>b</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

As amostras submetidas aos diluentes com glicerol (TGG, CGG, LDG e BotuBOV<sup>®</sup>) apresentaram uma maior proporção de células recuperadas na fração FTII I no tempo 24 h do que no t=0 h, com tal relação não ocorrendo nas amostras diluídas sem glicerol (TG, CG e LD). Também houve uma menor recuperação de CSS na fração FTIII no diluente LD (5,8%). Já nas frações FTI+II+III e FTtotal, houve uma menor proporção de células viáveis nos diluentes TGG, CGG, LDG e BotuBOV<sup>®</sup>. Foram observadas correlações

positivas ( $r>0,5$ ,  $P<0,05$ ) entre as frações FTI, FTII e FTIII com relação ao somatório das frações FTI, FTII e FTIII e com o somatório total das quatro frações (FTotal).

### 6.2.1.2 Bovinos

Uma maior e menor proporção de CSS totais bovinas (viáveis e inviáveis) foi observada na fração FTIII ( $P=0,05$ ) e na fração FTI+II+III ( $P<0,05$ ), respectivamente, em amostras de sêmen congelado em relação ao fresco e ao refrigerado, com uma maior proporção de células inviáveis ( $P<0,05$ ) na fração FTtotal nas amostras de sêmen congelado (Tabela 18). Com relação ao tempo de análise, foi observada uma maior porcentagem de células totais na fração FTI no tempo -3, 0 e 24 (49,5%; 30,7% e 26,7%) em comparação aos tempos 0g e PC (12,7% e 12,8%).

**Tabela 18.** Proporção de células somáticas seminais bovinas viáveis, não viáveis e totais obtidas nas frações de 150  $\mu$ L retirados do gradiente de Percoll<sup>®</sup> após a segregação celular, de acordo com o método de preservação do sêmen ovino (média  $\pm$  epm)

Frações	Células	Método de preservação		
		Fresco	Refrigerado	Congelado
FTI	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
	Total	46,6 <sup>a</sup>	21,4 <sup>a</sup>	12,9 <sup>a</sup>
FTII	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
	Total	13,9 <sup>a</sup>	9,5 <sup>a</sup>	13,9 <sup>a</sup>
FTIII	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
	Total	17,2 <sup>a</sup>	24,3 <sup>a</sup>	35,8 <sup>a*</sup>
FTIV	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
	Total	17,6 <sup>a</sup>	18,2 <sup>a</sup>	31,7 <sup>a</sup>
FTI+II+III	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	99,4 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,6 <sup>a</sup>
	Total	82,4 <sup>a</sup>	81,3 <sup>a</sup>	68,3 <sup>b</sup>
Total	Viáveis	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	98,5 <sup>a</sup>
	Não viáveis	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>

a,b: Números seguidos de letras designais na linha diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

\*Tendência estatística na linha ( $p<0,1$ )

O número total de células na fração FTI no diluente CG foi superior (57,4%) aos demais diluentes (TG, LG, TGG, CGG, LGG e BotuBOV<sup>®</sup>). Já na FTIII, os diluentes LDG e TG apresentaram uma maior concentração de CSS (64,2% e 52,9%). Já os diluentes LG e TGG apresentaram a concentração celular mais elevada de CSS na FTIV (67,5% e 52,2%), acarretando de forma direta em uma menor concentração de CSS na fração FTI+II+III (LG, 32,5%; TGG, 47,8%).

## **6.2.2 Proporção de tipos celulares após a segregação por Percoll<sup>®</sup>**

### 6.2.2.1 Ovinos

Esfregaços de amostras de cada fração foram analisadas quanto à presença de CSS, debris celulares e espermatozoides. Houve uma maior quantidade de debris celulares na FTII em amostras refrigeradas em relação ao sêmen fresco, e de células somáticas na FTIV em amostras congeladas, o que corrobora com os achados já descritos acima, com as amostras congeladas apresentando uma maior quantidade de células viáveis na FTIV e de células inviáveis totais em relação ao sêmen fresco e refrigerado.

Também houve uma maior quantidade de debris celulares e uma menor quantidade de células somáticas na FTII no t=24 h. A fração FTII dos diluentes LDG e CGG, nos tempos 0 h e 24 h, apresentaram uma maior proporção de células do que as demais frações e diluentes. As amostras com os diluentes BotuBOV<sup>®</sup> e TGG diferiram nos tempos 0 h e 24 h, conforme já descrito, apresentando uma maior proporção de células somáticas na fração FTIV. Por fim, foi observada uma correlação positiva na fração FTIII entre a presença de debris e células somáticas ( $r=0,538$ ,  $P<0,05$ ), ou seja, quanto maior ou menor a presença de debris, maior ou menor a presença de CSS e vice-versa. Também foi observada uma correlação negativa sobre a presença de debris entre as frações FTII e FTIII ( $r=-0,445$ ,  $P<0,05$ ), e na fração FTIV entre a presença de debris e espermatozoides ( $r=-0,532$ ,  $P<0,05$ ), o que pode ter uma conotação importante para a segregação espermática para a FIV.

### 6.2.2.2 Bovinos

Não houve diferença entre touros com relação à presença de debris celulares, espermatozoides e CSS, independente dos diluentes, tempos e

frações avaliadas. Porém, amostras de sêmen congelado apresentaram uma menor quantidade de espermatozoides e menor concentração de CSS na fração FTI em comparação ao sêmen fresco. Já na FTIII, houve o oposto, com as amostras de sêmen congelado apresentando uma maior concentração de CSS que no sêmen fresco, indicando uma possível alteração no padrão de migração celular durante a segregação, de acordo com o método de preservação do sêmen. De fato, o sêmen fresco, no t=-3 h, apresentou uma maior quantidade de CSS na fração FTI em relação aos tempos 0g e PC, relacionados ao sêmen congelado, contendo glicerol. Já na FTIII, o tempo PC apresentou uma maior presença de CSS do que o tempo 0g. Por fim, foi observado que no tempo PC houve uma maior presença de debris celulares na FTIV do que os tempos 0 e 0g, indicando novamente uma possível ação do processo de criopreservação na integridade das CSS e nos espermatozoides.

Quando comparados os diferentes diluentes e seus respectivos tempos de análises, observaram-se diferenças nas frações FTI, FTIII e FTIV entre os grupos. Na fração FTI, as amostras dos grupos Fresco e CG, nos tempos de 0 h e 24 h, apresentaram uma maior proporção de CSS do que os demais grupos. Na fração FTIII, os diluentes TG e LGG apresentaram uma maior porcentagem de CSS, com uma maior presença de debris celulares nos diluentes TG e TGG. Já na fração FTIV, uma maior porcentagem de debris celulares no diluente BotuBOV®.

### **6.2.3 Motilidade e vigor dos espermatozoides**

#### 6.2.3.1 Ovinos

Durante o experimento também foi analisada a motilidade espermática (M; 0-100%) e o vigor de motilidade espermática (V; 1-5), antes e depois das amostras passarem pela segregação com gradiente de Percoll® (Tabela 19). Foram observadas correlações fortes e positivas ( $r= 0,937$  para M;  $r= 0,649$  para V) entre os parâmetros de M e V pré- e pós-Percoll®. Também foi observada uma redução nos parâmetros de M e V na maior parte dos diluentes, na avaliação no t=24 h quando comparado ao t=0 h, com tal resultado biológico sendo esperado como consequência das condições de resfriamento e congelamento que as amostras foram expostas. Já com relação aos tipos de diluentes, foi observado que ocorreram diferenças na M e V pré- e

pós-Percoll<sup>®</sup>, indicando a influência dos diluentes nestes parâmetros. Houve uma redução de M e V nos dois períodos e nos dois tempos (0 h e 24 h) nos diluentes que apresentam glicerol comparado aos que não apresentavam glicerol (t=24 h sendo a avaliação pós-descongelamento nos grupos congelados). Tal efeito também era esperado, visto que as amostras foram expostas aos diluentes com e sem glicerol desde o início da curva de refrigeração (temperatura ambiente de 27°C), e que tal componente apresenta uma certa toxicidade celular quando exposto à temperatura ambiente, sendo por vezes recomendada a adição do glicerol ao diluente com sêmen ovino apenas quando a curva se estabiliza a 5°C (t=0 h), não havendo consenso entre autores. Não obstante, a exposição do sêmen ao glicerol ocorreu à temperatura de 27°C visto que o diluente comercial (BotuBOV<sup>®</sup>) já apresenta 7% de glicerol em sua composição. Desta forma, padronizou-se a exposição de todas as amostras aos diluentes com glicerol, sob a mesma temperatura.

**Tabela 19.** Motilidade (%) e vigor (1 a 5) dos espermatozoides ovinos pré- e pós-segregação com o gradiente de Percoll<sup>®</sup>, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média ± epm)

Diluentes	Pré-Percoll <sup>®</sup>				Pós-Percoll <sup>®</sup>			
	Motilidade (%)		Vigor (1-5)		Motilidade (%)		Vigor (1-5)	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
<b>Fresco, t=-3 h</b>	75,0 <sup>aA</sup>	----	4,0 <sup>aA</sup>	----	80,0 <sup>aA</sup>	----	3,0 <sup>aA</sup>	----
<b>TG</b>	70,0 <sup>aAB</sup>	50,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	80,0 <sup>aA</sup>	65,0 <sup>aB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>CG</b>	75,0 <sup>aAB</sup>	50,0 <sup>aA</sup>	4,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	75,0 <sup>aA</sup>	65,0 <sup>aB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>LD</b>	60,0 <sup>aB</sup>	50,0 <sup>aA</sup>	4,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>aAB</sup>	65,0 <sup>aB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>TGG</b>	35,0 <sup>bC</sup>	30,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>	45,0 <sup>bC</sup>	45,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>
<b>CGG</b>	40,0 <sup>bC</sup>	20,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>	60,0 <sup>bB</sup>	35,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>LDG</b>	40,0 <sup>bC</sup>	20,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>	55,0 <sup>bBC</sup>	45,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>
<b>BotuBOV<sup>®</sup></b>	60,0 <sup>abB</sup>	30,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>abAB</sup>	45,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha, entre os tempos t=0 h e t=24 h para M ou V, diferem estatisticamente (P<0,05).

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente (P<0,05).

### 6.2.3.2 Bovinos

Nos bovinos, também foram observadas correlações fortes e positivas ( $r=0,981$  para M;  $r= 0,939$  para V;  $P<0,05$ ) entre os parâmetros de M e V pré- e pós-Percoll® (Tabela 20). Assim como nos ovinos, também foi observada uma redução nos parâmetros de M e V na maior parte dos diluentes, na avaliação no t=24 h quando comparado ao t=0 h, sendo que nos diluentes TGG, CGG, LGG e BotuBOV®, houve uma redução na M em comparação aos grupos sem glicerol no t=0 h, com o sêmen não resistindo ao processo da criopreservação. Possivelmente, o fator animal e as características das amostras do sêmen coletado influenciaram na menor resistência à criopreservação. Porém, foi possível segregar CSS viáveis em altas proporções a partir destas amostras de sêmen bovino congelado, de todos os grupos.

**Tabela 20.** Motilidade (%) e vigor (1 a 5) dos espermatozoides bovinos pré- e pós-segregação com o gradiente de Percoll®, de acordo com o tipo de diluente e o tempo de análise (média  $\pm$  epm)

Diluentes	Pré-Percoll®				Pós-Percoll®			
	Motilidade (%)		Vigor (1-5)		Motilidade (%)		Vigor (1-5)	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
<b>Fresco, t=-3 h</b>	65,0 <sup>aA</sup>	----	3,0 <sup>a</sup>	----	75,0 <sup>aA</sup>	----	3,0 <sup>aA</sup>	----
<b>TG</b>	60,0 <sup>aA</sup>	50,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>CG</b>	60,0 <sup>aA</sup>	55,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>aA</sup>	70,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>
<b>LD</b>	65,0 <sup>aA</sup>	50,0 <sup>aA</sup>	4,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>	75,0 <sup>aA</sup>	60,0 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,0 <sup>aA</sup>
<b>TGG</b>	55,0 <sup>abA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	65,0 <sup>aAB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>
<b>CGG</b>	50,0 <sup>bB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	65,0 <sup>aAB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>
<b>LDG</b>	50,0 <sup>bB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	60,0 <sup>aB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>
<b>BotuBOV®</b>	50,0 <sup>bB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	65,0 <sup>aAB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	0,0 <sup>bB</sup>

<sup>a,b:</sup> Números seguidos de letras desiguais na linha, entre os tempos t=0 h e t=24 h para M ou V, diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

<sup>A,B:</sup> Números seguidos de letras desiguais na coluna diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

## 7. DISCUSSÃO

A utilização do gradiente de Percoll<sup>®</sup> para a segregação de células em suspensões, utilizando uma única centrifugação, já está descrita na literatura, apresentando bons resultados para segregação de células do sangue (SEGAL *et al.*, 1980), da medula óssea (OLOFSSON *et al.*, 1980), do timo (SALISBURY *et al.*, 1979) e do fígado (SMEDSROD e PERTOFT, 1985). Da mesma forma, Nel-Themaat *et al.* (2008), utilizando o mesmo princípio, obtiveram sucesso na segregação de células somáticas seminais e espermatozoides vivos e mortos de amostras de sêmen utilizando distintos gradientes de densidades de Percoll<sup>®</sup>. Entretanto, é algo mais desafiador, visto as células diferirem em número, tamanho (SCHUMACHER *et al.*, 1978) e morfologia (YAO *et al.*, 1996). O protocolo desenvolvido pelos autores possibilitou a utilização de CSS com sucesso para a clonagem por TNCS, além de permitir o uso dos espermatozoides viáveis segregados para a produção *in vitro* de embriões pela FIV. Tal segregação, além de resultar em um melhor aproveitamento do material biológico, possibilita o posterior cultivo *in vitro* e criopreservação de CSS isoladas, visto que quando os espermatozoides viáveis permanecem presentes (em alta concentração) durante o cultivo celular, a característica de motilidade cria fluxos de correntes no meio de cultivo, afetando diretamente a fixação e aderência das células no sistema de cultivo (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007). Além disso, as fontes de energia presentes no meio, podem sofrer depleção pelo metabolismo espermático, com acúmulo de metabólitos que acarretam alterações de pH e das condições do meio, dificultando a proliferação de células somáticas (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007).

Ao empregarmos a metodologia descrita por Nel-Themaat *et al.* (2008) para a segregação de CSS de ovinos e bovinos em experimentos pilotos (dados não apresentados), observamos que o gradiente apresentava diferentes camadas ou halos após a centrifugação, visualmente distintas. Por curiosidade, ao analisarmos tais camadas, percebemos que, diferentemente do que foi descrito por Nel-Themaat *et al.* (2008), as células somáticas viáveis não se restringiam apenas à camada de 20% de Percoll<sup>®</sup>, estando, também, presentes de forma significativa e variável também nas camadas de 50% e 90% de Percoll<sup>®</sup>, o que pareceu estar associado ao tipo e à composição do diluente de sêmen. Tais observações foram a base para as hipóteses deste estudo, que

aos serem testadas, demonstraram que o perfil de migração das CCS é de fato alterado de acordo com a origem e o tipo de amostra de sêmen utilizada e, principalmente, de acordo com o diluente e o método de preservação do sêmen. Porém, apesar de termos evidenciado diferenças de comportamento entre as espécies bovina e ovina, não ocorreram diferenças no padrão de migração celular entre amostras provenientes de animais da mesma espécie, visto que o perfil de migração celular foi semelhante, entre os três carneiros e entre os quatro touros utilizados neste estudo. Mesmo que algumas amostras apresentassem maiores concentrações de CSS do que outras, como nos bovinos, as CSS foram segregadas de forma semelhante no gradiente de Percoll<sup>®</sup> entre os animais.

O fato de não haver diferenças entre as concentrações de células viáveis na espécie ovina, mas sim na espécie bovina, pode estar associado ao método de coleta de sêmen utilizado neste estudo, diferente para cada espécie. Nos ovinos foi utilizado o método da vagina artificial, método reconhecido por resultar em sêmen com características fisiológicas para a espécie em coleta (COLLINS; BRATTON; HENDERSON, 1951; MOORE & HASLER, 2017; NADAF *et al.*, 2020). Por outro lado, o sêmen dos bovinos foi coletado pelo método da eletroejaculação, reconhecido por resultar em ejaculados com variações não fisiológicas, especialmente do volume e concentração espermática (DZIUK; GRAHAM; PETERSEN, 1954; MOORE & HASLER, 2017; NADAF *et al.*, 2020). Tais características seminais podem ser visualizadas nas Tabelas 1 e 2, com o sêmen dos três carneiros estando dentro dos padrões fisiológicos de fertilidade para a espécie, em termos de características macro- e microscópicas (MIES FILHO, 1987, CBRA, 2013). Já na espécie bovina, os Touros 2, 3 e 4 apresentaram concentrações espermáticas (176, 135 e 430 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) abaixo dos padrões fisiológicos para a espécie (>600 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL de acordo com MIES FILHO (1987) e o CBRA (2013). Somente o Touro 1 estando com valores acima do padrão mínimo (665 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL). Desta forma, o Touro 1 apresentou uma maior concentração espermática que os demais touros, e também uma menor concentração de CSS. O mesmo ocorreu com os carneiros, pois o sêmen do Carneiro 3 possuía a maior concentração espermática (2.400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) que os demais carneiros, e

uma tendência de menor concentração de CSS. Tal característica é corroborada pelo aspecto dos ejaculados de cada touro (Tabela 1), que denotam uma desproporção entre a emissão de espermatozoides e a secreção do plasma seminal durante o estímulo elétrico na coleta. Outro fator que pode ter influenciado, foi a diluição utilizada durante o processamento do sêmen, visto que nos bovinos e ovinos, para atingir uma concentração de 30 e 70 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/dose, respectivamente, diferentes proporções de sêmen e de diluente foram utilizadas. Um volume maior de diluente foi utilizado na diluição no Touro 1 e do Carneiro 3, o que pode ter alterado o perfil de segregação de CSS entre os animais e entre os diluentes.

Neste estudo, foram desprezadas as secreções seminais, compostas visualmente de plasma seminal, antes da coleta do sêmen *per se*. Porém, a coleta pode conter frações mais ricas ou pobres em espermatozoides durante a coleta por eletroejaculação (DZIUK; GRAHAM; PETERSEN, 1954; MOORE & HASLER, 2017; NADAF *et al.*, 2020; Tabela 2). Desta forma a composição do ejaculado pode ter sido um fator determinante das diferenças observadas entre as concentrações de CSS, nos touros, neste estudo, e em relação ao sêmen ovino. Estes aspectos ainda necessitam ser melhor investigados.

Outros fatores que podem estar relacionados aos resultados deste estudo são a idade e a maturidade sexual dos machos, e o condicionamento dos animais ao método de coleta, visto que tais fatores influenciam na qualidade espermática (ALMQUIST & AMANN, 1961, 1976; SCHENK, 2018). Nos ovinos, foram utilizados animais adultos, maduros sexualmente, no início da estação reprodutiva, e de idades semelhantes, já condicionados à coleta frequente de sêmen por VA. Já nos bovinos, foram utilizados dois touros Brangus virgens de 18 meses de idade (Touros 1 e 2), e dois touros Brangus maduros de 30 e 40 meses de idade (Touros 3 e 4), ambos com experiência em coberturas em nível de campo. Curiosamente, o touro que apresentou uma menor concentração total de células foi o Touro 1, o mais jovem e de maior concentração espermática no ejaculado, conforme acima, em contraste aos touros maduros (Touros 3 e 4), que resultaram em maiores concentrações de células somáticas seminais nos ejaculados. Esta possível relação da idade com a concentração celular no ejaculado também levantou uma nova hipótese de

que a ocorrência de CSS pode estar relacionada com a origem tecidual destas células. Em ovinos, sabe-se que a maior parte das CSS isoladas são de origem epitelial (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008; SAINI *et al.*, 2019). Porém, ainda não há relatos definitivos da origem destas células em bovinos, mas observa-se um fenótipo que caracteriza em geral uma origem epitelial (LIU *et al.*, 2010; SELOKAR *et al.*, 2014, 2015).

As principais diferenças de composição entre os diluentes avaliados se restringiram aos protetores de membrana (gema de ovo ou leite desnatado), e à presença ou não do crioprotetor glicerol. Em estudos preliminares, observamos uma possível alteração na migração celular em distintos diluentes, e em diluentes com a mesma base, porém com a adição ou não de glicerol. Nossas hipóteses foram confirmadas neste estudo, visto que em grande parte das análises, ocorreram diferenças no perfil de migração de CSS entre diluentes com a mesma fórmula base. Por exemplo, houve um maior número e proporção de CSS ovinas na fração FTI no diluente Leite Desnatado (LD). Com a adição de glicerol, o diluente Leite Desnatado Glicerolado (LDG) passou a segregar uma maior concentração e proporção de CSS na fração FTII. Tal evento pode ser explicado pelo mecanismo de ação do glicerol, uma vez que esse atua penetrando nas células por difusão simples, desidratando-as e protegendo-as dos danos durante o processo de criopreservação, mantendo o equilíbrio osmótico com a solução extracelular (MAZUR, 1976). Desta forma, ocorre a desidratação das células, reduzindo os danos dos solutos concentrados (McGANN, 1978), interferindo no volume celular (MAZUR, 1997). Tal característica pode estar diretamente relacionada à migração celular por gradientes de densidades diferentes (SCHUMACHER *et al.*, 1978). Desta forma a presença do glicerol no diluente de sêmen, por possivelmente alterar o volume das CSS, pode ter alterado o perfil de migração das células no gradiente de Percoll<sup>®</sup>.

O efeito do glicerol pôde ser evidenciado também nos diluentes à base de Tris-gema (TG, TGG), citrato-gema (CG, CGG), lactose-gema ou leite desnatado-gema (LD e LDG), em bovinos (lactose-gema) e ovinos (leite desnatado-gema). Na segregação celular com os diluentes à base de Tris-gema e leite desnatado em ovinos, a presença de glicerol influenciou de forma a aumentar a concentração de células para as frações mais baixas do

gradiente em comparação aos diluentes TG (sem glicerol), o que corrobora com a hipótese de que o glicerol diminui o volume celular, permitindo que essas migrem de forma mais fácil até as diferentes camadas de gradiente de Percoll<sup>®</sup>. Porém, o oposto ocorreu com os diluentes CG e CGG em ovinos, e LD e LDG em bovinos, com o diluente CGG apresentando uma maior concentração de CSS ovinas viáveis na fração FTII, e o CG na fração inferior, FTII, enquanto em bovinos, o LD permitiu uma maior migração de CSS para a fração FTIV, e o LDG para a fração FTIII. Tal ação também pode estar relacionada com desidratação e interferência no volume celular, causada pelo glicerol (McGANN, 1978; MAZUR, 1997), além de, possivelmente, ocorrer uma interação com os outros componentes do diluente, em especial os constituintes biológicos da gema de ovo e do leite, interferindo nas diferentes densidades do diluente e do Percoll<sup>®</sup>, facilitando ou dificultando a migração da estrutura celular durante o processo de segregação. Torna-se evidente então que o glicerol pode também alterar características físico-químicas da solução e do diluente de forma a modificar o padrão de migração celular, mas tais aspectos ainda devem ser avaliados em estudos futuros.

Ao contrário dos ovinos, o diluente CG nos bovinos apresentou uma maior proporção de células na FTI, divergindo do CGG que distribuiu as CSS nas frações inferiores (FTIII e FTIV). Já o diluente TG apresentou mais CSS bovinas na FTIII, com o TGG concentrando células na fração inferior (FTIV). Já com relação ao diluente BotuBOV<sup>®</sup>, não foi possível observar a comparação do mesmo diluente sem o glicerol, visto este ser um diluente comercial que já apresenta 7% de glicerol em sua composição (Botupharma, SP, Brasil). Porém, em ambas as espécies, o diluente BotuBOV<sup>®</sup> apresentou um perfil de migração com maior concentração de CSS também nas frações inferiores (FTIII e FTIV), o que corrobora com a potencial ação do glicerol em aumentar a migração celular, concentrando as CSS nas frações mais baixas, incluindo na fração FIV, que é a fração rica em espermatozoides destinada à FIV. Esta maior migração das CSS para a fração FTIV é indesejável, pois dificulta a segregação das CSS (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008). O diluente comercial apresentou resultados semelhantes aos observados com os diluentes contendo gema de ovo. Apesar da não disponibilidade da composição do meio comercial, sabe-se que há a presença de 20% de gema de ovo e 7% de glicerol (Botupharma, SP,

Brasil). Tais achados deste estudo, até o momento, ainda não foram descritos na literatura, tampouco relatados por Nel-Themaat *et al.* (2008).

Observamos que há uma aparente interação da espécie ou do método de coleta do sêmen com relação aos diluentes utilizados, havendo distintos padrões de migração celular entre ovinos e bovinos, mesmo em condições semelhantes. Além dos fatores já discutidos acima, tal diferença também pode estar relacionada ao tipo e à origem das CSS presentes nos ejaculados, uma vez as características morfológicas estão potencialmente relacionadas à migração das células em um gradiente de segregação celular. Como já relatado na literatura, existem populações de CSS em ejaculados de espécies diferentes, porém o tecido de origem ainda é pouco conhecido. Em humanos, por exemplo, foram encontradas células epiteliais e várias subpopulações de leucócitos, incluindo granulócitos, monócitos/macrófagos, linfócitos B, linfócitos T auxiliares e supressores/citotóxicos (PHILLIPS *et al.*, 1978; WOLFF e ANDERSON, 1988; HOMYK *et al.*, 1990). Já em ovinos, as células foram identificadas como epiteliais ou semelhantes a epiteliais pela presença de citoqueratina, porém não há relatos concretos sobre tecidos de origem das CSS (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008). Em bovinos, o órgão de origem das populações celulares ainda se encontram sob investigação, mas há indícios de serem de origem epitélio-uretral (dados não publicados).

Neste estudo, observamos em ovinos que os diluentes com gema de ovo apresentaram distribuições celulares em todas as camadas e de modo mais desuniforme, em contrastes com os diluentes a base de leite desnatado, que concentraram uma maior proporção de células nas duas primeiras frações do gradiente (LG na FTI e LGG na FTII). Tais efeitos podem estar relacionados à interação destes componentes com as estruturas celulares, alterando as densidades das suspensões celulares. Visto que a LDL da gema de ovo atua carreando lipídios e, com o rompimento destas micelas, ocorre a estabilização da membrana celular com a introdução de lipídios em sua estrutura (MOUSSA *et al.*, 2002). Tal ação pode vir a alterar a densidades da suspensão e das próprias células, levando a uma alteração no padrão de migração das CSS para frações mais inferiores. Além disso, outro ponto importante que deve ser levado em consideração ao utilizar diluentes com gema de ovo é a

necessidade de confirmar a origem das células isoladas, pois a gema de ovo pode potencialmente ser uma fonte de células somáticas, gerando uma contaminação indesejada. Tal fenômeno não deve estar presente pelo uso de diluente à base leite desnatado, visto preparamos o diluente a partir de leite em pó reconstituído. Em bovinos, o diluente a base de lactose-gema apresentou o mesmo perfil dos diluentes com gema de ovo, nada estando relacionado ao diluente com leite desnatado, exceto pela presença de lactose, que tem um efeito osmótico no diluente. Também não existem relatos na literatura sobre tais comparações.

Com base nos resultados deste estudo, e para as amostras de sêmen ovino diluídas em leite desnatado (LD e LDG), recomenda-se a utilização das duas primeiras frações de 150  $\mu$ L isoladas após a segregação, visto que as maiores proporções de CSS foram identificadas nestas frações, as quais apresentaram poucos espermatozoides, em grande parte imóveis, o que facilita o isolamento e o destino ao cultivo celular (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007). No entanto, os demais diluentes, em bovinos e ovinos, não houve padrões específicos de migração, recomendando-se a utilização do conteúdo presente nas três primeiras frações (FTI, FTII e FTIII). Tais resultados divergem com os achados de Nel-Themaat *et al.* (2008), onde foi descrito que apenas a fração de 20% de Percoll<sup>®</sup> apresentaria células viáveis para uso na clonagem por TNCS.

Apesar das dificuldades relacionadas ao isolamento e cultivo das CSS, o protocolo de segregação empregado neste estudo é promissor, por apresentar vantagens de não ser uma metodologia invasiva para fonte de células somáticas, resultando em uma quantidade suficiente de células cultiváveis (NEL-THEMAAT *et al.*, 2007, 2008; LIU *et al.*, 2010; SELOKAR *et al.*, 2014). Esta metodologia pode ser utilizada de forma mais eficiente para o isolamento e cultivo de CSS para a clonagem por TNCS e de espermatozoides para a FIV a partir de doses de sêmen congelado (SELOKAR *et al.*, 2014), de acordo com a espécie e método de coleta de sêmen, com o método de conservação do sêmen, e com o diluente utilizado para o processamento do sêmen, e por fim, com a estabilidade de metodologias de coleta de sêmen, bem como com a prática de rotina nas centrais de produção de sêmen.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados observados neste estudo nos permitem concluir que:

- (a) O comportamento e distribuição das células somáticas seminais (CSS), pelo parâmetro de proporção, manteve-se homogêneo entre os carneiros e touros, apesar de haver, em alguns casos, diferenças entre as concentrações média de células por animal dentro das frações do gradiente de Percoll<sup>®</sup>, em especial para os touros.
- (b) A segregação de células somáticas do sêmen de bovinos e ovinos utilizando o gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi influenciada pela composição do diluente e pela presença de glicerol nas suspensões celulares, havendo diferenças no padrão de migração de acordo com a composição base dos diluentes (Tris, citrato, lactose), do componente biológico (gema de ovo, leite desnatado) e da presença ou não de glicerol.

## 9. PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, como perspectivas futuras pretendemos realizar experimentos que possibilitem aperfeiçoar o protocolo de segregação de células somáticas de sêmen pelo gradiente de Percoll<sup>®</sup>, bem como investigar se há uma influência da idade do animal com a quantidade de CSS presente no sêmen. Para isso, deveremos repetir o experimento com ovinos e bovinos jovens, de idades semelhantes, comparando com ovinos e bovinos adultos, de idades semelhantes, avaliando também múltiplos ejaculados de cada animal. Também se faz necessário investigar e caracterizar as CSS isoladas do sêmen de bovinos, bem como buscar identificar o órgão de origem das células, em bovinos e ovinos, uma vez que tal informação deverá auxiliar no sucesso do estabelecimento do cultivo celular e da clonagem por TNCS. É premente também que se compare o método de coleta de sêmen, por VA ou eletroejaculação, com respeito à presença de CSS no ejaculado e o perfil de migração frente ao processo de segregação celular.

Também deveremos buscar estabelecer estratégias que venham solucionar o problema observado quanto à segregação de CSS em amostras que contenham glicerol, visto que grande parte das CSS das amostras com a presença de glicerol migraram para a fração FTIV junto aos espermatozoides, impossibilitando a separação de espermatozoides para FIV. Além disso, se cultivadas com os espermatozoides, as CSS deverão apresentar dificuldades de aderência e potenciais alterações no meio de cultivo. Os protocolos devem ser ajustados para um maior rendimento de obtenção de CSS em maior quantidade, e com o mínimo de contaminação com espermatozoides e debris.

Ademais, devemos buscar elucidar o mecanismo de atuação do glicerol sobre a segregação de CSS e a relação com os demais componentes do diluente, visto que, dependendo do diluente, o comportamento do glicerol é alterado. Isto é relevante, uma vez que grande parte das amostras de sêmen é mantida criopreservada, em presença de glicerol. Por fim, é necessário elucidar como e quais componentes do diluente além do glicerol influenciam na migração celular e como ocorre tal influência, visando melhorar o protocolo de segregação celular de CSS para a clonagem por TNCS.

## 10. REFERÊNCIAS

- ALMQUIST, J. O.; AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. XI. Puberal characteristics and postpuberal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 986-991, 1976.
- ALMQUIST, J. O.; AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. II. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves as determined by direct counts and depletion trials; dimensions and weight of genitalia. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1668-1678, 1961.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT, L. et al. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 535-543, 2005.
- AMIRAT-BRIAND, L. et al. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 282-287, 2010.
- ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.
- ARMITAGE, W. J. Cryopreservation of animal cells. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, p.379-393, 1987.
- BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BERGERON, A. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.
- BERTOLINI, L. R. et al. Animal cloning: survival of the fittest. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 82-105, 2012.
- BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 181-187, 2002.
- BREM, G.; KÜHHOLZER, B. The recent history of somatic cloning in mammals. **Cloning & Stem Cells**, v. 4, n. 1, p. 57-63, 2002.
- BRIGGS, R.; KING, T. J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 38, n. 5, p. 455-463, 1952.

- BUSTANI, G. S.; BAIEE, F. H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World**, v. 14, n. 5, p. 1220, 2021.
- COLLINS, W. J.; BRATTON, R. W.; HENDERSON, C. R. The relationship of semen production to sexual excitement of dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 34, n. 3, p. 224-227, 1951.
- CORNELISSEN, M. A. M. C. et al. Estimating variance components and breeding values for number of oocytes and number of embryos in dairy cattle using a single-step genomic evaluation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4698-4705, 2017.
- DEAN, W. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, n. 24, p. 13734-13738, 2001.
- DZIUK, P. J.; GRAHAM, E. F.; PETERSEN, W. E. The technique of electroejaculation and its use in dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 9, p. 1035-1041, 1954.
- EDWARDS, J. L. et al. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 2, p. 113-123, 2003.
- EVANS G., MAXWELL W.M.C. Frozen storage of semen. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**, p. 122-141, 1987.
- EVERTS, R. E. et al. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. **Physiological Genomics**, v. 33, n. 1, p. 65-77, 2008.
- FOROUZANFAR, M. et al. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-487, 2010.
- FULKA, J. et al. Do cloned mammals skip a reprogramming step?. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 25-26, 2004.
- GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.
- GEORGES, M.; CHARLIER, C.; HAYES, B. Present and future impact of genomic information on Livestock production. **Nature Reviews. Genetics**, 2018.
- GIBBONS, A. Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora. **Revista Taurus CT**, v. 413, 2002.
- GORUS, F. K.; PIPELEERS, D. G. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. **Fertility and Sterility**, v. 35, n. 6, p. 662-665, 1981.
- GURDON, J. B. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. **Development**, v. 10, n. 4, p. 622-640, 1962.

- GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1811-1815, 2008.
- GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1811-1816, 2002.
- GUTIERREZ, C. et al. Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of Percoll. **Journal of Immunological Methods**, v. 29, n. 1, p. 57-63, 1979.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.
- HASLER, J. F. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 119-125, 2009.
- HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 45, n. 3, p. 353-361, 2005.
- HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.
- HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 4-13, 2018.
- HIRSCH, J. Behavior Genetics and Individuality Understood: Behaviorism's counterfactual dogma blinded the behavioral sciences to the significance of meiosis. **Science**, v. 142, n. 3598, p. 1436-1442, 1963.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOMYK, M. et al. Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. **Fertility and Sterility**, v. 53, n. 2, p. 323-330, 1990.
- HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable—including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36-51, 2011.
- IVANOFF, E. I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. **The Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 3, p. 244-256, 1922.
- KATO, Y. et al. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 2, p. 231-238, 2000.
- KHAN, I. M. et al. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance omics to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 139, 2021.
- KIM, M. K. et al. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 130-137, 2007.

- KLINGER, B.; SCHNIEKE, A. 25th ANNIVERSARY OF CLONING BY SOMATIC-CELL NUCLEAR TRANSFER Twenty-five years after Dolly: how far have we come? **Reproduction**, v. 162, n. 1, p. F1-F10, 2021.
- KOPEIKA, J.; THORNHILL, A.; KHALAF, Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 2, p. 209-227, 2015.
- KOVACS, A.; FOOTE, R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit sperm. **Biotechnic. Histochemistry**, v. 67, p. 119-124, 1992
- KUNDU, C. N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 117-125, 2000.
- LAYEK, S. S. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1-9, 2016.
- LEE, R. SF et al. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 1-11, 2004.
- LIU, J. et al. Embryo production and possible species preservation by nuclear transfer of somatic cells isolated from bovine semen. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1629-1635, 2010.
- LIU, Z. *et al.* Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 881-887. e7, 2018.
- LOI, P. et al. A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 791-797, 2016.
- LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 4, p. 618, 1954.
- LU, F; ZHANG, Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. **National Science Review**, v. 2, n. 2, p. 217-225, 2015.
- MANDAWALA, A. A. et al. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637-1644, 2016.
- MATOBA, S.; ZHANG, Y. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 4, p. 471-485, 2018.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.
- MCGANN, L. E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, n. 4, p. 382-390, 1978.
- MCGRATH, J.; SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science**, v. 220, n. 4603, p. 1300-1302, 1983.

- MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.
- MERYMAN, H. T; WILLIAMS, R. J; DOUGLAS, M. St J. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 287-302, 1977.
- MIES FILHO, Antonio. **Reprodução dos animais**. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MIGLINO, M. A. et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.
- MIR, B. et al. Progeny of somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned pigs. **Cloning and Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 119-125, 2005.
- MOHRI, H.; MASAKI, J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. **Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 179-194, 1967.
- MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.
- MOORE, SG; HASLER, JF Uma revisão de 100 anos: tecnologias reprodutivas na ciência de laticínios. **Journal of Laticínios**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.
- MOURA, M. T. et al. Bovine somatic cell nuclear transfer using mitomycin C-mediated chemical oocyte enucleation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 137-142, 2019.
- MOURA, M. T. Pluripotency and cellular reprogramming. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 8, p. 138-168, 2011.
- MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.
- NADAF, S.M. et al. Comparative ejaculatory response, fresh and frozen semen quality and fertility to artificial vagina vs electroejaculation method of semen collection in mithun (*Bos frontalis*) bulls. **Andrologia**, v. 54, n. 2, p. e14330, 2022.
- NAGASE, H. et al. Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. II. Protective action of sugars. In: **Proceedings of 5th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. 1964. p. 1111-1113.
- NEL-THEMAAT, L. et al. Cloned embryos from semen. Part 1: *in vitro* proliferation of epithelial cells on embryonic fibroblasts after isolation from semen by gradient centrifugation. **Cloning and Stem Cells**, v. 10, n. 1, p. 143-160, 2008.
- NEL-THEMAAT, L. et al. Isolation, culture and characterisation of somatic cells derived from semen and milk of endangered sheep and eland antelope. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 4, p. 576-584, 2007.
- NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T; SUASSUNA, U. Produção e reprodução de caprinos e ovinos. **Fortaleza: Editora gráfica**, 1997.

- OBACK, B.; WELLS, D. N. Cloning Cattle. **Somatic Cell Nuclear Transfer**. Springer, New York, NY, 2007. p. 30-57.
- OGURA, A.; INOUE, K; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1609, p. 20110329, 2013.
- OLOFSSON, T.; GÄRTNER, I.; OLSSON, I. Separation of human bone marrow cells in density gradients of polyvinylpyrrolidone coated silica gel (Percoll). **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 24, n. 3, p. 254-262, 1980.
- PANNO, J. **Animal cloning: the science of nuclear transfer**. Infobase Publishing, 2014.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 39-57, 2007.
- PEREA, F. et al. A field study to compare post-thaw sperm progressive motility and pregnancy rate using Brahman bull semen frozen in milk based extender containing egg yolk or soybean lipids extract. **Clinical Theriogenology**, v. 9, n. 1, p. 37-46, 2017.
- PERLEBERG, C.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. Genetically engineered pigs as models for human disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 1, p. dmm030783, 2018.
- PERRY E. J. The artificial insemination of farm animals. **The Artificial Insemination of Farm Animals**. 1946.
- PHILLIPS, S. G. et al. Human semen as a source of epithelial cells for culture. **In Vitro**, v. 14, n. 8, p. 639-650, 1978.
- PIERCE, B. A. **Genetics: a conceptual approach**. Macmillan, 2012.
- POLEJAEVA, I. A. *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 86-90, 2000.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666-666, 1949.
- PRATHER, R. S. *et al.* Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV. **Veterinary microbiology**, v. 209, p. 124-129, 2017.
- RAHEJA, N. et al. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. **Journal of Entomology Zoology Stud**, v. 6, n. 3, p. 239-245, 2018.
- RAHMAN, M. S. et al. Effect of skim milk and tris-citrate extenders to preserve the semen of indigenous ram of Bangladesh. **Asian Journal of Biology**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2018.
- RENARD, J. et al. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **The Lancet**, v. 353, n. 9163, p. 1489-1491, 1999.

- ROTA, A. et al. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 57, p. 377-381, 2001.
- RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 1-28, 2004.
- SAINI, M. *et al.* Isolation and culture of epithelial cells from stored buffalo semen and their use for the production of cloned embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 10, p. 1581-1588, 2019.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.
- SALISBURY, Janet G.; GRAHAM, John M.; PASTERNAK, Charles A. A rapid method for the separation of large and small thymocytes from rats and mice. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 1, n. 6, p. 341-347, 1979.
- SANTOS, A. D. F. et al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1934-1942, 2006.
- SANTOS, R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation**. 2007. Tese de Doutorado. Utrecht University.
- SCHENK, J. L. Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s142-s147, 2018.
- SEGAL, A. W.; FORTUNATO, A.; HERD, T. A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of percoll. **Journal of Immunological Methods**, v. 32, n. 3, p. 209-214, 1980.
- SELOKAR, N. L. *et al.* Hope for restoration of dead valuable bulls through cloning using donor somatic cells isolated from cryopreserved semen. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e90755, 2014.
- SELOKAR, Naresh L. et al. Buffalo (*Bubalus bubalis*) SCNT embryos produced from somatic cells isolated from frozen-thawed semen: effect of trichostatin A on the in vitro and in vivo developmental potential, quality and epigenetic status. **Zygote**, v. 24, n. 4, p. 549-553, 2016.
- SILVA, A. R. et al. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 3, p. 244-246, 2002.
- SILVA, L. D. M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 107-111, 2001.
- SMEDSRØD, B; PERTOFT, H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 38, n. 2, p. 213-230, 1985.
- SUN, L et al. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. **Cryobiology**, v. 92, p. 146-150, 2020.

- TAGARELLI, A. et al. Hans Spemann. One hundred years before the birth of experimental embryology. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, n. 1, p. 28-32, 2004.
- TAMASHIRO, K. LK et al. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 262-267, 2002.
- TRALDI, A. de S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. **III Feinco**, 2006.
- TUKARAM, B. N.; RAJAGOPALAN, I. V.; SHARTCHANDRA, P. S. I. The effects of lactose, microcrystalline cellulose and dicalcium phosphate on swelling and erosion of compressed HPMC matrix tablets: texture analyzer. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 9, n. 4, p. 349, 2010.
- VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 720-733, 2005.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 571-584, 2003.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.
- WAKAYAMA, S. et al. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 293-297, 2013.
- WANG, Y.; DONG, S. Glutathione in combination with trehalose has supplementary beneficial effects on cryopreserved red deer (*cervus elaphus*) sperm. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 1, p. e12610, 2017.
- WELLS, D. N. et al. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning & Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 101-110, 2004.
- WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 4, p. 996-1005, 1999.
- WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.
- WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135-138, 1997.
- WOLFF, H.; ANDERSON, D. J. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 3, p. 497-504, 1988.
- YIN, X. J. et al. Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 3, p. 425-431, 2008.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Anexo I – Diluentes para refrigeração e congelamento de sêmen

#### a) TRIS-gema (SALAMON & MAXWELL, 2000)

- *Solução-mãe de diluente TRIS*

- TRIS (Tris-hidroxi-amino-etano): 3,63 g
  - Ácido Cítrico: 1,99 g
  - Frutose: 0,50 g
  - Água Milli-Q, q.s.p. 100 mL
- pH: 6,5 - 7,5  
Osmolaridade: 300 mOsm/kg

- *Diluyente TRIS-gema para refrigeração (TG)*

- Solução-mãe: 80%
- Gema de ovo: 20%

- *Diluyente TRIS-gema para congelamento (TGG)*

- Solução TRIS-gema: 93%
- Glicerol: 7%

#### b) Citrato-gema (EVANS & MAXWELL, 1987)

- Solução-mãe de citrato de sódio a 2,94%

- Citrato de Sódio (2 H<sub>2</sub>O): 2,94 g
  - Água Milli-Q, q.s.p. 100,0 mL
- pH: 6,5 - 7,5  
Osmolaridade: 300 mOsm/kg

- Diluyente Citrato-gema para refrigeração (CG)

- Solução-mãe: 80%
- Gema de ovo: 20%

- Diluyente Citrato-gema para congelamento (CGG)

- Solução Citrato-gema: 93%
- Glicerol: 7%

c) Leite Desnatado a 10%

- Leite em Pó Desnatado (CCGL<sup>®</sup>): 10 g
- Água Milli-Q, q.s.p. 100 mL
- Aquecer a solução a 95°C por 15 min

pH: 6,5 - 7,5

Osmolaridade: 300 mOsm/kg

d) Lactose-gema-glicerol (NAGASE & NIWA, 1964)

- Solução de lactose a 11%
  - Lactose: 11 g
  - Água Milli-Q, q.s.p. 100 mL
- Diluente Lactose-gema para refrigeração (CG)
  - Solução-mãe: 80%
  - Gema de ovo: 20%
- Diluente Lactose-gema para congelamento (CGG)
  - Solução Lactose-gema: 93%
  - Glicerol: 7%

pH: 6,5 - 7,5

Osmolaridade: 300 mOsm/kg

## 11.2 Anexo II – Fichas de controle de dados

Animal: \_\_\_\_\_ Hora de coleta: \_\_\_\_\_

N de ejaculados: \_\_\_\_\_ Volume de ejaculado: \_\_\_\_\_

Turbilhonamento: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Aspecto: \_\_\_\_\_

Movimento de massa: \_\_\_\_\_ Motilidade e vigor: \_\_\_\_\_

Concentração espermática/mL: \_\_\_\_\_

### Processamento:

	Hora inicial	Motilidade /vigor	Hora a 5°C	Motilidade / vigor (5°C)
TG				
CG				
LD/LG				
TGG				
CGG				
LDG/LGG				
Botubov				

### Análises

Diluente: \_\_\_\_\_ Hora de análise: \_\_\_\_\_

### Motilidade e vigor *pellet* (FTIV):

	SPTZ vivos	SPTZ mortos	N células vivas	N células mortas	Obs:
FTI					
FTII					
FTIII					
FTIV					

	Detritos Celulares	SPTZ	Células somáticas	Obs:
FTI				
FTII				
FTIII				
FTIV				

### 11.3 Anexo III – Protocolos de coloração

#### a) Coloração de Azul de Tripano (KOVACS e FOOTE, 1992)

1. Misturar 10  $\mu\text{L}$  de sêmen com 10  $\mu\text{L}$  do corante azul de tripan a 0,4% (1:1 v/v; Sigma, T-8154) em tubo de 1,5 mL e incubar por 15 min a 37°C (espermatozoides devem estar vivos);
2. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  na câmara de Neubauer e realizar a contagem de células marcadas em pelo corante com inviáveis.

#### b) Coloração de Panótipo rápido (HOROBIN, 2011)

1. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  da amostra em lâminas e fazer três esfregaços;
2. Secar os esfregaços rapidamente em fluxo de ar ou secador;
3. Fixar os esfregaços em álcool absoluto por 2 min;
4. Submergir as lâminas em eosina por 2 min;
5. Submergir as lâminas em hematoxilina por 1 min;
6. Lavar as lâminas água corrente;
7. Secar em fluxo de ar ou secador.