

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

Gilson Antonio Pessoa

SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA PRÉ REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO

PORTO ALEGRE, RS

2016

Gilson Antonio Pessoa

**SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA PRÉ REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Animal.

Linha de pesquisa: Fisiopatologia e Biotécnicas da reprodução

Orientadora prof. Dr^a. Mara Iolanda Batistella Rubin.

Porto Alegre, RS

2016.

CIP - Catalogação na Publicação

PESSOA, GILSON ANTONIO
SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA PRÉ REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO / GILSON ANTONIO PESSOA. -- 2016.
100 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Sêmen equino. 2. separação espermática. 3. resfriamento. 4. Atividade mitocondrial. 5. lâ de vidro. I. Rubin, Mara Iolanda Batistella, orient. II. Título.

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

Gilson Antonio Pessoa

**SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA PRÉ REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de reprodução animal.

Aprovado em 30 de maio de 2016

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dr^a. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Adriana Pires Neves, Dr^a. (UNIPAMPA)

Dra. Karin Erica Brass, Dr^a. (UFSM)

Fabício Desconzi Mozzaquatro, Dr. (UNIPAMPA)

Porto Alegre, RS

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Maria de Lourdes, pela vida, educação, dedicação, carinho, amor e incentivo ao longo desta caminhada.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos e aos professores pelo acolhimento e ensinamentos.

À CAPES-FAPERGS pela bolsa de estudo

Ao Dr. Carlos Antonio Mondino Silva pelos ensinamentos ao longo da vida acadêmica-profissional e por ter sido entusiasta na execução deste projeto de doutorado.

À Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin, todas as palavras seriam poucas para descrever a compreensão e disponibilidade de supervisão e orientação durante a graduação, pós-graduação e vida profissional, sempre com extrema dedicação aos valiosos ensinamentos e lições transmitidas.

À equipe do Laboratório de Bioquímica da UFSM por compartilhar o uso dos equipamentos.

Ao Dr. Manoel Francisco de Sá Filho, Alta Genetics, pela orientações e auxílio na análise estatística.

À equipe de colegas de pós-graduação do Embryolab pelo auxílio, companheirismo e amizade, que mesmo nas horas de exaustivo trabalho colaboraram na execução das atividades. Muito obrigado ao Murilo Farias Rodrigues, Ricardo Olimpio Schenatto, Janislene Mach Trentin, Mariani Farias Fiorenza, Júlia Brum S. Casarin.

Aos estagiários do Embryolab que já fizeram parte da equipe nos últimos 4 anos e aos que atualmente atuam: Thainá, Guilherme, Luiz, Moisés, Taison, Verônica, Aline, Érika, Simone, Marina, Nátalli, Trajano, Nayrema, Mariê.

Aos ex-estagiários Karen Roehle, Manuelle Jardim, Karine de Vargas Aires e Laurence Boligon de Araújo (agora colegas de profissão).

A equipe de estagiários do manejo dos garanhões, externas, pastagem e alambrados: Dionoceles da Rosa Dotto e Diego Fontoura Simões

Agradecimento especial aos bolsistas de iniciação científica que atuaram durante o período dos experimentos.

À minha eterna companheira-namorada e colega Ana Paula Martini pelo carinho, amizade, compreensão e amor em todos os momentos. Mesmo aos domingos e finais de semana (quando realmente eram as rotinas mais pesadas dos experimentos) sempre manteve o carinho e a compreensão e acima de tudo auxiliando. Te amo!

Aos demais verdadeiros amigos, que confiaram a mim a verdadeira amizade e que contribuíram para que essa etapa fosse alcançada.

Muito obrigado!

“O que sabemos é uma gota. O que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA PRÉ REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Autor: Gilson Antonio Pessoa

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

As biotécnicas da reprodução na espécie equina avançaram na última década, tanto em conhecimento agregado por pesquisas como também pela demanda do mercado. No entanto, na espécie equina machos com subfertilidade são diagnosticados frequentemente com elevado número de espermatozoides com alterações morfológica e/ou imóveis. A utilização apenas de células viáveis para realizar o processo de resfriamento busca evitar perda de material (diluyente) e produção de metabólitos tóxicos aos espermatozoides viáveis. O objetivo deste estudo foi utilizar a separação espermática (lã de vidro e centrifugação com Androcoll®) pré-resfriamento para incrementar a viabilidade do sêmen de garanhões pôneis refrigerados a 5°C durante 48h. Os parâmetros motilidade, funcionalidade de membrana (HOST), viabilidade espermática (CFDA/PI), atividade mitocondrial e morfologia espermática foram avaliados no sêmen fresco e refrigerado (24 e 48h). A utilização da filtração por lã de vidro ou Androcoll® pré-resfriamento do sêmen equino selecionou espermatozoides com maior motilidade, funcionalidade de membrana, viabilidade espermática e atividade mitocondrial. Adicionalmente, a filtração por lã de vidro proporcionou refrigerar sêmen com elevado número de células morfológicamente normais sem perdas significativas de espermatozoides pelo processo de filtração. Tanto a técnica de lã de vidro como a centrifugação com Androcoll® mostraram-se eficientes em separar ejaculados com maior viabilidade para o resfriamento. Já a técnica de lã de vidro apresenta-se como uma técnica de baixo custo e de fácil execução para ser aplicada tanto para pequenos, ou grandes volumes de sêmen.

Palavras-Chave: Lã de vidro, Androcoll, garanhão, preservação, espermatozoide.

ABSTRACT

SPERM SEPARATION FOR COOLING OF EQUINE SPERM

Author: Gilson Antonio Pessoa

Advisor: Mara Iolanda Batistella Rubin

The reproduction biotechnologies in equine species have advanced in the last decade both in aggregate knowledge by research as well as the market demand. However, it in the equine species often with male subfertility where the ejaculate has a high number of sperm with morphological and / or property changes. The use of only viable cells to perform the cooling process seeks to avoid loss of material (diluent) and production of toxic metabolites to viable sperm. The aim of this study was to use the sperm separation (glass and spin wool with Androcoll®) pre-cooling to increase the viability of semen chilled ponies stallions at 5 ° C for 48 hours. We evaluated the motility parameters, membrane functionality (HOST), sperm viability (CFDA / PI), mitochondrial activity and morphology in fresh and chilled semen (24 and 48h). The use of filtration glass wool or Androcoll® pre-cooling of equine semen selected sperm with higher motility, functionality membrane, sperm viability and mitochondrial activity. In addition to filtration through glass wool afforded cooling semen with a high number of morphologically normal cells without significant losses of spermatozooids the filtration process. Both glass wool technique as centrifugation with Androcoll® were efficient in separating ejaculated more viability for cooling. Already glass wool technique presents itself as a low cost and simple technique to be applied to both small or large volumes of semen.

Keywords: Glass wool, Androcoll, stallion, preservation, sperm.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1. Esquema representativo do espermatozoide equino. Todo o espermatozoide é coberto pela membrana plasmática, que é normalmente em justaposição com as estruturas subjacentes e está ancorada na margem caudal da cabeça, ao nível do anel, e ao longo do eixo longitudinal da peça principal. A cabeça inclui o núcleo (que contém a informação genética com DNA altamente condensado), acrossoma (que contém enzimas necessárias para a fertilização), uma parte especializada do acrossoma denominado o segmento equatorial, e a lâmina pós acrossomal. O colo é o ponto de ligação da cauda à cabeça, por uma disposição de esfera e encaixe. O par central e nove pares de microtúbulos, que constituem a axonema, estão rodeados por nove fibras densas. Mitocôndrias são estruturas onde a maior parte da energia necessária para o movimento dos espermatozóides é produzida. As colunas longitudinais e bainha fibrosa da peça principal e as fibras densas fornecem a rigidez necessária para o movimento normal da cauda. Dimensões do espermatozoide do garanhão são aproximadamente as seguintes: comprimento da cabeça, 7 μm ; comprimento da peça intermediária, 10 μm ; diâmetro da peça intermediária, 0.9 μm ; comprimento da peça principal, 40 μm ; diâmetro peça principal, 0,6 a <0,5 μm ; e comprimento da peça final, 4 μm . (Adaptado de Amann, R.P. e Graham, J.K., Spermatozoal Function. In Equine reproduction, Chapter 102)..... 20
- Figura 2. Seringa preparada com lã de vidro para separação espermática de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira. Arquivo pessoal..... 31
- Figura 3. A) Imagem obtida após a separação espermática com lã de vidro do sêmen de garanhões pôneis da raça brasileira auxiliada pela gravação de vídeo com o programa AmCap® em câmera de 5mp acoplada a um microscópio triocular em aumento de 400x. B) Imagem editada no programa Image J mostrando o deslocamento dos espermatozoides observados em A. Arquivo pessoal..... 34
- Figura 4. Imagem obtida durante a execução do teste hiposmótico realizado durante o estudo de separação espermática por lã de vidro no sêmen de um garanhão da raça pônei Brasileira. Na seta preta há um espermatozoide que reagiu ao teste hiposmótico apresentando enrolamento da cauda. A seta vazada aponta para um espermatozoide com membrana lesada que não reagiu ao teste hiposmótico, mantendo a cauda reta. Aumento de 400x- Microscópio Olympus BX 40. Arquivo pessoal..... 36

Figura 5.	Espermatozoides de garanhão pônei da raça brasileira com membrana lesada corados com iodeto de propídio e visualizados por microscopia de epifluorescência. Arquivo pessoal.....	37
Figura 6.	Coloração supra vital (eosina/nigrosina) em esfregaço do ejaculado de um garanhão da raça pônei Brasileira realizado durante os experimentos de separação espermática por lã de vidro. Aumento de 400x- Microscópio Olympus BX 40. Arquivo pessoal.....	39
Figura 7.	Microplacas de microtitulação de 96 poços com amostras de sêmen de garanhões para separação espermática por lã de vidro para leitura de absorbância em leitor de Elisa de microplacas MR-96A (à esquerda). E a direita observa-se amostras reagidas em cor púrpura (reagidas) e amostras em cor amarelo (não reagidas). Arquivo pessoal	41
Artigo 1		
Figure 1	Relationship between normal sperm morphology and retained sperm by glass wool filtration in pony stallions of Brazilian breed.....	61
Figure 2	The semen pH during cooling at 5°C of control, filtered and retained sperm by glass wool filtration in pony stallions of Brazilian breed.....	62
Artigo 2		
Figura 1	Atividade mitocondrial avaliada pela redução de MTT em amostras de sêmen de garanhões pôneis refrigeradas a 5°C durante 48 h.....	82

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1	Efeito da força de centrifugação, tempo, diluição, volume sobre a taxa de recuperação e motilidade no sêmen equino.....	28
----------	---	----

Artigo 1

Table 1	Ejaculate and semen parameters in pony stallions of Brazilian breed submitted to separate through glass wool filtration.....	58
Table 2	Percentage of sperm morphology in pony stallions of Brazilian breed submitted to separate through glass wool filtration.....	59
Table 3	Means and standard deviation of progressive motility, hypo-osmotic swelling test and MTT absorbance in fresh, 24 h, and 48 h after cooling at 5°C in pony stallions of Brazilian breed.....	60

Artigo 2

Tabela 1	Percentual médio (\pm SE) de alterações e espermatozoides intactos em esfregaços corados com corante Spermac em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira pré-resfriamento (0h), submetidos a quatro distintos tratamentos.....	78
Tabela 2	Percentual médio de motilidade total (\pm SE) subjetiva de vinte e quatro ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira submetidos a avaliação imediata após processamento (0h), resfriados por 24 h e 48 h a 5°C.....	78
Tabela 3	Valores médios (\pm SE) da funcionalidade de membrana determinado pelo teste hiposmótico em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira resfriados por 24 h ou 48 h a 5°C em diluente com leite em pó desnatado na dose de 50×10^6 espermatozoides/mL.....	79
Tabela 4	Valores médios (\pm SE) da viabilidade espermática determinados pelo teste Eosina/Nigrosina em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira resfriados a 5°C em diluente com leite em pó desnatado (Equidil/UFSM) na dose de 50×10^6 espermatozoides/mL.....	79

Tabela 5	Percentual médio (\pm SE) de alterações e espermatozoides intactos (normais) visualizados em esfregaços corados com corante Spermac em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis após processamento na hora inicial (0h) pré-resfriamento submetidos a seleção por centrifugação, Androcoll E ou por lâ de vidro.....	80
Tabela 6	Médias (\pm SE) de motilidade progressiva, teste hiposmótico, absorbância de MTT, viabilidade e vitalidade espermática em ejaculados na zero (inicial), 24 e 48 horas após resfriamento a 5°C submetidos a seleção por centrifugação, Androcoll-E ou por lâ de vidro.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
µm	Micrômetro
ATP	Adenosina Trifosfato
g	Força centrífuga
mL	Mililitro
Sptz	Espermatozoide
r	Coefficiente de correlação
P	Valor de P ou probabilidade de significância
Kg	Quilograma
mosM	Miliosmóis
CFDA	Diacetato 6-Carboxifluoresceína
IP	Iodeto de propídio
MTT	Atividade Mitocondrial
IA	Inseminação Artificial
min	Minuto
pH	Potencial de Hidrogênio
HOST	Teste Hiposmótico

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. O espermatozoide equino e plasma seminal	19
2.3. Remoção do plasma seminal e seleção espermática	25
2.3.1. Centrifugação	26
2.3.2. Seleção espermática	30
2.4. Avaliação microscópica do sêmen	33
2.4.1. Motilidade espermática	33
2.4.2. Teste de funcionalidade de membrana – Teste hiposmótico.....	34
2.4.3. Integridade de membrana	36
2.4.4. Morfologia espermática.....	37
2.4.5. Viabilidade mitocondrial.....	40
2.5. Taxa de resfriamento do sêmen equino e diluente	41
3- ARTIGO 1	44
4- ARTIGO 2	63
5- CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
Anexo A: Publicação no Journal Reproduction Fertility and development	100

1- INTRODUÇÃO

A equinocultura brasileira apresenta desenvolvimento ativo e alguns segmentos como o esporte têm representatividade internacional, tanto pela qualidade dos animais quanto dos cavaleiros. Outros segmentos também ganham força como a equoterapia, turismo rural, cavalgas, atividades de campo; fazendo com que haja valorização dos criatórios e dos animais.

O estudo publicado em 2006 relatou que a atividade equestre movimenta R\$ 7,5 bilhões ao ano no Brasil, gera 642,5 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos (Cepea, 2006). Entre os ramos da prestação de serviços da atividade equestre encontram-se a reprodução e o melhoramento genético utilizando as biotecnologias da reprodução. Inevitavelmente este setor cresce acompanhando a expansão da atividade. Portanto, esta atividade necessita ser inovada constantemente e produzindo tecnologias eficazes para melhorar o desempenho reprodutivo. A atividade reprodutiva de equinos pode ser didaticamente dividida em manejo reprodutivo e aplicação de biotecnologias no macho e na fêmea, mas do ponto de vista fisiológico inseparáveis. Para se lograr ótimo desempenho na inseminação artificial de éguas é necessário obter um ejaculado que após manipulado mantenha as características espermáticas mínimas necessárias para a fecundação.

Na equideocultura mundial há a demanda crescente pela utilização do sêmen refrigerado ou congelado devido a liberação do seu uso por grande parte das associações de criadores, bem como por facilitar a logística dos criatórios. A fecundidade do sêmen congelado, porém ainda é baixa e isto dificulta a utilização em larga escala (Vidament, 2005). Em alguns ganhões, tanto o resfriamento quanto o congelamento do sêmen pode acarretar danos a célula espermática e prejudicar a viabilidade da aplicação nestes reprodutores em alguma biotecnologia (Ramires Neto *et al.*, 2014).

Uma grande desvantagem do sêmen congelado é que não há um único teste laboratorial para prever a fecundidade do sêmen congelado excepto inseminação de éguas, que é muito caro (Graham, 1996; Kuisma *et al.*, 2006), e por vezes há também a falta de percepção do criador e veterinário responsável pela inseminação da égua que é necessário examinar a fêmea a ser inseminada através do exame ultrasonográfico várias vezes ao dia, ou até mesmo utilizar mais de uma dose por ciclo para assim alcançar boas taxas de fertilidade com sêmen congelado (Barbacini, Loomis e Squires, 2005).

O resfriamento e a criopreservação do sêmen aumentam a produção de EROS (espécies reativas ao oxigênio), que induzem dano ao DNA espermático e causam rápida perda de potencial fertilizante por peroxidação lipídica da membrana plasmática (Ball, 2008). Dentre as principais causas de danos durante o processo de resfriamento há efeitos deletérios do próprio plasma seminal (Barrier-Battut *et al.*, 2013), onde grande parte destas células acabam morrendo e outras sustentadas pela presença de substâncias tóxicas e radicais livres no meio produzidos por células inviáveis (Ball, 2008). A centrifugação é amplamente utilizada para remoção parcial do plasma seminal e é um método considerado benéfico para ganhões cujos ejaculados têm baixa tolerância ao resfriamento e armazenamento com técnicas de diluição do sêmen e embalagem de rotina, especialmente se o sêmen é armazenado por tempo superior a 24h (Brinsko, Crockett e Squires, 2000b).

Outra técnica utilizada para retirar o plasma seminal e concentrar os espermatozoides do ejaculado é utilização do Sperm Filter®. Este foi eficiente em retirar o plasma seminal comparado com a centrifugação além de ser mais prático e provocar baixíssima perda de espermatozoides (Neto *et al.*, 2013). No entanto, ainda são escassos os dados sobre a peroxidação lipídica, as alterações das membranas e sobre o potencial da membrana mitocondrial da célula provocadas nas células vivas por células mortas durante o resfriamento.

O estudo de Trokey e Merilan (1982) com sêmen de ganhões pôneis sugeriu que a retirada de células mortas ajudaria a prolongar a viabilidade espermática. Já a adição de espermatozoides mortos por congelamento não afeta negativamente a motilidade quando o sêmen foi diluído na concentração de 25×10^6 espermatozoides/ml e apenas 10% de plasma / seminal armazenado durante 24 h (Brinsko *et al.*, 2003). No entanto, estes mesmos autores afirmam que o estudo não pode simular a presença de espermatozoides necróticos e seus potenciais produtos, afirmando apenas que espermatozoides danificados pela criopreservação não afeta espermatozoides restantes. Já espermatozoides mortos de carneiro são uma importante fonte de radicais livres (H_2O_2) durante a criopreservação e esta produção é maior quanto maior a concentração de células mortas (Alomar, Alzoabi e Zarkawi, 2016).

Os métodos de filtração por sefadex e lã de vidro são eficazes em separar espermatozoides com boa motilidade no sêmen fresco ou congelado em várias espécies (Sieme *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009; Arzondo *et al.*, 2012).

Ainda assim permanecem lacunas no entendimento da aplicação da técnica de filtração do sêmen equino pré-resfriamento e o efeito deste sobre viabilidade, integridade de membrana e viabilidade mitocondrial. Este estudo teve como objetivo comparar técnicas de remoção do

plasma seminal (centrifugação e Sperm Filter®) e de separação espermática (filtração por gravidade em lã de vidro e Androcoll-E) sobre a viabilidade do sêmen de garanhões pôneis mantido a 5°C durante 48h. Dentre os parâmetros seminais avaliados destaca-se o pH, osmolaridade, motilidade, funcionalidade de membrana, viabilidade mitocondrial, e morfologia espermática.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O espermatozoide equino e plasma seminal

Em 1677, Antony Von Leeuwenhoek, cientista holandês reconhecido como o pai da microscopia, descobriu os protozoários ao examinar o ejaculado de um paciente com sífilis. Ele identificou também outras estruturas, as quais denominou micro-organismos móveis, presumidamente associados com essa doença. No entanto, as observações subsequentes desses mesmos “organismos” em amostras de homens saudáveis, cães, pássaros e outros animais demonstraram ser um componente fisiológico do esperma, supostamente envolvido na procriação. Os avanços da ciência somente progrediram após o pioneiro estudo noticiado por Lázaro Spallanzani com a fecundação artificial nos anos 1700, seguido por Dumas e Prevost. Posteriormente, na segunda metade do século XVIII com a introdução de exames citológicos e as descobertas de Newport e Oscar Hertwig houveram avanços significativos concluindo que o espermatozoide é uma célula produzida pelo organismo masculino, que penetra no óvulo e na sequência ocorre a fusão dos pró-núcleos. Mais tarde, as investigações com o microscópio eletrônico e análise bioquímicas esclareceram a estrutura e função dos espermatozoides (Baccetti, 1986).

O espermatozoide é o produto final do processo da espermatogênese através de sucessivas divisões mitóticas, meióticas e fases pós meióticas que ocorre nos túbulos seminíferos do testículo. Durante a fase mitótica, as progênies de células germinativas da linha germinal passam por uma série de divisões para expandir a população de espermatogônias. A fase da meiose inicia com a fase S do ciclo da última célula e culmina em duas divisões meióticas que rapidamente ocorrem sem a replicação do DNA para produzir a célula haploide denominada espermátide. Esta fase é caracterizada por extensa remodelação das espermátides que passam pela formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento flagelar e perda de parte do citoplasma. Estes acontecimentos resultam numa célula altamente diferenciada, funcionalmente e estruturante, capaz de se combinar com um óvulo e iniciar o processo que dá origem à geração seguinte (Fawcett, 1975). Já as principais características morfológicas e fisio-bioquímicas do espermatozoide foram descritas no início do século XX (Roosen-Runge, 1962; Bearer e Friend, 1990; Toshimori, 1998).

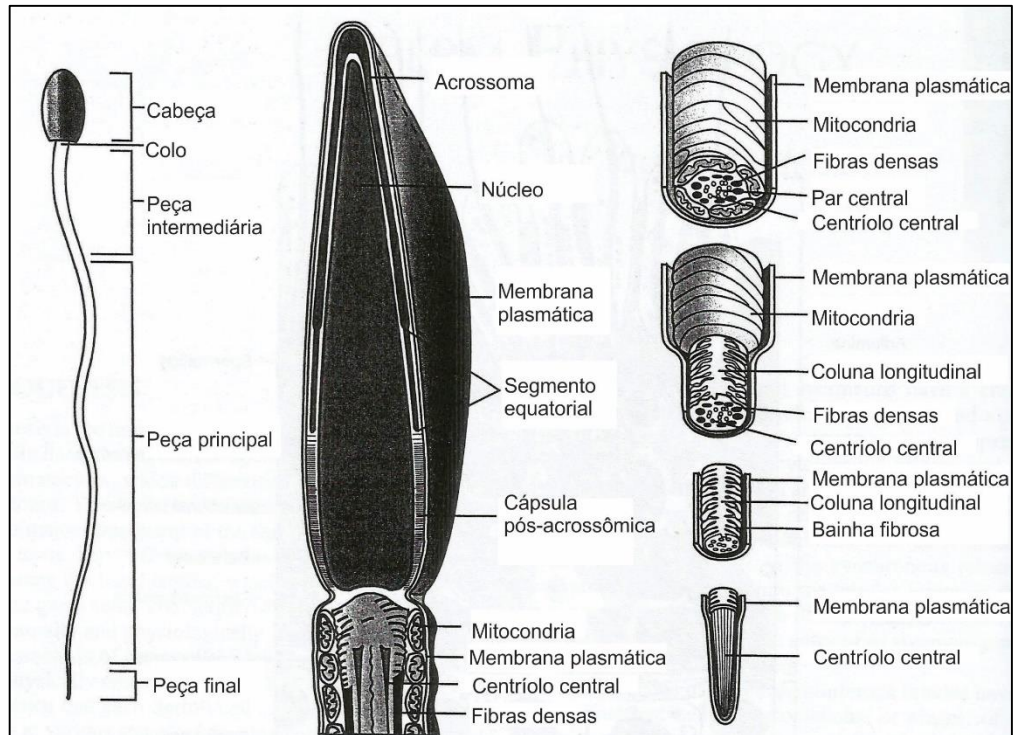


Figura 1. Esquema representativo do espermatozoide equino. Todo o espermatozoide é coberto pela membrana plasmática, que é normalmente em justaposição com as estruturas subjacentes e está ancorada na margem caudal da cabeça, ao nível do anel, e ao longo do eixo longitudinal da peça principal. A cabeça inclui o núcleo (que contém a informação genética com DNA altamente condensado), acrossoma (que contém enzimas necessárias para a fecundação), uma parte especializada do acrossoma denominado o segmento equatorial, e a lâmina pós acrossomal. O colo é o ponto de ligação da cauda à cabeça, por uma disposição de esfera e encaixe. O par central e nove pares de microtúbulos, que constituem a axonema, estão rodeados por nove fibras densas. Mitocôndrias são estruturas onde a maior parte da energia necessária para o movimento dos espermatozóides é produzida. As colunas longitudinais e bainha fibrosa da peça principal e as fibras densas fornecem a rigidez necessária para o movimento normal da cauda. Dimensões do espermatozoide do garanhão são aproximadamente as seguintes: comprimento da cabeça, 7 μm ; comprimento da peça intermediária, 10 μm ; diâmetro da peça intermediária, 0,9 μm ; comprimento da peça principal, 40 μm ; diâmetro peça principal, 0,6 a <0,5 μm ; e comprimento da peça final, 4 μm . (Adaptado de Amann, R.P. e Graham, J.K., Spermatozoal Function.. In Equine reproduction, Chapter 102).

Os espermatozoides são células alongadas (Figura 1) constituídas de cabeça, contendo um núcleo e uma cauda (Fawcett, 1975). A cabeça apresenta forma oval e achatada, contendo cromatina altamente compacta ou condensada que compreende um complexo DNA, com uma classe especial de proteínas denominadas protaminas espermáticas. O acrossoma é uma estrutura de parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Complexo de Golgi gerado durante a espermiogênese. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos. O colo conecta a cabeça do espermatozoide à cauda (flagelo), que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal. O colo ou peça de conexão forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo e é contínua com nove feixes de fibras

que posteriormente se projetam através da maior parte da cauda. A peça intermediária, localizada entre o colo e o *annulus*, juntamente com o comprimento total da cauda formam o axonema (Eddy, 1994). Na peça intermediária existe grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, cuja função é produzir a energia necessária para a motilidade espermática. O axonema é uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina e está envolvido no mecanismo de motilidade espermática. Este apresenta nove pares de microtúbulos periféricos, além de um par central. Para ação direta deste movimento a dineína e a tubulina utilizam a adenosina trifosfato (ATP), produzida pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária (Eddy, 1994).

A membrana plasmática engloba a célula, envolve todas as estruturas espermáticas, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (Amann, 1992). É composta de moléculas lipídicas e proteicas, unidas principalmente por ligações não-covalentes. A bicamada lipídica ficou estabelecida definitivamente como a base universal da estrutura das membranas celulares (Amann e Pickett, 1987). A proporção de colesterol:fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. Usualmente, quanto mais colesterol presente, menos flexível ou menos fluida é a porção da membrana (Amann e Pickett, 1987). Devido as diferenças na composição da membrana plasmática, cada compartimento exhibe propriedades físicas diferentes. Existem dados limitados sobre a composição da membrana plasmática do garanhão. A proporção colesterol:fosfolipídio é 0,36 (Amann e Pickett, 1987), um valor intermediário quando comparado com valores de varrões e touros (Amann e Pickett, 1987).

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal (Gatti *et al.*, 2004). O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela *rede testis*, epidídimo e glândulas acessórias, sendo expelido em frações durante a ejaculação por meio de contrações uretrais. A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, translúcida e provém das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda fração possui aspecto leitoso, é rica em espermatozoides, glicerilfosforilcolina (GPC) e ergotineína e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente (Varner *et al.*, 1987). A terceira porção contém poucos espermatozoides, porém grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das glândulas vesiculares, com a função de carrear os poucos espermatozoides que restaram na uretra (Amann e Graham, 1993). O volume do ejaculado do garanhão pode chegar a 200 mL, sendo 10 a 20 vezes maior do que o ejaculado de touros e 50 a 100 vezes maior do que o

ejaculado de carneiros. Entretanto, o número total de espermatozoides por ejaculado é similar nas três espécies, demonstrando a grande contribuição do plasma seminal no sêmen de equinos (13).

O plasma contém fatores estimuladores da motilidade espermática como os fatores de ativação catalítica (encontrados nas glândulas acessórias) e os fatores nutricionais (Mann, 1975). Alguns constituintes do plasma seminal equino já foram isolados e identificados, entretanto até a década de 90 informações sobre sua origem, estrutura e funções continuavam limitados (Mcdowell *et al.*, 1996). A variabilidade individual entre garanhões com relação à composição bioquímica e protéica do plasma seminal dificulta a obtenção de resultados consistentes em relação a estes componentes (proteína, enzimas, íons e hormônios). A maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (Dacheux, Gatti e Dacheux, 2003). A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e o corpo as regiões mais ativas. Na espécie equina, cerca de 73% dos compostos protéicos são secretados na cabeça do epidídimo (Dacheux, Gatti e Dacheux, 2003). As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com a célula espermática. Podem ocorrer ligações fracas, responsáveis pela quiescência dos espermatozoides; ligações fortes, importantes no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização; modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrendo ou expondo receptores; ou presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (Marengo, 2008). Sabe-se que a maioria das proteínas seminais pertence a três grupos, são elas: proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermadesinas (Kareskoski e Katila, 2008b).

A grande maioria das enzimas encontradas no plasma seminal funciona como agente antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, fragmentação do DNA espermático (Ball *et al.*, 2000).

O efeito do plasma seminal sobre a motilidade espermática para alguns garanhões pode ser prejudicial e se torna mais evidente em condições de refrigeração (Rigby *et al.*, 2001). Animais que apresentavam redução acentuada da motilidade espermática após o processo de refrigeração convencional (5°C/24-48h), demonstraram um aumento na cinética espermática quando há a remoção parcial do plasma seminal antes da refrigeração. Apesar de sua reconhecida importância, muitos procedimentos de criopreservação e resfriamento preconizam

a retirada do plasma seminal, substituindo-o por diluentes, reduzindo assim a proteção conferida aos espermatozoides. Alguns estudos apontam para efeito deletério do plasma seminal equino sobre a motilidade espermática, após períodos prolongados de armazenamento (Varner *et al.*, 1987; Carney *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1991).

Já estudos posteriores identificaram efeitos do plasma de garanhões de baixa e alta fecundidade com influência direta no melhoramento da motilidade e incremento da viabilidade durante resfriamento. A relação do plasma seminal com ocorrência de endometrite induzida pela cobertura em éguas (Portus, Reilas e Katila, 2005; Akcay *et al.*, 2006; Katila e Kareskoski, 2006; Kareskoski e Katila, 2008a; Kareskoski, A. M. *et al.*, 2011; Kareskoski, M. *et al.*, 2011) também foi objeto de vários estudos com garanhões.

O efeito do plasma seminal sobre a conservação e a fecundidade de espermatozoides equinos permanece controverso. Do mesmo modo, comparações diretas entre os vários estudos tornam-se difíceis, devido à grande variabilidade individual com relação à composição do plasma seminal e a utilização de diferentes métodos de pesquisa, como taxa de diluição, temperatura, tempo ou método de centrifugação.

2.2. Preservação do sêmen equino

A capacidade e a possibilidade de preservar a viabilidade do sêmen pela refrigeração oferece muitas vantagens aos criadores de cavalos e as centrais de reprodução. A possibilidade de coletar e processar o sêmen num local e transportá-lo a diferentes localidades para inseminação de éguas elimina o custo e o estresse associado ao envio de éguas até o garanhão. Adicionalmente, há redução da transmissão de doenças que poderiam afetar a égua recém chegada (Gomes, 2009) num haras. Alguns pontos importantes devem ser observados para o sucesso desta biotecnologia como por exemplo o processamento que engloba desde colheita até seu uso na égua (Jasko, 1994). Sem dúvida, a preservação deve ter atenção especial.

Os estudos com sêmen equino refrigerado têm sido delineados visando manter a maior viabilidade durante o maior período de tempo possível. Portanto, quanto mais tempo o potencial fecundante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será o uso do sêmen transportado (Batellier *et al.*, 2001; Aurich, 2008). Apesar de todos os avanços alcançados na preservação de sêmen equino, ainda são encontradas variações consideráveis nas taxas de fecundação. Acredita-se que os diluentes estejam bem definidos e evitem alterações na produção de radicais livres e de metabólitos tóxicos pelas células mortas. Contudo, estudos

continuam sendo desenvolvidos para investigar tais variações. Já, na década de 70 as pesquisas confirmavam estudos anteriores segundo os quais, à medida que o tempo de armazenamento aumenta, a fecundidade do sêmen diminui (Martin, Klug e Gunzel, 1979). Também se tem conhecimento que apenas 20% dos garanhões produzem sêmen com capacidade de criopreservação, 60% resfriam bem e outros 20% não toleram o resfriamento (Vidament *et al.*, 1997; Ecot *et al.*, 2000; Ecot *et al.*, 2005; Vidament, 2005). Outro importante ponto já conhecido é que a viabilidade espermática é muito reduzida quando o período de refrigeração é superior a 48 horas (Batellier *et al.*, 1998; Batellier *et al.*, 2001).

Portanto, o sucesso da preservação espermática pela refrigeração depende de fatores como: ambiente adequado (diluente), taxa de refrigeração relativamente lenta, temperatura de manutenção que reduza o metabolismo espermático, que minimize os danos à membrana plasmática e previna a ocorrência prematura da capacitação (Loomis, 2001; 2006).

Para o armazenamento do sêmen equino por longos períodos (12-48h) é necessário que haja uma diminuição da temperatura, reduzindo assim o metabolismo celular. Dois pontos durante o processo podem ser determinantes para a ocorrência das lesões celulares: a temperatura e a velocidade de resfriamento (Watson, 1981). A exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em alterações morfológicas e bioquímicas que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (Watson, 1981). Durante o resfriamento se o processo for agressivo, ou seja, promover mudança brusca de temperatura poderá ocorrer choque térmico pelo frio. Esse processo se caracteriza pela rápida perda de motilidade, danos ao acrossoma, membrana plasmática e redução da atividade metabólica (Amann e Graham, 1993).

A estocagem com maior viabilidade e por maior tempo possível permite em qualquer espécie, flexibilidade de logística no processo de inseminação artificial. Obviamente na equideocultura isso significa que o proprietário do garanhão terá, maior flexibilidade em coletar e enviar o sêmen, assim como o proprietário da égua para inseminar no momento síncrono com a ovulação.

Após a coleta do ejaculado, o sêmen deve ser diluído com um diluente para manter sua viabilidade durante a refrigeração (Pickett *et al.*, 1975). Os diluentes fornecem nutrientes para o metabolismo, tampões para a manutenção adequada do pH e também protegem as membranas do choque pelo frio, podendo conter ou não antibióticos que previnem o crescimento bacteriano durante a estocagem do sêmen (Jasko, 1994). Já a refrigeração conduzida a uma velocidade adequada de redução da temperatura torna possível o armazenamento do sêmen por períodos

longos e conseqüentemente viabilizam seu uso. Taxas de 0,5°C ou 0,3°C por minuto são piores que taxas de 0,05°C por minuto quando se considera tempos de até 96h de armazenamento a 5°C (Cochran *et al.*, 1984; Kayser *et al.*, 1992). Quanto à temperatura de estocagem do sêmen, se a inseminação ocorrer até 12 horas após a coleta, o sêmen pode ser armazenado tanto a 20°C como a 5°C (Squires *et al.*, 1999). Para estocagem por tempo superior a 12 horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até 5°C.

O efeito do tempo de conservação e da temperatura sobre a desnaturação do DNA espermático foi avaliado em ganhões férteis e subférteis que tiveram o sêmen em condições similares de armazenamento foi avaliado na pesquisa de Love et al. (2002). A suscetibilidade a alterações no DNA espermático devido a desnaturação após exposição do sêmen diluído a diferentes temperaturas e tempos (5, 20 e 37°C por 7, 20, 31 e 46h). As amostras de todos ganhões mantidos a 5°C foram similares para a integridade da cromatina durante todos os períodos de tempo de armazenamento. Os ganhões considerados subférteis mostraram aumento na susceptibilidade à desnaturação ou declínio na qualidade da cromatina entre 20 e 31h a 5°C.

Altas concentrações de plasma seminal são deletérias aos espermatozoides submetidos à refrigeração e armazenamento. O método mais frequentemente utilizado para refrigerar e transportar sêmen é a diluição, pois reduz os efeitos negativos dos componentes do plasma seminal. Esta diluição não se aplica a ganhões oligozoospermicos (Brinsko, Crockett e Squires, 2000a).

Existem métodos para reduzir a concentração de plasma seminal e seleção espermática que merecem ser revisados aqui pela importância na manipulação do sêmen após coleta.

2.3. Remoção do plasma seminal e seleção espermática

Os ejaculados de ganhões apresentam ampla variabilidade de parâmetros e isto pode ser relevante no momento de preparar o ejaculado para a inseminação artificial. Desta forma, obter espermatozoides concentrados ou maioria das células viáveis são pertinentes para uso direto a fresco, ou para preservação (Sieme *et al.*, 2003).

A seleção espermática muitas vezes é confundida com as técnicas de concentração espermática e remoção do plasma seminal. Portanto, compreendem concentração/remoção do plasma a técnica de centrifugação seguida de ressuspensão em diluentes e a técnica do Sperm

Filter® (Neto, 2013). No entanto, estas técnicas não permitem selecionar espermatozoides, mas separá-los de parte ou totalmente do plasma seminal (Sieme *et al.*, 2003).

Entre as técnicas de seleção espermática pode-se citar a separação por migração ascendente (Swim up), separação por gradientes (Percoll), filtração (Sephadex, Glass wool e membranas filtrantes) e centrifugação em suspensão coloidal (Androcoll-E®) (Sieme *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2008; Morrell *et al.*, 2008; Stuhmann *et al.*, 2010; Morrell, 2012; Morato *et al.*, 2013; Heutelbeck *et al.*, 2015).

2.3.1. Centrifugação

A pesquisa publicada por Martin e colaboradores (Martin, Klug e Gunzel, 1979) com sêmen equino congelado evidenciou a centrifugação como importante ferramenta a ser executada antes da adição do diluente para criopreservação. Os autores observaram aumento considerável da motilidade e da taxa de concepção (63%) ao centrifugar o sêmen por 5 minutos seguido da adição de diluente a base de lactose e gema de ovo. Nas duas últimas décadas algumas equipes enfatizaram que aproximadamente 5% de plasma seminal são necessários para manter a motilidade do sêmen refrigerado equino (Jasko *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Moore, Squires e Graham, 2005) e que a permanência de 10% de plasma seminal pós-centrifugação exerce efeito benéfico sobre a motilidade espermática equina pós-descongelamento (Amann e Pickett, 1987; Jasko, 1992; Pickett e Amann, 1992; Brinsko *et al.*, 2000). Entretanto, o processo de centrifugação não é inócuo aos espermatozoides e pode reduzir sua motilidade (Dell'aqua Jr. *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2001).

A centrifugação do sêmen (600g por 10 min) para retirada do plasma seminal apresenta benefícios quando o período de refrigeração for superior a 24 horas. Alguns fatores, como a força de centrifugação, o período de tempo da centrifugação, componentes do diluente, percentual de plasma seminal retirado e o diluente utilizado na ressuspensão do sêmen após a centrifugação influenciam na qualidade do sêmen (Pickett *et al.*, 1975; Martin, Klug e Gunzel, 1979; Cochran *et al.*, 1984; Jasko *et al.*, 1992). A centrifugação foi referida como uma atividade que exerce efeito negativo sobre a motilidade espermática, ou até mesmo como aumento discreto da motilidade (Martin, Klug e Gunzel, 1979). Estes efeitos negativos podem ser minimizados por ajustes no tempo, força de centrifugação, volume centrifugado e diluente (Heitland *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 2012).

A tabela 1 exhibe informações de pesquisas em que a centrifugação foi empregada para concentrar o sêmen equino, bem como para determinar seu efeito e resultados.

Ferrer et al. (2012) testaram diferentes tempos, força de centrifugação e diluentes (Tabela 1) e concluíram que a sobrevivência do espermatozoide após centrifugação e refrigeração não foi afetada pelo protocolo de centrifugação se este tiver utilizando o diluente, volume, tempo e força de centrifugação adequada. Apenas amostras em diluente a base de gema de ovo resultaram em diminuição da motilidade progressiva após a centrifugação e resfriamento. Quando o sêmen eqüino foi centrifugado a 400 ou a 900 g durante 5 a 10 min e diluído na concentração de 25 a 100×10^6 spz/mL em diluentes a base de leite houve redução de motilidade ou de espermatozoides viáveis, resultado da diminuição na sedimentação e não da morte celular no sedimento. Portanto, protocolos de centrifugação que melhoram a velocidade de sedimentação podem melhorar a recuperação de espermatozoides móveis e viáveis. Com os protocolos de centrifugação convencionais volumes de 20 mL a 50 mL são pipetados em tubos estéreis e as perdas de espermatozoides são minimizadas no sobrenadante. Já a utilização de volumes inferiores aos mencionados, pode não ser prático em todas as circunstâncias. Além disso, o protocolo de centrifugação “ideal” deverá ser ajustado a garantões com peculiaridades individuais.

Tabela 1. Efeito da força de centrifugação, tempo, diluição e volume da diluição sobre a taxa de recuperação e motilidade no sêmen equino.

Autor	Força de centrifugação (x g)	Tempo (min)	Diluição	Volume (mL)	Diluyente	Efeito na motilidade	Recuperação (%)
Pickett et al. 1975	370 ou 829	5	1:3 ou não diluído	4	EYT*	Nenhum	NR****
	956	5	Não diluído	4	.	Redução	NR
Martin et al. 1979	1000	5	1:2	NR	EDTA**	Nenhum	NR
			Não diluído	NR	.	Redução	NR
Cochran et al. 1984	400	10	50 x 10 ⁶ sptz/mL	20-40	Citrato:EDTA	Nenhum	67
	650	15	50 x 10 ⁶ sptz/mL	20-40	Citrato:EDTA	Nenhum	90
	650	15	1:1	20-40	Glicose:EDTA	Redução	92
Jasko et al. 1991	500	18	50 x 10 ⁶ sptz/mL	40	Leite desnatado	Redução	NR
Jasko et al. 1992	400	9	25 x 10 ⁶ sptz/mL	40	Leite desnatado	Redução	NR
Heitland et al. 1996	400	4	50 x 10 ⁶ ptz/mL	15 mL	HBS**	Nenhum	48
		6				Nenhum	48
		8				Nenhum	68
		10				Nenhum	81
		12				Nenhum	80
		14				Nenhum	86
		16				Nenhum	83

		20				Redução	87
		24				Redução	95
Karekoski et al. 2006	500	15	1:1	.	Leite desnatado	Nenhum	NR
Ferrer et al. 2012	0	0	25 x 10 ⁶ sptz/mL	40	Diluyente a base de leite (EZ-Mixin CST)	.	.
	400	10		40		Redução	.
	400	10		20		Nenhum	.
	400	5		40		Redução	.
	400	5		20		Redução	.
	900	10		40		Nenhum	.
	900	10		20		Nenhum	.
	900	5		40		Redução	.
	900	5		20		Nenhum	.
Ferrer et al. 2012	0	0	25 x 10 ⁶ sptz/mL	40	A base de leite (INRA96)	.	.
	900	10			A base de leite (INRA 96)	Nenhum	.
	0	0			A base gema ovo (VMZD)	.	.
	900	10			A base gema ovo (VMZD)	Redução	.
	0	0			A base de leite (EZ-Mixin)	.	.
	900	10			A base de leite (EZ-Mixin)	Nenhum	.

*EYT: A base de gema de ovo e lactose, **EDTA: A base de Glicose-EDTA, ***HBS: Diluyente Hepes-glicose tamponado, ****NR: Não relatado.

A remoção do plasma seminal através de centrifugação em diluentes a base de leite desnatado melhora a estabilidade do sêmen fresco e resfriado, aumentando a resistência as alterações hiposmóticas e melhora na resposta a indução *in vitro* da reação acrossômica (Barrier-Battut *et al.*, 2013).

2.3.2. Seleção espermática

A subfertilidade observada em parte dos garanhões torna necessária a seleção de subpopulações de espermatozoides viáveis para o procedimento de inseminação artificial, resfriamento ou congelamento. Conforme visto anteriormente, a centrifugação permite remover o plasma seminal que pode ter efeitos deletérios no resfriamento. No entanto, somente a centrifugação e o Sperm filter® não permitem selecionar espermatozoides de alta qualidade para uso na reprodução.

As técnicas de separação espermática tem sido aplicadas em diversas espécies. Para fecundação *in vitro* em humanos foi usada a migração espermática (*swim-up*) (Wong *et al.*, 1986; Tanphaichitr *et al.*, 1987; Oehninger *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2004; Piomboni *et al.*, 2006), centrifugação por gradiente de densidade (Percoll®) (Kaneko *et al.*, 1986; Tanphaichitr *et al.*, 1988; Rhemrev *et al.*, 1989; Claassens *et al.*, 1996), e filtração em colunas filtrantes por gravidade – Glass Wool e Glass Wool-Sephadex (Johnson e Garvin, 1959; Paulson e Polakoski, 1977; Sherman, Paulson e Liu, 1981; Van Der Ven *et al.*, 1988; Rana *et al.*, 1989; Rhemrev *et al.*, 1989; Henkel *et al.*, 1994; Sanchez Sarmiento *et al.*, 1996; Sauer, Coulam e Jeyendran, 2012)

Em bovinos, as técnicas de *swim-up* e percoll são amplamente aplicadas e as vantagens e desvantagens bem descritas (Parrish, Krogenaes e Susko-Parrish, 1995). O gradiente de Percoll® se destaca-se como a técnica mais difundida na produção *in vitro* de embriões. O meio comercial é um preparado em diferentes densidades que seleciona os espermatozoides através da centrifugação, com uma taxa de recuperação espermática ao redor de 50%, ou seja, cinco a dez vezes maior que aquela obtida após uso do *swim-up*.

A seleção por gradiente de Percoll® em equinos permite selecionar espermatozoides viáveis, porém alguns problemas como aglutinação cabeça-cabeça de espermatozoides tem sido relatado (Sieme *et al.*, 2003), atribuído a interação entre espermatozoide equino e a sílica coloidal do gradiente (Mortimer, 1994).



Figura 2. Seringa preparada com lã de vidro para separação espermática de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira. Arquivo pessoal.

O uso do Percoll® associado à remoção do plasma seminal permite recuperar espermatozoides com maior motilidade para preservação do sêmen de garanhões a 4°C, mas não foi eficaz para selecionar esperma de acordo com a integridade e funcionalidade da membrana (Trein *et al.*, 2005). Estes mesmos autores concordam com estudos prévios que recuperaram aproximadamente 35% dos espermatozoides (Sieme *et al.*, 2003).

O uso de lã de vidro (Glass Wool; Figura 2) é aplicado a diversas espécies de forma similar ao *swim-up* e Percoll® para uso do sêmen em biotécnicas *in vitro*.

A separação de sêmen equino por colunas através de gravidade utilizando seringas com esferas de vidro foi objeto de estudo de Casey *et al.* (1993) e evidenciou que o volume máximo permitido para filtração é de 50 mL, indicando que o método possa a ser aplicado previamente à conservação do sêmen equino (Casey *et al.*, 1993).

As técnicas de *swim-up*, percoll®, lã de vidro e lã de vidro-sefadex foram aplicadas em sêmen equino por (Sieme *et al.*, 2003). Com auxílio de seringas de 5 mL os autores filtraram sêmen fresco selecionando desta forma espermatozoides com defeitos menores de cabeça e maior motilidade progressiva quando comparado à técnica do Percoll® e grupo controle (sêmen fresco não filtrado). No entanto, estes autores descrevem que com esta técnica houve baixa recuperação de células e o percentual de alterações de cauda não diferiu do grupo controle. Para sêmen destinado ao resfriamento e à criopreservação, os autores compararam apenas lã de

vidro-sefadex, centrifugação e Leucosorb com o grupo controle, verificando maior motilidade para lâ de vidro-sefadex e Leucosorb para sêmen refrigerado por 24h e criopreservado. No entanto, diferenças não foram detectadas após a inseminação de éguas.

Já em humanos, a técnica de lâ de vidro foi descrita como um método eficiente em remover leucócitos do sêmen de pacientes oligozoospermicos com leucocitospermia (Sanchez *et al.*, 1996). Em bovinos, a técnica de lâ de vidro selecionou espermatozoides congelados de bovinos com maior percentual de motilidade e integridade de membrana do que as técnicas de Sephadex e Percoll®, além de incrementar a produção de embriões *in vitro* (Lee *et al.*, 2009).

A separação utilizando a centrifugação com coloides (Single layer- Androcoll-E) vem sendo aplicada de forma rotineira na espécie equina (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2009; Bergqvist *et al.*, 2011; Morrell *et al.*, 2011). Diferentemente do Percoll®, que processa pequenos volumes de sêmen, a centrifugação pode ter boa aplicabilidade a campo em larga escala (Morrell *et al.*, 2009). Quando comparado com a centrifugação simples, o Androcoll-E apresentou ótimos resultados em selecionar população de espermatozoides com maior motilidade e integridade de membrana antes da criopreservação, logo resultou em maior sobrevivência após o descongelamento (Hoogewijs *et al.*, 2011).

Todavia, os métodos de separação espermática apresentados, tanto o Percoll® quanto a centrifugação com colóides (Androcoll-E) necessitam de equipamentos como a centrífuga, que nem sempre está disponível a campo. Desta forma, resulta em altíssimo custo por ejaculado processado. A filtração por lâ de vidro-sefadex e Leucosorb também necessitam de maior tempo para preparo e só podem ser aplicadas em ambiente laboratorial.

Já a lâ de vidro, pode ser uma excelente alternativa para uso na rotina de um haras, pois quando seja necessária a concentração espermática após o processamento, esta pode ser realizada com uso da técnica de Sperm Filter® e com custo bem inferior as demais técnicas. Em bovinos, Arzondo *et al.* (2012) afirmam que a técnica de filtração por lâ de vidro apresenta baixo custo, é simples e altamente eficaz procedimento para selecionar espermatozoides funcionalmente competentes para tecnologias reprodutivas. Estas vantagens podem ser úteis em outras espécies de animais domésticos e de criação, bem como para espécies em vias de extinção.

2.4. Avaliação microscópica do sêmen

2.4.1. Motilidade espermática

A motilidade espermática é o parâmetro mais frequentemente empregado para avaliar a qualidade do sêmen de garanhões, para estimar a viabilidade de espermatozoides no ejaculado e durante/após qualquer procedimento de manuseio e conservação, incluindo refrigeração e até mesmo criopreservação. Tradicionalmente, a motilidade dos espermatozoides no ejaculado do garanhão é avaliada por estimativa subjetiva da proporção de espermatozoides com motilidade retilínea progressiva, utilizando lâmina e lamínula aquecidas e um microscópio com fonte de luz. Os problemas inerentes a este método são a grande variação entre os observadores e entre laboratórios, bem como o baixo valor preditivo na avaliação do potencial fecundante de uma amostra de sêmen (Varner, 2008). A avaliação da motilidade espermática consiste na determinação da percentagem de espermatozoides totais com movimento em um ejaculado. Para se obter uma avaliação mais precisa pode-se avaliar apenas a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (Pickett, 1973).

Um dos principais métodos de avaliação de espermatozoides a fresco e após conservação é a motilidade. Constituindo-se assim um parâmetro importante na estimativa da viabilidade espermática (Pickett, Faulkner e Sutherland, 1970; Pickett *et al.*, 1975). Para a fecundação em condições fisiológicas, a motilidade é indispensável, pois sua perda resulta em lesão na função celular. No entanto, sua manutenção não significa que há integridade celular (Varner *et al.*, 1988; Bedford *et al.*, 1995; Kuisma *et al.*, 2006).

Para estimar a motilidade de forma objetiva alguns métodos já foram relatados na literatura. Dentre estes cita-se: fotomicrografia (Van Huffel *et al.*, 1985); a espectrofotometria (Jasko *et al.*, 1989), a videomicrografia (Varner, 1991), que pode ser visualizada na Figura 3 e a análise computadorizada (Amann e Pickett, 1987). Já o método subjetivo, no qual se realiza o exame visual utilizando microscópio de contraste de fase e platina aquecida, é aceitável, desde que realizado por examinador experiente (Varner, 1991).

As características seminais com melhor correlação ($P < 0,01$) com dados de fertilidade de garanhões Puro Sangue de Corrida e Standardbreed foram a avaliação subjetiva do percentual de espermatozoides com motilidade progressiva ($r = 0,46$) e móveis totais ($r = 0,40$), o percentual de espermatozoides morfológicamente normais ($r = 0,36$) e o percentual de espermatozoides progressivos estimados por análise computadorizada ($r = 0,34$) (Jasko *et al.*, 1992).

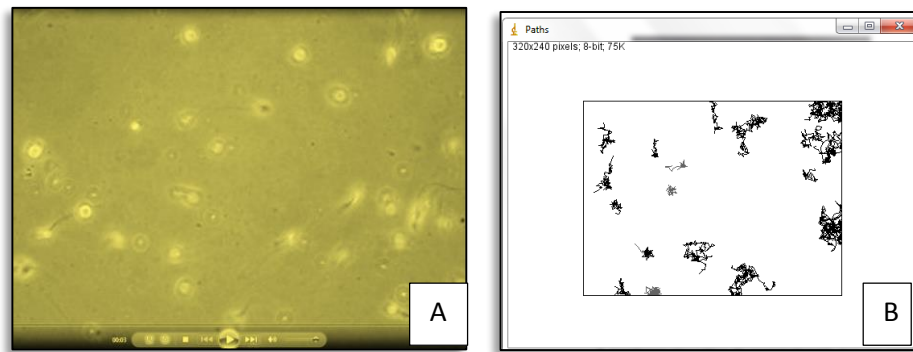


Figura 3. A) Imagem obtida após a separação espermiática com lâ de vidro do sêmen de garanhões pôneis da raça Brasileira auxiliada pela gravação de vídeo com o programa AmCap® em câmera de 5mp acoplada a um microscópio triocular em aumento de 400x. B) Imagem editada no programa Image J mostrando o deslocamento dos espermatozoides observados em A. Arquivo pessoal.

2.4.2. Teste de funcionalidade de membrana – Teste hiposmótico

O teste hiposmótico tem a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática em espermatozoides humanos (Jeyendran *et al.*, 1984). A membrana plasmática do espermatozoide tem por característica permitir o transporte de moléculas de forma seletiva, o qual provoca aumento de volume ou edema do espermatozoide, visível na cauda (Drevius, 1972). Assim, a capacidade da cauda espermiática enrolar na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando que a membrana está intacta (Drevius e Eriksson, 1966). Portanto, o enrolamento da cauda pode ser relacionado a funcionalidade da membrana da cabeça. Há correlação positiva entre caudas enroladas e penetração em oócitos de hamsters (Jeyendran *et al.*, 1984). Desta forma, a funcionalidade da membrana tem grande relevância e correlação positiva com a motilidade no sêmen humano, visto que a integridade de membrana também é importante no processo de capacitação espermiática (Check *et al.*, 1988; Barratt *et al.*, 1989; Check *et al.*, 1989; Coetzee *et al.*, 1989; Abu-Musa, Takahashi e Kitao, 1993).

A membrana plasmática tem vital importância em trocas metabólicas com o meio, logo o a avaliação da sua funcionalidade é adicionada aos parâmetros tradicionais do sêmen para determinar os índices de fertilidade de forma objetiva. Na espécie equina, devido as características individuais das células dos garanhões em suportar o resfriamento, o teste hiposmótico pode ser uma ferramenta de predição desta capacidade (Nie e Wenzel, 2001; Melo,

Henry e Beker, 2005), além de poder ser relacionada com a capacidade de preservação do espermatozoide equino refrigerado (Melo, Henry e Beker, 2005).

A técnica utilizada neste estudo é a técnica modificada que consiste na diluição do sêmen equino com água destilada na proporção de 1:3 (100mOsM/kg) (Lagares, Petzoldt, *et al.*, 2000). O diluente a base de leite ofereceu os melhores resultados, tanto da preservação da motilidade progressiva quanto da funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide durante as 72 horas de armazenamento a +5°C, bem como taxa de prenhez satisfatória, quando comparado aos demais diluentes avaliados (Tyrode, Kenney e Glicina) (Lagares, Meirelles, *et al.*, 2000). Além disso, o teste hiposmótico e a coloração de 6- CFDA parecem avaliar aspectos diferentes da membrana plasmática.

Todavia, como a redução da temperatura durante o processo de resfriamento altera a composição e estrutura da membrana plasmática do espermatozoide, a utilização conjunta do teste hiposmótico e de colorações como a 6-CFDA associada aos parâmetros convencionais de análise do sêmen é indicada como forma de se obter maiores informações sobre a preservação do sêmen resfriado equino e, conseqüentemente, aperfeiçoar a inseminação artificial, para que futuramente resultados semelhantes possam ser obtidos com o uso do sêmen congelado (Lagares, Meirelles, *et al.*, 2000).

Controvérsias ainda existem sobre a aplicação do teste hiposmótico por não haver nenhuma relação significativa com a fecundidade, mas uma tendência de relação entre o teste e o número ou serviços por prenhez (Neild *et al.*, 2000). (Kuisma *et al.*, 2006) afirmam que o teste não é adequado para a avaliação de sêmen após o descongelamento. No entanto, o teste hiposmótico continua sendo utilizado amplamente nas publicações mais recentes juntamente com outros testes para avaliar a qualidade do sêmen equino criopreservado *in vitro*, inclusive para sêmen do epidídimo criopreservado (Olaciregui *et al.*, 2014).

No teste hiposmótico são incubados espermatozoides sob condições hiposmóticas. O transporte de água para a célula ocorrerá quando a membrana for funcional, mostrando a cauda em forma de anel ou enrolada (edema). Isso ocorre porque a membrana ao redor da cauda é bastante permeável, permitindo a entrada de água que irá causar a distensão (ballooning) desta membrana (Figura 4).

2.4.3. Integridade de membrana

Colorações fluorescentes têm sido usadas para avaliar a integridade plasmática por microscopia. Dentre estas podemos se destacam a combinação de diacetado de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP). A utilização de CFDA e IP foi descrita em conjunto ou separadamente para avaliar a integridade de membrana de espermatozoides suínos, bovinos, caninos, equinos, camundongos e humanos (Garner *et al.*, 1986).

A técnica de fluorescência utiliza a associação de dois fluorocromos. O IP atravessa a membrana plasmática lesada, ligando-se ao DNA da célula, corando as de vermelho (Figura 5). Já o CFDA penetra através da membrana íntegra e é hidrolisado por esterases não específicas, que produz carboxifluoresceína livre, que fica retida por mais tempo dentro da célula que se cora de verde (Brito *et al.*, 2003).

A necessidade de execução imediata da leitura após a aplicação do corante, pela perda de cor pelos compostos fluorescentes é atribuída como uma desvantagem da técnica (Johnson *et al.*, 1995; Love *et al.*, 2003).

Embora os testes laboratoriais de integridade de membrana não sejam aplicados de forma rotineira para avaliação do sêmen de garanhões, há relação com a fertilidade. Pois, Kuisma *et al.* (2006), observaram uma relação entre os testes de integridade de membrana plasmática e maiores taxas de nascimento de potros.

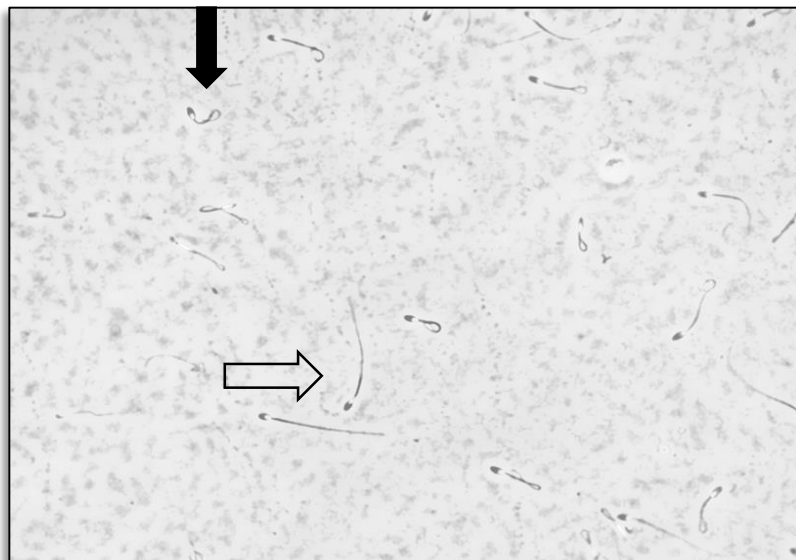


Figura 4: Imagem obtida durante a execução do teste hiposmótico realizado durante o estudo de separação espermática por lã de vidro no sêmen de um garanhão da raça pônei brasileira. Na seta preta há um espermatozoide que reagiu ao teste hiposmótico apresentando enrolamento da cauda. A seta vazada aponta para um espermatozoide com membrana lesada que não reagiu ao teste hiposmótico, mantendo a cauda reta. Aumento de 400x- Microscópio Olympus BX 40. Arquivo pessoal.

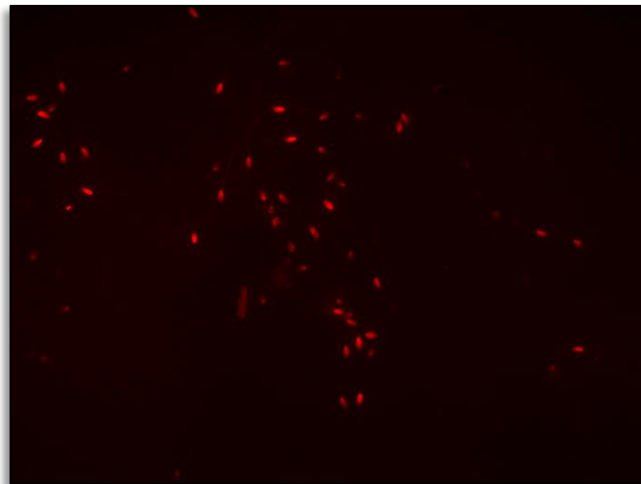


Figura 5. Espermatozoides de garanhão pônei da raça brasileira com membrana lesada corados com iodeto de propídio e visualizados na microscopia de epifluorescência. Arquivo pessoal.

2.4.4. Morfologia espermática

A forma do espermatozoide pode sofrer alterações durante os estágios de sua formação (espermacitogênese e/ou espermiogênese), ou até mesmo durante a maturação e transporte.

Assim como outros métodos, somente a avaliação morfológica dos espermatozoides pode não indicar o potencial de fecundação de um ejaculado, mas pode indicar se há baixo será baixo quando há elevado percentual de anormalidades (Dott, 1975). A avaliação morfológica também é um método subjetivo e depende experiência, proficiência e treinamento do examinador (Brito *et al.*, 2011).

O primeiro passo para avaliar a morfologia espermática do garanhão é remover o gel do ejaculado, porque o gel interfere na visualização do espermatozoide. Outro ponto importante é que a morfologia do esperma deve sempre ser avaliada sob aumento de 1000x em imersão ou superior (Brito, 2007). A morfologia pode ser avaliada por exame de diluições de sêmen em formol-salina tamponada na proporção de 1:4 em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase. A morfologia também pode ser avaliada por esfregaços corados e vários métodos de coloração têm sido usados para este propósito (Brito, 2007).

A classificação para defeitos de espermatozoides proposta para os touros foi adaptada por alguns autores para garanhões (Jasko, 1992; Veeramachaneni, Moeller e Sawyer, 2006). Em um sistema de classificação em que os defeitos espermáticos são classificados de acordo com a sua origem assume-se que os defeitos espermáticos primários possam ter ocorrido durante a espermatogênese e que os defeitos secundários tenham ocorrido durante o trânsito.

As principais limitações desta classificação é a origem desconhecida de alguns defeitos espermáticos e o fato de que defeitos primários não são necessariamente mais prejudiciais à fecundação do que defeitos secundários. O que ocorre comumente é a má interpretação deste sistema (Brito, 2007).

Outra classificação para os defeitos espermáticos é a de defeitos maiores e menores de acordo com os efeitos percebidos sobre a fecundação. Obviamente, este sistema de classificação pode ser usado somente quando há um banco considerável de dados que descrevem os efeitos de defeitos espermáticos específicos sobre a fertilidade, o que não é o caso em ganhões.

Além disso, este sistema de classificação teria que ser revisto periodicamente para incorporar os conhecimentos adquiridos com novas pesquisas e isso não ocorreu em touros (Brito, 2007). Outra desvantagem dos sistemas de classificação é que os veterinários tendem a avaliar o espermograma como um caso simples de matemática, listando o percentual de cada defeito, agrupando os defeitos em categorias adequadas e determinando se o animal deve ser considerado com potencial reprodutivo satisfatório.

Atualmente, a sociedade de Teriogenologia criou normas para avaliação morfológica do ejaculado de ganhões classificando os espermatozoides nas seguintes categorias: espermatozoide normal, região acrossomal anormal/cabeça, cabeça solta, gotas proximal e distal, peça intermediária anormal e cauda enrolada/dobrada. A presença de outras células (células germinativas, leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, etc.) também deve ser indicada (Brito, 2007). Notoriamente, os defeitos específicos de espermatozoides em diferentes regiões também devem ser enumerados como acrossomos destacados, microcefalia, macrocefalia, subdesenvolvido, piriforme, afilado, formações vacuolares, cabeças múltiplas, defeitos de peça intermediária, aplasia segmentar da bainha mitocondrial e formato em saca-rolhas.

Para avaliação da morfologia pode-se preparar o esfregaço e efetuar coloração de Cerovsky (KRAUSE, 1966) ou coloração supra-vital (eosina/nigrosina, Figura 6) (Brito, 2007).



Figura 6: Coloração supra vital (eosina/nigrosina) em esfregaço do ejaculado de um garanhão da raça pônei Brasileira submetido à separação espermática por lã de vidro. Aumento de 400x- Microscópio Olympus BX 40. Arquivo pessoal.

A morfologia espermática pode variar consideravelmente durante a estação reprodutiva e avaliações de rotina (a cada 15-30 dias) devem ser realizadas para determinar a morfologia espermática no garanhão (Chenoweth, 2005). Existe também uma grande variação na morfologia espermática entre reprodutores (Dowsett, Osborne e Pattie, 1984), mas em geral garanhões com desempenho mediano apresentam no mínimo 50% dos espermatozoides intactos/normais (Card, 2005).

As características seminais desejáveis do ejaculado de garanhões coletados com vagina artificial recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) deve conter no mínimo 70% de células normais e como particularidade a implantação abaxial da cauda não é considerada uma anormalidade espermática na espécie equina (CBRA, 2013).

2.4.5. Viabilidade mitocondrial

As proteínas específicas da membrana plasmática permitem a livre movimentação dos componentes celulares, bem como o transporte de substratos como a glicose e frutose para o interior da célula espermática. Estes compostos são utilizados como fonte de energia para manter as funções metabólicas (Schurmann *et al.*, 2002).

Portanto, a produção de energia, essencial no movimento flagelar dos espermatozoides é fornecida pela respiração mitocondrial e da glicólise em forma de adenosina trifosfato (ATP), que é quebrada pela adenosina trifosfatase durante o metabolismo aeróbico (Mukai e Okuno, 2004). É na peça intermediária do espermatozoide que ocorre a produção de energia pois, a mesma contém um arranjo helicoidal de mitocôndrias, que gera a energia usada para o movimento flagelar. Considera-se de extrema importância a integridade mitocondrial no fornecimento de energia para a locomoção espermática em meio viscoso (Windsor, 1997).

A viabilidade mitocondrial é avaliada em espermatozoides equinos através do Teste do MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Aziz, Ahlswede e Enbergs, 2005). O MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difenil-brometo) é um sal tetrazólio amarelo solúvel em água. Em mitocôndrias ativas, o sistema de succinato desidrogenase converte o corante em uma forma insolúvel em água, por meio da clivagem redutora do seu anel de tetrazólio, formando o cristal de formazan, de coloração púrpura (Figura 6) (Nasr-Esfahani *et al.*, 2002). Assim, a quantidade de formazan formada pode ser determinada por espectrofotometria e serve como uma estimativa do número de mitocôndrias e, portanto, o número de células vivas na amostra (Aziz, Ahlswede e Enbergs, 2005; Aziz, 2006).

A habilidade celular em reduzir os sais de tetrazólio está diretamente relacionada à atividade mitocondrial. O espermatozoide é uma célula rica em mitocôndrias, com isso a redução ocorre rapidamente (Nasr-Esfahani *et al.*, 2002).

O teste de MTT é simples, de baixo custo e tem alta correlação com o potencial mitocondrial dos espermatozoides de garanhões. Além disso, o tempo dispendido para execução é rápido, pois várias amostras de sêmen equino podem ser analisadas ao mesmo tempo. Por estas vantagens, o teste é uma técnica para análise de rotina (Aziz, Ahlswede e Enbergs, 2005).

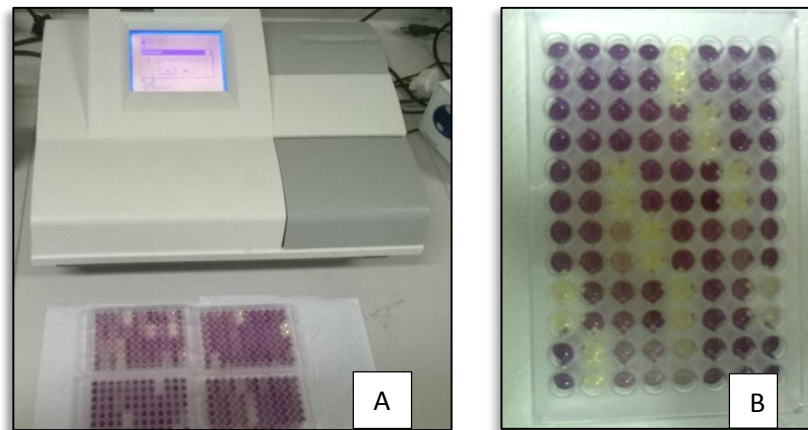


Figura 7. A) Microplacas de microtitulação de 96 poços com amostras de sêmen de garanhões durante o estudo de separação espermática por lâ de vidro para leitura de absorvância em leitor de Elisa de microplacas MR-96A (à esquerda). B) Amostras em cor púrpura (reação +) e amostras em cor amarelo (sem reação). Arquivo pessoal.

2.5. Taxa de resfriamento do sêmen equino e diluente

O armazenamento e o transporte de sêmen equino com material congelado ou refrigerado permitem direcionar os acasalamentos por meio da utilização de garanhões geneticamente superiores que, na maioria das vezes, ficam alojados nas centrais de reprodução. O uso do sêmen congelado em crescente expansão ainda apresenta questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as inseminações, maior custo por prenhez, além da grande oscilação das taxas de prenhez em relação às obtidas com monta natural ou IA com sêmen fresco ou refrigerado (Backman *et al.*, 2004; Nunes, Zúccari e Costa E Silva, 2006; Nunes *et al.*, 2008). Desta forma, diversos fatores contribuem amplamente para a IA com sêmen refrigerado ter apresentado grande expansão nas últimas décadas, e também como premissa à liberação do uso da biotécnica por diversas associações de raça, pois muitos criadores evitam deslocar as éguas até o local onde se encontram os garanhões.

O resfriamento do sêmen para sua preservação tem por objetivo diminuir o metabolismo celular, pois à temperatura corporal, o metabolismo espermático é alto e, a cada 10° C de sua queda, este se reduz em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5° C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38° C. Desta forma, a refrigeração reduz o catabolismo espermático, o que é

necessário para a preservação do ejaculado por longos períodos (Squires *et al.*, 1999). Os danos provocados pelo frio são decorrentes de danos estruturais diretos com ruptura das membranas e estrutura celular ou indireto, alterando as funções celulares (Squires *et al.*, 1999).

Portanto, as modificações na organização do mosaico fluído da membrana que podem ser descritas como assimetrias na bicamada lipídica e sua interação com proteínas provocam alterações de função e permeabilidade, prejudicando diretamente a permeabilidade, regulação osmótica, funções metabólicas e conseqüentemente diminuindo a motilidade e capacidade de fecundação (Amann e Graham, 1993). Desta forma, a taxa de resfriamento tem extrema importância durante o processo, sendo que taxas menores minimizam os efeitos do choque térmico (Amann e Graham, 1993).

A determinação da curva de resfriamento deve levar em consideração que, quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais lenta deve ser a taxa de resfriamento para garantir a qualidade e sobrevivência espermática (Pickett, 1993). Curvas rápidas podem provocar danos irreversíveis a estrutura do espermatozoide (Watson, 1981). Portanto, taxas de resfriamento de 1° C por minuto (rápidas) seriam mais prejudiciais do que a 0,3° C/minuto (lentas).

Curvas de refrigeração mais lentas ($-0,24^{\circ} \pm 0,042^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) durante os primeiros 15 minutos proporcionam melhor motilidade quando comparadas à curvas mais rápidas ($-1,091 \pm 0,003^{\circ} \text{C}/\text{min}$; $P < 0,05$). O índice de prenhez obtido com sêmen refrigerado a 4°C por 24 horas foi 58,6% (Varner *et al.*, 1989).

Parece haver consenso sobre a necessidade do uso de refrigeração lenta, não superior a $-0,05^{\circ} \text{C}/\text{min}$, entre 19 e 8° C, pois esta é a fase crítica para ocorrência de lesões nas membranas espermáticas (Kayser *et al.*, 1992; Amann e Graham, 1993; Squires *et al.*, 1999).

Quanto ao tempo de armazenamento e temperatura final que possuem efeito sobre as características de fecundantes do espermatozoide há dados conflitantes na literatura. O efeito de quatro temperaturas sobre a motilidade espermática, durante 36 horas de armazenamento o sêmen estocado a 20°C e 15° C apresentou motilidade superior do que a 10° C ou 5° C ($P < 0,05$), sendo de 72% e 55% para o sêmen conservado a 15° C e 5° C, respectivamente (Province *et al.*, 1985). Já a manutenção do sêmen entre 4° C e 5° C por 24 horas resultou em maior motilidade espermática que entre 20° C a 25° C, com 73% de prenhez em ambas as faixas de temperatura (Varner *et al.*, 1989).

A temperatura de 5° C preservou melhor a integridade da cromatina espermática, de 7 até 46 horas de armazenamento do sêmen, quando comparada à temperatura de 20° C (Rigby *et al.*, 2001). A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da

peroxidação lipídica, não acusou aumento desta substância durante a estocagem do sêmen equino a 5° C por 24 horas, concluindo que a peroxidação lipídica não aumentava, substancialmente, durante o armazenamento do sêmen nestas condições, conferindo assim, maior longevidade (Kankofer *et al.*, 2005).

A conservação da viabilidade espermática por pelo menos 24-36 horas é importante, pois este é, na maioria das vezes, o tempo necessário para que as amostras de sêmen dos garanhões sejam transportadas e recebidas pelos haras para uso na inseminação artificial. Já o armazenamento do sêmen equino refrigerado por longos períodos pode comprometer a fecundação.

A qualidade dos diluentes também é um fator relevante para se obter êxito durante o processo de armazenamento do sêmen equino refrigerado. Os diluentes são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições desfavoráveis e prolongar sua sobrevivência durante a refrigeração e o transporte, além de apresentarem a vantagem de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na análise do sêmen (Bielanski, 1975; Kenney *et al.*, 1975). Para avaliar a qualidade do diluente devem ser aferidas a pressão osmótica e o pH, sendo que estes devem apresentar valores entre 300 a 350 mOsm e 7,2 a 7,7 (McCue, 2014).

Uma característica importante dos diluentes para preservação do sêmen refrigerado é sua capacidade de estabilizar as membranas espermáticas durante a fase de transição, momento no qual ocorrem as maiores lesões celulares. Assim, para minimizar os danos causados pelo choque térmico, uma variedade de componentes /substâncias pode ser adicionada ao diluente (Kenney, Bergman e Cooper, 1975).

3- ARTIGO 1

Artigo submetido a revista ANDROLOGIA: AND 16-321

Response to cooling of pony stallion semen selected by glass wool filtration

Gilson Antonio Pessoa^{1 2}, Ana Paula Martini², Janislene Mach Trentin^{1 2}, Thaina Minella², Mariani Farias Fiorenza^{1 2}, Mara Iolanda Batistella Rubin²

¹ Graduate Program in Veterinary Medicine: equine – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)- Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre/RS, Brazil, CEP 91540-000.

² Embryolab - Laboratory of Animal Embryology, Department of Large Animals-Universidade Federal Santa Maria (UFSM), Veterinary Hospital, Room 429, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria/RS, Brazil

*Corresponding authors: Phone: 55 55 3220-8501

E-mail: gilsonpessoavet@yahoo.com.br (GA Pessoa)

Abstract

This study's aim was to compare the sperm separation technique using filtration through glass wool comparing with just diluted cooled semen. Eighteen ejaculate were collected from each of 6 pony stallions of the Brazilian pony breed. Were evaluated pH, osmolarity, total motility, membrane functionality (HOST), membrane integrity (CFDA / PI), morphology and mitochondrial viability (MTT) in fresh and 24 and 48 hours of cooled semen at 5° C. After dilution, the middle of the extended semen was cooled (control group). The other half was cooled after filtration through glass wool (filtered group). Total motility from the control, filtered and retained groups after 24h of cooling was 35.5, 43.3 and 10% ($P < .0001$), respectively. Sperm membrane integrity percentage at the CFDA/PI test was 37.9, 44.8 and 14.8% ($P < .0001$), on the control, filtered and retained group, respectively. The results confirmed that the passage of sperm through glass wool increased the selection of sperm from ponies stallions with higher motility, mitochondrial viability and membrane integrity for cooling in milk extender up to 24h. Moreover, it was not obtained higher sperm parameters to control after cooling 48 hours under the conditions that the study was conducted.

Keywords: stallion, pony, glass wool, sperm selection, sperm cooling.

1. Introduction

Artificial insemination with fresh, chilled or frozen-thawed semen is most commonly used in equine breeding industry (Aurich and Aurich, 2006). Cooled stallion semen is widely used as it always transports the genetic material for periods up to 48 hours, is more practical and has lower costs to the horse breeder. Cooled semen has been widely used in different horse breeds (Deichsel, et al., 2016, Morrell, et al., 2014, Roach, et al., 2016, Shore, et al., 1998).

Some breeds, such as the Brazilian pony (< 96cm in height) may have reduced daily sperm production due to low body weight and small testicular size (Neves, et al., 2006). Additionally miniature stallions have a low number of normal sperm (Paccamonti, et al., 1999).

Separation techniques like to improve sperm quality of stallions semen by selecting the most viable sperm cells, for example the swim-up, Percoll, single layer centrifugation, wool-sephadex glass and Leucosorb (Casey, et al., 1993, Heutelbeck, et al., 2015, Morato, et al., 2013); however, most of these are applied to fresh or frozen semen, using small volumes of semen for processing.

In humans, the decrease of sperm mitochondrial activity may lead to increase reactive oxygen species (ROS) production (Wang, et al., 2003). These events cause changes in all cellular components, and may lead to cell death by apoptosis or necrosis. The increase of dead cells and ROS production causes decreased motility in the remaining cells and further reduction these parameters after cooling or thawing period (Agarwal, et al., 2003, Aziz, et al., 2003, Gibb and Aitken, 2016, Sharma, et al., 1999, Yeste, et al., 2015).

In the equine species, in specially pony stallions, those techniques might be of interest for that will be separating motile from immotile spermatozoa and special ejaculates cooled at 5 °C. Although, higher motility was not associated with improved fertility rates, studies have shown that the use of techniques to select mobile spermatozoa without morphological alterations increase the conception rate per cycle of the inseminated mares (Samper, et al., 1991).

We tested the hypothesis that using of glass wool as a pony stallion sperm filter will improve motility, mitochondrial activity and sperm viability. In the present study, the objective was to analyze the seminal parameters (motility, mitochondrial activity, membrane integrity and sperm viability) of diluted cooled pony stallion sperm separated by glass wool and cooled during 48h at 5°C.

2- Material and Methods

2.1. Stallions and semen collection

The study was performed during the springer of 2014, the breeding season in the southern hemisphere. At the beginning of the study were selected 8 stallions, but two stallions had to be withdrawn from the study by health disorders. A group of 6 miniature stallions of the Brazilian pony breed, aged 9 to 13 years as fed once a daily with oats and alfalfa, water *at libitum*. Animals were located in a paddock and kept under the same management conditions. After stabilization of extra gonadal sperm reserves through regular depletion, the ejaculate collection of all stallions was performed routinely twice weekly with an artificial vagina (Hannover Model; Minitube, Tiefenbach, Germany). Pony females served as phantom. Three ejaculates were obtained from each stallion. Sterile gauze filtration sets were used in the collection devices, and the gel-free semen was evaluated for regarding color, appearance, volume, sperm concentration and percentage of progressive motile spermatozoa.

2.2. Semen evaluation

The percentage of spermatozoa was estimated using a phase contrast microscope (Olympus BX 40; Olympus Optical Ltda, Brazil) with stage heater (Neovet, Brazil). A 5.0 mega pixel digital color camera with software was used image capture and analysis (CHAMPION, Santa Lydia-São Paulo, Brazil). All samples had 30-seconds recorded to perform the assessment of the progressive motility. Two experienced technicians evaluated the recorded videos without knowing the treatments.

Sperm concentration was evaluated using a haemocytometer. The hemocytometer was prepared twice per sample. Mean values of sperm concentration were multiplied by the volume

of diluted semen. Thus, it was established working dilution (1:2) using skim milk extender (KENNEY, 1975) for treatments and control group.

Sperm cell morphology was evaluated using Spermac® stain (Minitube, Brazil). For each sample Two slides were prepared from each sample and 200 cells were counted using phase contrast microscope (x1000) regardless of morphology sperm.

The membrane function was evaluated by the hypo-osmotic swelling test (HOST). The HOST was performed using a 1:2 dilution (semen:destiled water), so that osmolarity was about 100mOsm / kg H₂O⁻¹. Samples were incubated at 37°C for 8 minutes according to protocol adjusted for horses (Lagares, et al., 2000). Subsequently, they went put as with coverglass and slides was evaluated with phase contrast microscope (400x) counting 100 sperm cells. The functional sperm membrane are those that suffer a tail winding.

Fluorescent technique was assessed using a 6-carboxyfluorescein diacetate (C5041, Sigma-Aldrich) and propidium iodide (P4170, Sigma-Aldrich) (CFDA/PI) for evaluated sperm viability. Staining media for CFDA/PI was prepared within 1 h prior to use using 20 µL of formaldehyde stock solution (2.5 mg/mL in water), 20 µL of CFDA stock solution (0.5 mg/mL in DMSO, D2650, Sigma-Aldrich) and 20 µL of PI stock solution (0.5 mg PI in 1 mL of 0.9% NaCl solution). The CFDA/PI staining was carried using with 100 µL of semen and 300 µL of staining media at 37°C for 15 min in the dark. A 5 µL aliquot this suspension was placed on a slide covered with coverslip. Random fields were observed under a fluorescence microscope (x400) and 200 spermatozoa were counted. Staining with CFDA was assessed using a B-2A filter (blue excitation range, with a 450~490 nm excitation filter; NOVA 606, Brazil), while staining with PI was assessed using a green excitation range, with a 510~560 nm excitation filter. Sperm showing partial or complete red fluorescence (PI staining) was considered membrane damaged, while sperm with complete green fluorescence were considered membrane-intact.

The metabolic tetrazolium reduction assay (MTT) is based on the ability of metabolically active cells to reduce the tetrazolium salt (3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to formazan (Aziz, et al., 2005). MTT is a yellow salt, that is reduced to formazan by dehydrogenases of metabolically active cells and forms insoluble purple colored crystals in water. These crystals can be solubilized with organic solvents. Intensity of the purple color is measured by spectrophotometry and shows the direct relationship between the amount of living metabolically active cells in the samples. To assess mitochondrial activity, a sample of each treatment at all evaluations times was centrifuged at 600x g for 10 min to adjust the concentration to 100×10^6 spermatozoa/mL. Each pellet was re-suspended in the respective extender, and the supernatant discarded. Two aliquots of 200 μ L containing 100×10^6 spz/mL were deposited in 2 mL micro centrifuge tubes. Tetrazolium solution, 20 μ L (5mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide - M2128, Sigma-Aldrich) in saline PBS was added to these tubes, and they were incubated for 30 min in a water bath at 37°C. The micro centrifuge tubes were centrifuged at 12.000 x g for 5 min after addition of 200 μ L of a 0.04N HCl-isopropanol solution. The supernatant was used to measure the mitochondrial metabolic activity by UV visible spectrophotometry with a wave length of 540 nm. The reference sample used (white) was the skim milk extender solution with glucose, tetrazolium and 0.04N HCl-isopropanol. Aliquots of each stallion were analyzed in triplicate.

The pH was determined (pH Meter Tec-2, Tecnal) on fresh diluted semen, 24 h and 48 h after cooling. The osmolality was measured using a microosmometer (Knauer, Germany).

2.3. Semen processing

2.3.1. Glass wool filtration

The glass wool column was prepared in a sterile 10mL syringe without rubber plunger. For this purpose, 700 mg of glass wool (Sigma-Aldrich, S 20411) was placed in the syringe,

and subsequently the piston was compressed until it remained up to 1 cc mark. These after, the syringe was washed with 50 mL of ultra pure water, packaged for subsequent steam sterilization and drying. Prior to use, 10 mL of extender were passed by gravity and then discarded. All syringes were checked before use if the wool column remained compressed. Columns that were not compressed were not used.

2.3.2. Preparation of treatments

Immediately after having separated the gel fraction of the ejaculated determined semen concentration dilution was carried out. The concentration was adjusted to 50×10^6 sperm / mL, maintaining the room temperature controlled in the laboratory until the end of all experimental process (lasting 40 minutes). Cell concentration was adjusted for all groups before cooling.

After dilution (1:1), the ejaculate was split equally in two parts. One half was allocated to the “Control group” and the other one was filtered.

The syringe with the glass wool column was disposed vertically over a beaker. The volume to be filtered was passed by gravity through the glass wool column. Filtering was considered complete by the time when the glass wool syringe stopped dripping. After filtration (3-10min) this group was called Filtered Semen group. The glass wool column was removed from the syringe, and rinsed with 10 ml of extender to remove the retained sperm cells. And this was denominated group Retained semen.

Subsequently, was adjusted concentration and samples taken in duplicate to estimate motility, HOST, MTT, CFDA/PI, pH, osmolarity, and morphology. The three groups (diluted, filtered and retained) were placed in sealed centrifuge tubes and stored at + 5° C for 48 h. Duplicated samples were always taken to evaluate motility, HOS, MTT, CFDA/PI and pH after 24 h and 48 h of cooling.

2.4. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using SAS® 9.3 statistical analysis software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Groups and stallions were included in the model as a random effect. The variable data of progressive motile sperm (0, 24 and 48 h), percentage of sperm with tails reacted to HOST (0, 24, and 48 h), mean absorbance of MTT test (0, 24, and 48 h). Percentage of intact cells and defects were observed to normal distribution and analyzed using the procedure GLIMMIX, fitted to the normal distribution. Least square means \pm standard error describes the response variable. Results P value $< .05$ was considered statistically significant. Graphs were achieved using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.5. Animal use

The committee of ethics in animal experimentation from the Federal University of Santa Maria approved all procedures performed in these experiments according to protocol number 094/2013 according the original project Sperm separation techniques applied to equine semen prior to cooling and cryopreservation”.

3. Results

Ejaculate parameters

Eighteen ejaculates from 6 stallions were used in this study. Results are presented on Table 1. Stallions showed different mean volume (ml) of ejaculates without the gel fraction ($P = 0.005$), and sperm cell concentration ($P < 0.0001$). Progressive motility was highest on stallion number 8 and lowest on stallion number 1 (lowest) ($P = 0.02$). On sperm morphology analyze. Stallion 7 and 8 showed higher number of normal sperm cells the remaining ponies ($P = 0.001$).

Filtration process

After ejaculate filtration, stallions with progressive motility was less than 60%, had higher percentage of cells ($P = 0.01$) retained after filtration (Table 1). An inverse relationship ($r = -0.663$) was observed between the percentage of retained spermatozoa and percentage of sperm with normal morphology in the ejaculate, with 44.0% of the variations found in retained sperm are explained by the variation in sperm quality ($r=0.440$) (Figure 1).

Sperm parameters

The osmolality for control, retained and filtered groups, were 259.4, 258.06 and 257.22, respectively ($P = 0.745$). pH was kept within the filtration process. However, less variation was observed between 24 and 48h of cooling on filtered group (Figure 2).

The filtration process increased the percentage of normal cells by 11.7% (control: 70.02 ± 2.1 vs filtered: 90.7 ± 1.1). The tail defect accounted for the highest percentage of sperm with defects in the retained group (Table 3).

The motility was greatest in filtered sperm cell group being higher fresh and often 24 h ($P < 0.001$) cooling at 48 hours ($P = 0.002$). The percentage of sperm with intact membrane represented by HOST was higher in the filtered group than the control group fresh and 24h often cooling ($P < 0.0001$). In addition, the retained sperm cell group demonstrated lowest percentage of sperm with functionality membrane by HOST (Table 2).

The MTT assay showed major mitochondrial activity in the filtered group as well fresh as after 24h cooling (0.930 and 0.730nm) than the control group (0.772 and 0.526nm) ($P=0,0048$). However, after 48h hours of cooling no differences were observed between control and filtered groups ($P=0.1264$) (Table 2). The CFDA/PI indicated higher numbers of sperm

cells with membrane integrity in the filtered group fresh ($P < 0.0001$) and 24h cooling ($P = 0.0024$) than in the control group (70.0 and 44.8% vs 59.4 and 37.9%).

4. Discussion

Seminal parameters found in pony stallions of the Brazilian breed are in accordance with the ones already reported in other studies, (Neves, Bustamante, Trein, Malschitzky, Jobim and Mattos, 2006), were lower volume and concentration is observed when compared with non-pony stallions (Sieme, et al., 2004). This study applying glass wool as semen selection method was able to sort sperm cells that had tail changes. This was observed by increased motility after filtration. The use of semen selection with glass wool in pony stallions for cooling to 5° C was effective in increasing the motility of the fresh and cold semen during 24h. These results were further confirmed by *in vitro* tests (HOST / CFD MTT and PI) the sperm with increased mitochondrial membrane integrity and viability of fresh and 24 hours cooled after glass wool sorting.

The increase in motility was also demonstrated in prior studies and attributed the poor of sperm elimination quality (Sieme, et al., 2003). This study also observed that the retained sperm cells had higher tail abnormalities than the filtrate or control. The selection of spermatozoa in humans by glass wool filtration was efficient in selecting sperm with higher motility, as well as, being simple and low cost (Engel, et al., 2001). These results corroborate previous studies in humans (Larson, et al., 1999) that determined that the glass wool filtration by gravity of was efficient in separating spermatozoa with greater integrity of chromatin, motility and viability of the gradient centrifugation dual density layer.

The use of glass wool has also been described with frozen semen beef bulls (Arzondo, et al., 2012). In bulls it was described as a quick, simple technique, of low cost and highly effective in isolating sperm cells with the possibility of enriching the population of available

and viable sperm cells. Then, glass wool shows to be a useful tool for use in assisted reproductive technologies.

This study found that the ejaculates selected by with glass wool filtration which sperm evaluated 24 hours after cooling initiation had higher ability of mitochondrial reductase activity in living cells to cleave the tetrazolium yellow salt (permeable membrane) to form blue formazan crystals / purple by metabolically active cells. The MTT assay is a reliable colorimetric assay for assessing sperm viability and mitochondrial activity in horses (Aziz, Ahlswede and Enbergs, 2005).

The use of a higher percentage of living cells and lower volume during insemination is of great value increase the conception rate per cycle. These results have been obtained by performing deep insemination in the uterine horn after sperm selection by filtering through glass wool / sephadex (Nie, et al., 2003). Stallions as the Brazilian pony breed that produce ejaculates with low volume, low motility and a high number of cells with tail abnormalities, may have ejaculates subjected to glass wool filtration. Additionally, if the goal is keeping semen refrigerated for transportation, allowing cooling of greater number of viable cells.

The results found in the presente study show that using of glass wool improves semen quality. However, the fertility of this approach was not proved. Studies should be performed to evaluate the reproductive results of semen after the glass wool filtration on mares. For example, the effect of glass wool residuum on reproductive tract it has not been studied.

5. Conclusion

The results of this study indicate that the semen of pony stallions of Brasilian breed separated through glass wool filtration showed greater *in vitro* viability during cooling at 5° C for 24 h. The use of glass wool also allowed selecting higher percentage of viable cells with greater mitochondrial and functional membrane. In addition, its use should be encouraged because of

its easy access, excellent response to select viable sperm pre preservation of equine semen and low cost.

Acknowledgments: CAPES/FAPERGS by the author scholarship.

References

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-843.
- Arzondo MM, Caballero JN, Marin-Briggiler CI, Dalvit G, Cetica PD, Vazquez-Levin MH. Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. *Theriogenology*. 2012;78:201-9.
- Aurich J, Aurich C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reprod Domest Anim*. 2006;41:275-9.
- Aziz DM, Ahlswede L, Enbergs H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*. 2005;64:1350-6.
- Aziz N, Lewis-Jones DI, Agarwal A, Saleh RA, Sharma RK, Thomas AJ. Sperm morphology and seminal leukocytes as predictors of increased production of Reactive Oxygen Species (ROS) in infertile men semen. *Fertil Steril*. 2003;80:S247-S248.
- Casey PJ, Robertson KR, Liu IK, Espinoza SB, Drobnis EZ. Column separation of motile sperm from stallion semen. *J Androl*. 1993;14:142-8.
- Deichsel K, Schrammel N, Aurich J, Aurich C. Effects of a long-day light programme on the motility and membrane integrity of cooled-stored and cryopreserved semen in Shetland pony stallions. *Animal Reproduction Science*. 2016;167:68-73.
- Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidl B, Wiehe W, Sperl J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrologia*. 2001;33:223-30.
- Gibb Z, Aitken RJ. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *Biomed Research International*. 2016.
- Heutelbeck A, Oldenhof H, Rohn K, Martinsson G, Morrell JM, Sieme H. Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: perform sperm selection directly after collection or after storage? *Reprod Domest Anim*. 2015;50:76-83.
- KENNEY RMB, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. . Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary finding. ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 21, 1975, San Antonio AnaisLexington: American of Equine Practitioner. 1975;21:10.

- Lagares MA, Petzoldt R, Sieme H, Klug E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*. 2000;32:163-7.
- Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod*. 1999;14:2015-9.
- Morato R, Soares JM, Orero G, Mogas T, Miro J. Pre-selection by double layer density gradient centrifugation improves the fertilising capacity of frozen-thawed, capacitated stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 2013;139:62-8.
- Morrell JM, Richter J, Martinsson G, Stuhmann G, Hoogewijs M, Roels K, Dalin AM. Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without single layer centrifugation. *Theriogenology*. 2014;82:1102-5.
- Neves AP, Bustamante IC, Trein CR, Malschitzky E, Jobim MIM, Mattos RC. Reproductive parameters and sperm freezability of stallions of the Brazilian pony breed. *Animal Reproduction Science*. 2006;94:67-69.
- Nie GJ, Johnson KE, Wenzel JG. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. *Animal Reproduction Science*. 2003;79:103-9.
- Paccamonti DL, Buiten AV, Parlevliet JM, Colenbrander B. Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*. 1999;51:1343-9.
- Roach J, Schnobrich M, Ellerbrock R, Feijo L, Bradecamp E, Alvarenga MA, Kline K, Canisso I. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. *Vet Rec*. 2016;178:241.
- Samper JC, Hellander JC, Crabo BG. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991;44:107-14.
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species - total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*. 1999;14:2801-2807.
- Shore MD, Macpherson ML, Combes GB, Varner DD, Blanchard TL. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology*. 1998;50:693-8.
- Sieme H, Katila T, Klug E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*. 2004;61:769-84.
- Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, Klug E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim*. 2003;38:134-40.

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*. 2003;80:844-850.

Yeste M, Estrada E, Rocha LG, Marin H, Rodriguez-Gil JE, Miro J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*. 2015;3:395-407.

Table 1: Ejaculate and semen parameters in pony stallions of Brazilian breed submitted to separate through glass wool filtration

Stallion	S1	S3	S5	S6	S7	S8	P
Parameter							value
Gel-free volume (mL)	25.0 ± 4.6 ^a	22.3 ± 4.3 ^a	7.0 ± 0.6 ^b	24.0 ± 2.0 ^a	7.6 ± 0.9 ^b	8.0 ± 1.15 ^b	0.005
Concentration (x 10 ⁶ /mL)	110.0 ± 20.0 ^e	103.3 ± 12.0 ^e	235.0 ± 35.0 ^c	213.3 ± 46.6 ^d	355.0 ± 38.8 ^a	305.0 ± 33.3 ^b	0.0001
Progressive motility (%)	50.0 ± 5.7 ^c	53.3 ± 3.3 ^{bc}	56.6 ± 3.3 ^{abc}	60.0 ± 5.6 ^{abc}	66.7 ± 6.6 ^{ab}	68.3 ± 1.6 ^a	0.02
Normal sperm cells (%)	78.3 ± 2.3 ^{bc}	79.8 ± 3.1 ^{bc}	74.3 ± 2.0 ^c	81.6 ± 1.7 ^b	89.1 ± 1.5 ^a	90.6 ± 1.3 ^a	0.001
Retained cells (%)	32.3 ± 2.9 ^a	28.6 ± 6.7 ^a	20.6 ± 8.7 ^{ab}	28.7 ± 4.3 ^a	17 ± 2 ^{ab}	12 ± 2.3 ^b	0.01
Filtered cells (%)	67.6 ± 2.9 ^b	71.3 ± 6.7 ^b	79.3 ± 8.7 ^{ab}	71.3 ± 4.3 ^b	83 ± 2 ^{ab}	88 ± 2.3 ^a	0.01

^{a,b,c,d,e} Different superscripts within rows indicate significant differences ($p < 0.05$). All data are presented as mean ± SE.

Table 2: Percentage of sperm morphology in pony stallions of Brazilian breed submitted to separate through glass wool filtration.

Semen treatment	<i>Abnormal</i> <i>head</i>	<i>Abnormal</i> <i>midpiece</i>	<i>Abnormal tail</i>	<i>Normal morphology</i>
	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Control</i>	2.29 ± 0.46 ^{ab}	0.77 ± 0.17 ^a	17.9 ± 1.9 ^b	79.02 ± 2.19 ^b
<i>Filtered</i>	1.68 ± 0.28 ^b	0.76 ± 0.19 ^a	6.87 ± 0.92 ^c	90.7 ± 1.1 ^a
<i>Retained</i>	3.39 ± 0.61 ^a	1.33 ± 0.45 ^a	30.12 ± 2.03 ^a	65.1 ± 2.4 ^c
<i>P value</i>	0.0186	0.2298	< 0.0001	< 0.0001

^{a,b,c} Different superscripts within colluns indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. All data are presented as mean ± SE.

Table 3. Means and standard deviation of progressive motility, hypo-osmotic swelling test and MTT absorbance in fresh, 24 h, and 48 h after cooling at 5°C in pony stallions of Brazilian breed.

Time	Groups			P Value Control vs Filtered	P value Control vs Retained	P value Filtered vs Retained
	Control	Filtered	Retained			
	Total Motility (%)					
Fresh	61.1 ± 2.4 ^a	76.1 ± 2.7 ^b	30.5 ± 3.8 ^b	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
24 h	35.5 ± 2.3 ^a	43.3 ± 2.5 ^b	10 ± 3.2 ^b	< 0.0026	< 0.0001	< 0.0001
48 h	16.6 ± 2.4 ^a	23.8 ± 2.8 ^b	2.8 ± 1.6 ^c	0.0035	< 0.0001	< 0.0001
	Hypo-osmotic swelling test (%)					
Fresh	62.3 ± 3 ^a	76.8 ± 2.5 ^b	26 ± 2.6 ^c	< 0.001	< 0.0001	< 0.0001
24 h	39.4 ± 2.7 ^a	49.4 ± 2.5 ^b	14.5 ± 2.1 ^c	0.0015	< 0.0001	< 0.0001
48 h	22.8 ± 3.2 ^a	29.6 ± 3.3 ^a	7.4 ± 1.7 ^b	0.0556	< 0.0001	< 0.0001
	MTT absorbance (nm)					
Fresh	0.772 ± 0.047 ^a	0.930 ± 0.043 ^a	0.351 ± 0.07 ^c	0.0048	< 0.0001	< 0.0001
24 h	0.526 ± 0.042 ^a	0.730 ± 0.031 ^b	0.216 ± 0.06 ^c	0.0041	< 0.0001	< 0.0001
48 h	0.353 ± 0.039 ^a	0.455 ± 0.05 ^a	0.112 ± 0.04 ^b	0.1264	0.005	< 0.0001
	CFDA/PI (%)					
Fresh	59.4 ± 2.46 ^a	70.0 ± 1.8 ^a	29.2 ± 2.0 ^c	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
24 h	37.9 ± 3.48 ^a	44.8 ± 2.7 ^b	14.8 ± 1.6 ^c	0.0024	< 0.0001	< 0.0001
48 h	28.8 ± 2.6 ^a	31.0 ± 1.98 ^a	5.9 ± 1.4 ^b	0.2082	< 0.0001	< 0.0001

^{a,b,c} Different superscripts within rows indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. All data are presented as mean ± SE.

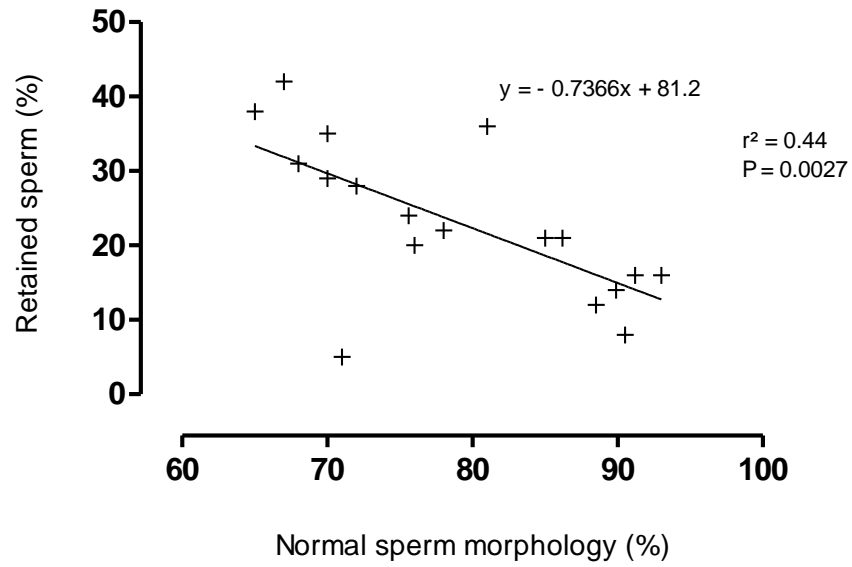


Figure 1: Relationship between normal sperm morphology and retained sperm by glass wool filtration in pony stallions of Brazilian breed.

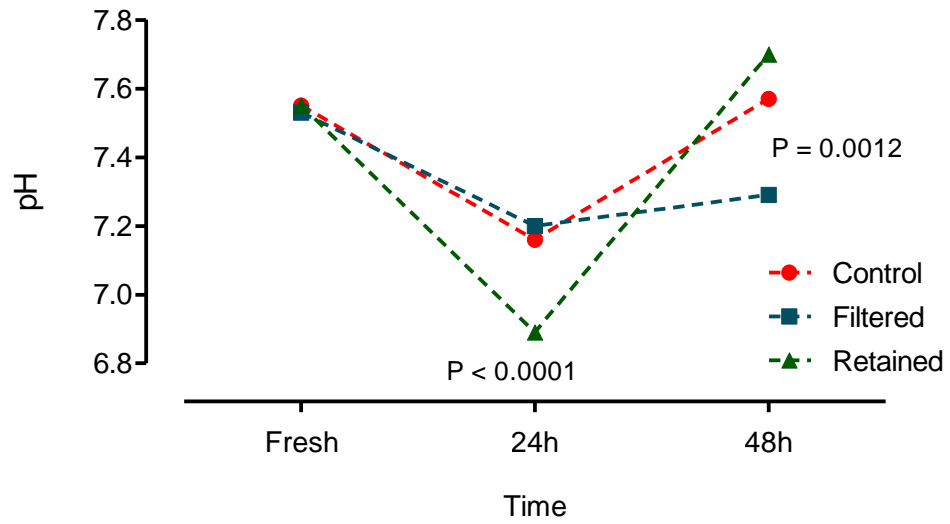


Figure 2: The semen pH during cooling at 5° C of control, filtered and retained sperm by glass wool filtration in pony stallions of Brazilian breed.

4- ARTIGO 2

A separação seminal e seleção espermática em garanhões pôneis promove maior recuperação e viabilidade para o resfriamento a 5°C por 48h?

Seminal separation and sperm cell selection in pony stallions promote greater recovery and viability for 48 hours cooling at 5 ° C

Gilson Antonio Pessoa^{a*}, Ana Paula Martini^b, Janislene Mach Trentin^a, Thaina Minella^b, Mariani Farias Fiorenza^a, Ricardo Olimpio Schenatto^a, Mara Iolanda Batistella Rubin^{ab}

^aGraduate Program in Animal Medicine: Equine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Embryolab - Laboratory of Animal Embryology, Department of Large Animals-Universidade Federal Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 55 99178867; +55 55 3220 8501. E-mail address: gilsonpessoavet@yahoo.com.br (G. A. Pessoa).

RESUMO

As técnicas de separação do plasma seminal (centrifugação, Sperm Filter) e de seleção espermática (Androcoll-E e filtração por lã de vidro) foram aplicadas em 24 ejaculados de 6 garanhões da raça pônei brasileira. Após coleta e separação da fração gel os ejaculados foram diluídos 1:1 com diluente a base de leite em pó. No experimento 1, os ejaculados foram distribuídos em controle (sem centrifugação), centrifugação a 600g x 10min, Sperm Filter e filtração por lã de vidro. No experimento 2, o sêmen foi submetido aos procedimentos: centrifugado (SC), centrifugado com Androcoll-E e filtrado por lã de vidro. Após os procedimentos de ambos experimentos, as amostras foram mantidas refrigerados a 5°C com 50 x 10⁶ espermatozoides/mL por 48 h. As variáveis mensuradas a fresco e resfriadas por 24 e 48 h foram pH, motilidade, funcionalidade de membrana, viabilidade por diacetato de carboxifluoresceinae iodeto de propídio (CFDA/PI, vitalidade (Eosina/Nigrosina) e atividade mitocondrial. Já osmolaridade e morfologia espermática foram avaliadas somente imediatamente após a coleta. No experimento 1, a centrifugação para retirada do plasma seminal resultou em maiores danos aos espermatozoides do que a separação por sperm filter. A filtração por lã de vidro mostrou-se mais eficiente em separar células viáveis e manter a viabilidade durante o resfriamento. No experimento 2, os tratamentos com Androcoll-E e

filtração por lã de vidro foram superiores ($P < 0,0001$) ao semen centrifugado nos parâmetros motilidade, funcionalidade de membrana, atividade mitocondrial e viabilidade, tanto nas amostras de semen fresco como refrigerado. A técnica de seleção espermática com lã de vidro foi eficiente em selecionar células com maior viabilidade para o resfriamento.

Palavras-chave: sêmen, equino, lã de vidro, resfriamento.

ABSTRACT

Separation techniques of seminal plasma (centrifugation and Sperm Filter) and sperm selection (Androcoll-E and filtration glass wool) were used in 24 ejaculates of 6 stallions. After collection and separation of the gel fraction samples were diluted 1: 1 with milk powder extender. In experiment 1, the ejaculates were allocated into control (no spin), centrifugation at $600g \times 10min$, Sperm Filter and glass wool filtration. In experiment 2, semen was submitted to centrifugation (SC); centrifuged with Androcoll-E (SCA) and filtered through glass wool (SGW). Following the treatments in both experiments, samples were kept chilled at $5^\circ C$ to 50×10^6 sperm / ml for 48 h. The variables measured on fresh samples and after cooling were pH, motility, membrane viability function by 6- carboxyfluoresceindiacetate and propidium iodide (CFDA / PI), vitality (eosin / nigrosine) and mitochondrial activity. Osmolarity and morphology were evaluated only immediately after collection. In experiment 1, centrifugation to remove seminal plasma resulted in greater damage to sperm than separation by sperm filter and selection by glass wool was more efficient in separating viable cells and maintain viability during cooling. In experiment 2 Androcoll-E and glass wool treatments results in higher ($P < 0.0001$) motility, membrane function, mitochondrial activity and viability than semen centrifuged. Both separation Androcoll- E as for glass wool improved the quality of semen pony stallions to be preserved for up to 48 hours to $5^\circ C$ using thinner powdered milk.

Keywords: semen, equine, glass-wool, cooling.

INTRODUÇÃO

O uso de sêmen resfriado ou congelado na espécie equina vem crescendo como uma importante biotécnica aplicada ao manejo reprodutivo dessa espécie (Ball *et al.*, 2001). A expansão da utilização de equinos de menor porte em atividades lúdicas, terapêuticas e recreativas com crianças fez crescer a demanda nos últimos anos de pôneis. Algumas raças apresentam produção espermática diária reduzida devido a seu porte (Neves *et al.*, 2006).

As razões específicas para declínio da viabilidade da célula espermática durante os processos de resfriamento e congelamento tem vários fatores envolvidos, dentre eles o estresse osmótico e oxidativo, alterações de pH e osmolaridade que podem ser consequência de produtos tóxicos eliminados por células mortas pré-processamento (Ball, 2008). A produção de espécies reativas a oxigênio é elevada na presença de células danificadas pelo processo de criopreservação, espermatozoides não viáveis, ou com defeitos morfológicos dentre as quais se destacam alterações de peça intermediária (Ball e Vo, 2001). Os danos provocados a membrana do espermatozoide e as mitocôndrias são maiores quanto o sêmen equino é submetido a resfriamento ou criopreservação.

A diminuição da atividade mitocondrial do espermatozoide foi verificada em humanos como causa potencial para elevar a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS) (Wang *et al.*, 2003). Estes eventos que provocam alterações em todos os componentes celulares podem levar a morte celular via apoptose ou necrose. Assim, o aumento de células mortas provoca aumento no efeito cascata da produção de radicais livres, levando a danos citoplasma e fragmentação do DNA (Sharma e Agarwal, 1996; Agarwal, Saleh e Bedaiwy, 2003).

O uso de diversas técnicas como a retirada do plasma seminal (centrifugação e Sperm Filter®), separação espermática por gradientes de concentração (Percoll®, Androcoll-E®), ou seleção espermática em colunas (Glass Wool e Sefadex) buscaram no primeiro caso a diminuição dos efeitos deletérios do plasma seminal durante o resfriamento e, nos demais casos maior número de células viáveis após o processo de criopreservação. Estas são algumas das alternativas disponíveis para melhorar a qualidade do semen equino (Sieme *et al.*, 2003; Alvarenga *et al.*, 2012; Morrell, 2012; Morrell *et al.*, 2016).

Ao comparar os métodos de concentração espermática Alvarenga *et al.* (2012) observaram que a centrifugação usualmente usada para remover o plasma seminal do sêmen de garanhões pode induzir lesões na célula espermática. Já a utilização de membrana hidrofílica

sintética com poros de 2 μm (Sperm Filter) é tão eficiente quanto a centrifugação convencional, bem como à centrifugação em solução coloidal para remoção do plasma seminal, além deste ser de melhor aplicabilidade.

Sabe-se que os métodos de filtração por lã de vidro são eficazes em separar espermatozoides com boa motilidade e com maior capacidade após o congelamento. Porém, os dados ainda são conflitantes quando comparado com a técnica de centrifugação coloidal e com grandes volumes de sêmen (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2010).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes técnicas para separação do plasma seminal e para seleção espermática antes do resfriamento a 5 °C sobre a viabilidade do sêmen de garanhões pôneis por 24 e 48 h.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e manejo de coleta

O estudo foi realizado durante a estação reprodutiva de 2013, 2014 e 2015 no hemisfério sul. Seis garanhões da raça pônei brasileiro, com idade entre 9 e 13 anos, alimentados uma vez por dia com aveia e alfafa, pastagem e água ad libitum durante todo o dia serviram como doadores de sêmen. Todos garanhões foram alocados em piquetes e mantidos sob as mesmas condições de manejo para esgotamento das reservas extragonadais, bem como para coleta regular do ejaculado efetuada duas vezes por semana. Uma fêmea em estro serviu de manequim e a coleta do ejaculado foi conduzida com uma vagina artificial (Hannover Modelo; Minitube, Tiefenbach, Alemanha). O ejaculado livre da fração gel foi mensurada para avaliação do volume, aspecto motilidade total, concentração, pH e osmolaridade e posteriormente diluído na proporção 1:1 em diluente com leite em pó desnatado (Equidil – UFSM).

Diluente

O diluente Equidil, produzido pelo Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab) da Universidade Federal de Santa Maria é uma modificação do diluente Kenney (Kenney, 1975), composto de 4,9g glicose (Merck 1.08337.1000), leite em pó desnatado (2,4g) e água destilada qsp, sem uso de antibióticos

Avaliação do sêmen

Amostras em duplicatas foram retiradas para realização do teste de redução do Thiazolyl blue ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) (MTT) (Aziz, Ahlswede e Enbergs, 2005), hiposmótico, osmolaridade, pH, morfologia e vitalidade.

A motilidade espermática foi avaliada de forma subjetiva de acordo com Varner *et al* (1989). Alíquotas de 5,0 μ L do sêmen foram depositadas em lâmina sobre lamínula, ambas aquecidas a 38° C. O exame foi realizado por microscopia óptica de contraste de fase (400x) aquecido (38° C). O total de aproximadamente 200 espermatozoides foram avaliados em distintos campos da lâmina. A proporção total de espermatozoides móveis foi estimada imediatamente após o preparo da amostra à temperatura ambiente, de 20-22° C, bem como após a manutenção a 5° C, por 24 h e 48 h de resfriamento.

Para avaliação morfológica foi efetuado um esfregaço com 5 μ L de sêmen distendido sobre lâmina. Após secagem a amostra foi fixada e corada com soluções do corante Spermac (Minitub do Brasil Porto Alegre, Brasil). Para determinar o percentual de espermatozoides vivos e mortos, amostras de 5 microlitros de sêmen serviram para preparar os esfregaços que foram corados com eosina-nigrosina (Dott e Foster, 1972) (Minitub-Porto Alegre, Brasil).

A técnica de fluorescência, para determinar a viabilidade espermática foi conduzida com coloração utilizando 6- diacetato de carboxifluoresceína (C504, Sigma-Aldrich) e iodeto de propídio (P4170, Sigma-Aldrich) (CFDA/PI) (Harrison e Vickers, 1990; Arruda *et al.*, 2002).

A atividade mitocondrial (teste MTT) das amostras de sêmen foi avaliada com (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) conforme o protocolo de Aziz et al. (2005). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (MR 96A) com uso de um filtro de 540nm.

Os tubos de centrifuga com volume de 50 mL contendo as amostras de sêmen foram resfriados em refrigerador a 5° C. Os tubos foram colocados na posição inclinada sobre um suporte para tubos mantendo a curva de resfriamento de 0,5°C por minuto. Para aferição da temperatura na superfície dos tubos utilizou-se um termo higrômetro digital (ITHT 2210, São Paulo-Brasil) com cabo fino mantido dentro da câmara de refrigeração.

A cada 24h de resfriamento, os tubos de centrífuga contendo as amostras foram homogeneizados e uma amostra foi retirada para determinar a motilidade, pH, osmolaridade, MTT, teste hiposmótico, viabilidade espermática e teste de vitalidade (eosina/nigrosina).

Para avaliação da funcionalidade de membrana espermática foi utilizado o protocolo descrito por Lagares *et al.* (2000), sob contraste de fase em aumento de 400X. A classificação das células espermáticas foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por Neild *et al.* (2000).

Experimento 1

Para este estudo 24 ejaculados de garanhões pôneis Raça Brasileira (4 ejaculados/garanhão) durante a estação reprodutiva 2013-2014 serviram para compor o desenho experimental. Os ejaculados foram distribuídos em quatro frações iguais e denominadas de acordo com os grupos estabelecidos para resfriamento: *Controle*: sêmen diluído e não centrifugado na concentração de 50×10^6 células/mL; *sêmen diluído centrifugado*: a $600 \times g$ /min durante 10min, *sêmen diluído separado com Sperm Filter* conforme Alvarenga *et al.* (2012) e *sêmen diluído separado por lã de vidro*.

Para confecção da coluna de lã de vidro (Sigma-Aldrich, 20411) seguiu-se a metodologia descrita por Engel (2001) com modificações. A lã de vidro (250mg) foi colocada e comprimida em seringa de 3 mL sem embolo de borracha e na sequência lavada e esterilizada a vapor. Previamente ao uso, a coluna de lã de vidro montada e estéril foi lavada com 10 mL do mesmo diluente utilizado no restante dos processos com o semen. A seguir, a seringa foi colocada na posição vertical e o sêmen diluído na proporção 1:1 foi vertido na porção superior da seringa. Os espermatozoides com viabilidade passam por gravidade pela coluna sendo depositados em tubos de 15 mL localizados imediatamente abaixo da seringa.

Após o processo de filtração o material retido na lã de vidro foi lavado com 10 mL de diluente em placa de Petri (15x90mm) para avaliar a concentração de células retidas, motilidade, pH, osmolaridade, teste hiposmótico e a coloração supra vital (eosina/nigrosina).

Experimento 2

O experimento foi realizado com 24 ejaculados obtidos de seis garanhões pôneis da Raça Brasileira (4 ejaculados/garanhão) durante a estação reprodutiva 2014-2015. A coleta, avaliação e diluição do ejaculado foi realizada como descrito no experimento 1. E o sêmen foi distribuído nos tratamentos a seguir:

Sêmen centrifugado com *Androcoll-E (SCA)*: Uma alíquota de 15 mL do ejaculado diluído 1:1 foi depositada sobre 15mL de uma coluna de Androcoll-E (Morrell *et al.*, 2009) em um tubo de centrifuga de 50mL. Esta amostra foi centrifugada a $300g \times 20$ min, o sobrenadante (plasma, diluente e coloide) foi descartado e o pellet ressuspendido em diluente até obter a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. Após o ajuste da concentração a amostra foi refrigerada a $5^\circ C$ durante 48 horas.

Sêmen filtrado por lã de vidro (SFL): uma alíquota de 15ml foi submetida a filtração por gravidade em uma seringa de 10mL contendo lã de vidro prensada até a marca de 1cc. O sêmen filtrado foi submetido a nova determinação da concentração, sendo que o diluente foi adicionado à amostra para ajuste da concentração a 50×10^6 espermatozoides/mL e refrigerado a 5° C durante 48 horas.

Sêmen centrifugado (SC): 15 mL do sêmen diluído 1:1 foi submetido a centrifugação a 600g x 10min e logo após a concentração foi ajustada para 50×10^6 espermatozoides/mL. As amostras foram refrigeradas a 5° C durante 48 horas.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (PROC MIXED) com o programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). O modelo estatístico incluiu efeito do ganhão, tempo de armazenamento e interações. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Parâmetros seminais

O volume médio dos ejaculados foi de 22 ± 4 mL e a concentração média no ejaculado foi de $205 \pm 11.6 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A motilidade total média dos ejaculados foi de $73,9 \pm 1,6$ %, A morfologia espermática dos ejaculados foi de $73,7 \pm 4,2$ % de espermatozoides com morfologia intacta. A osmolaridade foi similar entre os ejaculados e entre os tratamentos. O pH também foi similar entre os grupos a fresco para os grupos controle (7,52), centrifugado (7,55), lã de viro (7,54) e Sperm Filter (7,53) ($P = 0.96$). Após 24h de resfriamento o pH não diferiu entre os grupos controle (7.25), centrifugado (7.26), lã de vidro (7,22) e Sperm Filter (7,14) ($P=0.08$). Já nas 48h de resfriamento o pH foi superior no grupo controle (7,87) comparado ao centrifugado (7,61), lã de vidro (7,40) e Sperm Filter (7,53) ($P < 0.0001$).

Experimento 1

Os ejaculados, cujo sêmen foi separado com lã de vidro apresentaram maior percentual de células íntegras após o procedimento de filtragem ($p = 0.047$). Na Tabela 1 é possível verificar que os ejaculados do tratamento lã de vidro exibiram acima de 60% de células com defeitos ($p < 0.001$). Ejaculados cujos espermatozoides foram centrifugados apresentaram

maior percentual de células com defeitos de cauda após o processamento, quando comparado aos ejaculados do grupo controle (não centrifugado), Sperm Filter e lã de vidro ($p < 0.05$).

A motilidade progressiva na avaliação inicial (0 h) foi maior no tratamento com lã de vidro diferindo do grupo controle, centrifugado e Sperm Filter ($p = 0,0015$). Ao avaliar após 24h de resfriamento o grupo lã de vidro permaneceu superior, seguido pelo grupo Sperm Filter ($P = 0,0001$). Os ejaculados resfriados por 48 h, não centrifugados (controle) e centrifugados apresentaram diferença significativamente inferior ($p < 0,0001$) aos ejaculados tratados com lã de vidro e Sperm Filter (Tabela 2).

O teste hiposmótico revelou maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta após resfriamento por 48 h nos ejaculados submetidos à separação em lã de vidro (Tabela 3). A funcionalidade de membrana reduziu gradativamente com o tempo de resfriamento em todos os tratamentos.

O teste de atividade mitocondrial (MTT) revelou redução da viabilidade espermática durante o período de resfriamento a 5°C em todos os tratamentos. Os ejaculados submetidos a separação através da lã de vidro apresentaram maior número de células com atividade mitocondrial durante o resfriamento (Figura 1). A absorbância do grupo lã de vidro ($0,921 \pm 0,04$) diferiu ($P = 0,0080$) dos ejaculados tratados com Sperm Filter ($0,850 \pm 0,05$), centrifugado ($0,833 \pm 0,05$) e controle ($0,777 \pm 0,04$). Já na avaliação do MTT após 24h de resfriamento, os ejaculados tratados com lã de vidro ($0,695 \pm 0,03$) não diferiram do Sperm Filter ($0,630 \pm 0,04$), o qual não diferiu do grupo centrifugado ($0,579 \pm 0,04$) e controle ($0,556 \pm 0,05$) ($P = 0,0295$). Após, 48 horas de resfriamento a atividade mitocondrial continuou sendo superior ($P = 0,0043$) para o grupo filtrado por lã de vidro ($0,513 \pm 0,03$). Este mesmo parâmetro avaliado nos ejaculados tratados com Sperm Filter ($0,407 \pm 0,02$) e centrifugado ($0,364 \pm 0,02$) apresentou similaridade de resultados e o mesmo ocorreu nos ejaculados centrifugados e controle ($0,299 \pm 0,03$).

A Tabela 4 apresenta a vitalidade espermática (Tabela 4) determinada pela coloração supra-vital (eosina-nigrosina). Ejaculados que tiveram o plasma seminal separado para resfriamento pela técnica do Sperm Filter ou que passaram por separação espermática com lã

de vidro apresentaram maior viabilidade espermática. Esta diferença foi verificada tanto a fresco como após 24 e 48 h de resfriamento.

Experimento 2

A osmolaridade após o processamento do sêmen foi similar entre os tratamentos (SC=303,6; SCA=300,4 e SFL=302,5). O pH (médio \pm SE) também foi semelhante entre os tratamentos SC (7,52 \pm 0,03), SFL (7,54 \pm 0,02) e SCA (7,53 \pm 0,02) no sêmen fresco (P=0,83), nas 24 h de resfriamento SC (7,16 \pm 0,03), SFL (7,15 \pm 0,04) e SCA (7,12 \pm 0,05). No entanto, nas 48 h de resfriamento o pH do SC (7,84 \pm 0,09) foi superior (P = 0,001) aos SFL (7,49 \pm 0,05) e SCA (7,5 \pm 0,04).

A centrifugação com Androcoll E e a separação com lã de vidro resultou em maior percentual de células normais, bem como reduziram o percentual de células com alterações de cauda (P < 0.0001) (Tabela 5).

Os resultados de motilidade, funcionalidade de membrana (HOST), viabilidade espermática (CFDA/PI), atividade mitocondrial (redução MTT) e vitalidade espermática (Eosina/nigrosina) estão expressos em médias \pm SE na tabela 6.

A seleção espermática por Androcoll-E e por lã de vidro foram capazes de manter maior número de células viáveis durante o resfriamento. Embora não diferiram entre si, o tratamento com Androcoll-E resultou durante o período de resfriamento em maior atividade mitocondrial e viabilidade espermática.

DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em reunir diferentes técnicas de concentração e separação espermática em sêmen de garanhões da raça Ponei Brasileiro.

O uso da centrifugação para concentração e remoção do plasma seminal para resfriamento do sêmen equino tem sido amplamente discutido em estudos evidenciando que o uso de baixa velocidade não afeta a qualidade espermática (Brinsko, Crockett e Squires, 2000; Raphael *et al.*, 2008). Na literatura também é possível identificar estudos que atribuem efeitos deletérios à membrana do espermatozoide, ou perda no sobrenadante (Martin, Klug e Gunzel, 1979; Jasko, Moran, *et al.*, 1991; Dell'aqua Jr. *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2001), bem como interações com diluente (Ferrer *et al.*, 2012). A análise dos resultados obtidos evidencia que a

centrifugação do semen sem o uso de coloides pode provocar danos a célula espermática corroborando outros estudos (Sieme *et al.*, 2003). No entanto, estes fatores devem ser considerado sempre levando em conta o diluente utilizado na diluição do ejaculado para realizar a centrifugação (Len *et al.*, 2010), pois usando diluente INRA-96 não foi observado nenhum efeito negativo.

O Sperm Filter (Alvarenga *et al.*, 2012) se caracteriza por ser uma técnica eficiente na concentração espermática e por remover o plasma seminal sem causar danos as células. Esta afirmação foi corroborada por Ramires Neto et al. (2013) (Ramires Neto *et al.*, 2013) que ao conduzir a avaliação do semen equino seprado por Sperm Filter foi mais eficaz em manter a viabilidade do semen refrigerado de forma semelhante a centrifugação convencional, com a vantagem de aumentar o número de espermatozoides recupaerados.

O aumento de alterações no semen equino foram associados com a diminuição da fertilidade (Jasko, Little, *et al.*, 1991). O maior número de espermatozoides viáveis e intactos após a filtração por lã de vidro de semen bovino congelado resultou em melhor capacidade fecundante *in vitro* (Lee *et al.*, 2009) .

No estudo desenvolvido por Alvarenga *et al.* (2012) o uso do Sperm Filter® e a técnica de centrifugação com colóide foram igualmente eficientes, assim como a centrifugação para a remoção do plasma seminal do sêmen dos garanhões. O Sperm Filter apresenta vantagens, pois promove menos danos para a membrana plasmática quando comparado a centrifugação. Adicionalmente, reduz o crescimento bacteriano no sêmen e é mais prático no campo, pois dispensa o uso de uma centrífuga.

Os resultados obtidos no experimento 1 demonstraram que a centrifugação não foi capaz de aumentar a motilidade dos espermatozoides quando comparado ao grupo controle e inferior ao semen submetido a remoção do plasma através do Sperm Filter e da separação de células por Lã de vidro. Além disso a separação com Sperm Filter promove menores alterações nas células, enquanto a centrifugação aumentou o percentual de células com danos à cauda. Estes achados corroboram estudos de Alvarenga *et al* (2012) e Dell Aqua *et al* (2001).

A atividade mitocondrial foi reduzida em todos os tratamentos no decorrer do periodo de resfriamento. No entanto, os ejaculados centrifugados e nao centrifugados (controle) demonstraram desempenho inferior nos parâmetros avaliados quando comparados aos grupos Sperm Filter e Lã de vidro, os quais apresentaram maior funcionalidade de membrana (HOST) e atividade mitocondrial.

No experimento 2, a centrifugação utilizando Androcoll-E ou a separação por lã de vidro mostraram ser mais eficientes do que a centrifugação convencional. Apresentando maior número de células normais, maior atividade mitocondrial e maior viabilidade. O uso da centrifugação com colóide como o Androcol-E tem sido amplamente pesquisado e excelentes resultados já foram obtidos para seleção de espermatozoides tanto antes, quanto após a preservação do semen equino (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2009; Morrell, J. *et al.*, 2011; Morrell, J. M. *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012; Macias-Garcia *et al.*, 2012). A obtenção de parâmetros semelhantes entre a centrifugação com lã de vidro e Androcol-E denota que ambas as técnicas podem ser utilizadas previamente ao resfriamento do semen de garanhões pôneis. O maior número de espermatozoides íntegros selecionados através da separação por lã de vidro e Androcoll-E pode ser atribuído como fator para maior a atividade mitocondrial durante o período de resfriamento tanto por 24h quanto 48h. Constatação similar foi relatada por (Samper e Crabo, 1993) ao afirmar que a filtração espermática pode aumentar o número de espermatozoides intactos e apresentar boa correlação com fertilidade.

A literatura indica que as mitocôndrias do espermatozoide equino são mais sensíveis a alterações osmóticas que a membrana plasmática (Garcia *et al.*, 2011). Portanto, selecionar espermatozoides com maior atividade mitocondrial pode ter relação com maior suporte ao frio. Sabe-se que garanhões bons e maus congeladores diferem em níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROS) após a criopreservação e não tem qualquer relação com danos provocados ao DNA do núcleo, por sua vez a melhor resistência a criopreservação é vista em espermatozoides com maior potencial mitocondrial (Yeste *et al.*, 2015). O teste de MTT descrito por Aziz *et al.* (2005) e utilizado nesta pesquisa é um ensaio colorimétrico confiável para avaliar a viabilidade espermática e atividade mitocondrial em equinos.

A seleção de espermatozoides pela filtração em fibras de vidro já foi atribuída como passível de contaminação por debris da lã de vidro e promover alterações de pH e osmolaridade do meio (Morrell, 2012). Neste estudo estas alterações não foram verificadas. Adicionalmente, os resultados obtidos com lã de vidro são também promissores, pois já foram relatados em outras espécies (Johnson e Garvin, 1959; Paulson e Polakoski, 1977; Arzondo *et al.*, 2012).

A filtração por gravidade em lã de vidro foi utilizada por Arzondo *et al.* (2012) em semen bovino congelado. Os autores afirmam que a técnica é rápida, simples, de baixo custo, altamente eficaz para isolar espermatozoides e enriquecer a população de gametas disponíveis e viáveis tornando-a uma ferramenta útil para tecnologias de reprodução assistida.

Resta ainda esclarecer se os espermatozoides selecionados por gravidade com lâ de vidro submetidos a refrigeração a 5° C e criopreservados a -196° C apresentam alta viabilidade após a criopreservação.

CONCLUSÕES

A técnica de separação do plasma seminal com o Sperm Filter permite concentrar espermatozoides sem danos comparado à centrifugação. Lã de vidro e Androcoll-E foram equivalentes em selecionar espermatozoides com maior viabilidade e atividade mitocondrial e capacidade de suportar o resfriamento.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**, v. 79, n. 4, p. 829-43, Apr 2003. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749418> >.
- ALVARENGA, M. A. et al. Methods of Concentrating Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 424-429, Aug 2012. ISSN 0737-0806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308258100002 >.
- ARRUDA, R. P. et al. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and Trypan Blue-Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 1, 2002.
- ARZONDO, M. M. et al. Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 201-9, Jul 1 2012. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537998> >.
- AZIZ, D. M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1350-1356, Oct 1 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231992600010 >.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Anim Reprod Sci**, v. 107, n. 3-4, p. 257-67, Sep 2008. ISSN 0378-4320 (Print) 0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524506> >.
- BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-89, Sep 1 2001. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572439> >.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **J Androl**, v. 22, n. 6, p. 1061-9, Nov-Dec 2001. ISSN 0196-3635 (Print)

0196-3635 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700853> >.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129-136, Jul 1 2000. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089080300010 >.

COSTA, A. L. et al. Single layer centrifugation with Androcoll-E (TM) improves the quality of cooled stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 116-116, Jun 2012. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305073900102 >.

DELL'AQUA JR., J. A. et al. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science** v. 68, n. Abstracts p. 324-325, 2001.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. **J Reprod Fertil**, v. 29, n. 3, p. 443-5, Jun 1972. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4113687> >.

FERRER, M. S. et al. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1814-1823, Nov 2012. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310388200017 >.

GARCIA, B. M. et al. The Mitochondria of Stallion Spermatozoa Are More Sensitive Than the Plasmalemma to Osmotic-Induced Stress: Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105-113, Jan-Feb 2011. ISSN 0196-3635. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298535700018 >.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of Fluorescent-Probes to Assess Membrane Integrity in Mammalian Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, Jan 1990. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990CL15500039 >.

JASKO, D. J. et al. Determination of Stallion Semen Quality and Its Relationship with Fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 649-650, 1991. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991HF42300082 >.

JASKO, D. J. et al. Effect of Seminal Plasma Dilution or Removal on Spermatozoal Motion Characteristics of Cooled Stallion Semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, Jun 1991. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991FP07600001 >.

JOHANNISSON, A. et al. Colloidal centrifugation with Androcoll-E (TM) prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 119-128, Nov 2009. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270043000013 >.

JOHNSON, T. M.; GARVIN, J. E. Separation of lymphocytes in human blood by means of glass wool column. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 102, p. 333-5, Nov 1959. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14407525> >.

KELLER, A. et al. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science** v. 68, n. Abstracts p. 318-319, 2001.

LEE, H. L. et al. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 249-255, Sep 2009. ISSN 1229-845X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269675800011 >.

LEN, J. A. et al. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 225-31, Jan 15 2010. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913898> >.

MACIAS-GARCIA, B. et al. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 74-82, May 2012. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305669600010 >.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 27, p. 47-51, 1979. ISSN 0449-3087 (Print) 0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/289825> >.

MORRELL, J. et al. Single layer centrifugation of cooled semen with androcoll-e improves sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 132-132, Sep 2011. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294071800250 >.

MORRELL, J. M. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 436-440, Aug 2012. ISSN 0737-0806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308258100004 >.

MORRELL, J. M. et al. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 879-884, Oct 1 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269769500016 >.

MORRELL, J. M. et al. Effect of Single Layer Centrifugation on reactive oxygen species and sperm mitochondrial membrane potential in cooled stallion semen. **Reprod Fertil Dev**, Apr 6 2016. ISSN 1031-3613 (Electronic) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27048867> >.

MORRELL, J. M. et al. Pregnancies Following Artificial Insemination with Spermatozoa from Problem Stallion Ejaculates Processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 642-645, Aug 2011. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292563500012 >.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. **Vet Med Int**, v. 2011, 2010. ISSN 2042-0048 (Electronic)
2042-0048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814435> >.

NEVES, A. P. et al. Reproductive parameters and sperm freezability of stallions of the Brazilian pony breed. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 67-69, Aug 2006. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239472400021 >.

PAULSON, J. D.; POLAKOSKI, K. L. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. **Fertil Steril**, v. 28, n. 2, p. 178-81, Feb 1977. ISSN 0015-0282 (Print)
0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/576215> >.

RAMIRES NETO, C. et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1120-1123 e1, Apr 15 2013. ISSN 1879-3231 (Electronic)
0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561926> >.

RAPHAEL, C. F. et al. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 344-345, Sep 2008. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258437800055 >.

SAMPER, J. C.; CRABO, B. G. Assay of Capacitated, Freeze-Damaged and Extended Stallion Spermatozoa by Filtration. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1209-1220, Jun 1993. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LF25800001 >.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-50, Dec 1996. ISSN 0090-4295 (Print)
0090-4295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973665> >.

SIEME, H. et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reprod Domest Anim**, v. 38, n. 2, p. 134-40, Apr 2003. ISSN 0936-6768 (Print)
0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654024> >.

WANG, X. et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertil Steril**, v. 80 Suppl 2, p. 844-50, Sep 2003. ISSN 0015-0282 (Print)
0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505763> >.

YESTE, M. et al. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v. 3, n. 2, p. 395-407, Mar 2015. ISSN 2047-2919. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000353398800031 >.

Tabela 1: Percentual médio (\pm SE) de alterações e espermatozoides intactos em esfregaços corados com corante Spermac em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira pré-resfriamento (0h), submetidos a quatro distintos tratamentos.

Tratamentos	<i>Peça</i>				
	<i>Acrossoma</i> (%)	<i>Cabeça</i> (%)	<i>intermediária</i> (%)	<i>Cauda</i> (%)	<i>Intactos</i> (%)
<i>Controle</i>	1,43 \pm 0,31 ^a	2,2 \pm 0,28 ^{bc}	2,31 \pm 0,37 ^{ab}	14,13 \pm 0,76 ^t	78,39 \pm 0,97 ^b
<i>Centrifugado</i>	2,16 \pm 0,39 ^a	3,07 \pm 0,39 ^a	2,92 \pm 0,39 ^a	19,43 \pm 1,17 ^z	72,4 \pm 1,51 ^c
<i>Lã de vidro</i>	0,80 \pm 0,17 ^b	1,62 \pm 0,32 ^{ab}	1,14 \pm 0,21 ^c	7,78 \pm 0,99 ^b	88,63 \pm 1,22 ^a
<i>Sperm Filter</i>	1,52 \pm 0,28 ^{ab}	2,55 \pm 0,24 ^c	1,99 \pm 0,3 ^b	14,05 \pm 0,92 ^c	79,87 \pm 0,99 ^b
<i>Valor de P</i>	0,0296	0.0055	0.0004	<0.0001	< 0,0001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0.05$) entre os grupos.

Tabela 2: Percentual médio de motilidade total (\pm SE) subjetiva de vinte e quatro ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira submetidos a avaliação imediata após processamento (0h), resfriados por 24 h e 48 h a 5° C.

<i>Tempo</i>	<i>Controle</i>	<i>Centrifugado</i>	<i>Sperm Filter</i>	<i>Lã de vidro</i>	<i>Valor de P</i>
Fresco	70,0 \pm 2,8 ^b	71,1 \pm 2,78 ^b	73,8 \pm 3,14 ^b	82,2 \pm 1,9 ^a	0,0015
24 h	35,1 \pm 2,81 ^c	39,2 \pm 2,4b ^c	43,3 \pm 2,4 ^b	51,6 \pm 2,1 ^a	0,0001
48 h	16,38 \pm 2,8 ^b	18,33 \pm 2,94 ^b	25,0 \pm 2,02 ^a	27,2 \pm 1,9 ^a	< 0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 3: Valores médios (\pm SE) da funcionalidade de membrana determinado pelo teste hiposmótico em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira resfriados por 24 h ou 48 h a 5° C em diluente com leite em pó desnatado na dose de 50×10^6 espermatozoides/mL.

<i>Tempo</i>	<i>Controle Semen não centrifugado</i>	<i>Centrifugado</i>	<i>Sperm Filter</i>	<i>Lã de vidro</i>	<i>Valor de P</i>
Fresco	66,6 \pm 3,0 ^b	69,1 \pm 3,1 ^b	70,7 \pm 2,2 ^b	76,2 \pm 2,7 ^a	0,0011
24 h	41,7 \pm 2,7 ^b	44,2 \pm 1,9 ^b	44,9 \pm 1,9 ^{ab}	48,2 \pm 2,7 ^a	0.0197
48 h	21,2 \pm 3,2 ^b	24,6 \pm 1,3 ^b	25,6 \pm 2,4 ^b	31,8 \pm 2,2 ^a	0,0008

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4: Valores médios (\pm SE) da viabilidade espermática determinados pelo teste Eosina/Nigrosina em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis da raça Brasileira resfriados a 5° C em diluente com leite em pó desnatado (Equidil/UFSM) na dose de 50×10^6 espermatozoides/mL.

<i>Tempo</i>	<i>Controle</i>	<i>Centrifugado</i>	<i>Sperm Filter</i>	<i>Lã de vidro</i>	<i>Valor de P</i>
Fresco	56,1 \pm 2,5 ^b	55,4 \pm 2,4 ^b	57,4 \pm 2,6 ^b	64,4 \pm 1,9 ^a	0,0071
24 h	35,0 \pm 2,4 ^c	34,7 \pm 3,5 ^c	36,8 \pm 2,7 ^{ab}	41,8 \pm 2,5 ^a	0,0278
48 h	19,55 \pm 2,3 ^b	18,2 \pm 2,8 ^b	24,0 \pm 2,2 ^{ab}	27,3 \pm 2,3 ^a	0,0431

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5: Percentual médio (\pm SE) de alterações e espermatozoides intactos (normais) visualizados em esfregaços corados com corante Spermac em 24 ejaculados de seis garanhões pôneis após processamento na hora inicial (0h) pré-resfriamento submetidos a seleção por centrifugação, Androcoll E ou por lâ de vidro.

Tratamentos	<i>Peça intermediári</i>				
	<i>Acrossoma</i> (%)	<i>Cabeça</i> (%)	<i>a</i> (%)	<i>Cauda</i> (%)	<i>Intactos</i> (%)
<i>Sêmen centrifugado</i>	1,24 \pm 0,19 ^a	2,73 \pm 0,36 ^a	1,6 \pm 0,25 ^a	19,87 \pm 1,13 ^a	78,39 \pm 0,97 ^b
Androcoll-E	0,65 \pm 0,12 ^b	1,41 \pm 0,29 ^b	0,91 \pm 0,13 ^a	9,52 \pm 0,89 ^b	86,6 \pm 1,1 ^a
<i>Sêmen filtrado em lâ de vidro</i>	0,71 \pm 0,14 ^b	1,6 \pm 0,38 ^b	1,4 \pm 0,34 ^a	9,1 \pm 0,81 ^b	86,8 \pm 1,28 ^a
<i>Valor de P</i>	0,02	0,03	0,22	<0,0001	< 0,0001

Letras diferentes numa mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 6. Médias (\pm SE) de motilidade progressiva, teste hiposmótico, absorvância de MTT, viabilidade e vitalidade espermática em ejaculados na zero (inicial), 24 e 48 horas após resfriamento a 5°C submetidos a seleção por centrifugação, Androcoll-E ou por lâ de vidro.

Tempo	Tratamentos			Valor de P
	Centrifugado	Androcoll-E	Lã de vidro	
	Motilidade total (%)			
0 (inicial)	63,3 \pm 2.1b	80,0 \pm 2.9a	80,5 \pm 2,2a	< 0.0001
24 h	36,6 \pm 2.5b	43,0 \pm 2.9a	46,2 \pm 2,4a	0.0022
48 h	16,2 \pm 2.6b	24,3 \pm 2.4a	27,0 \pm 2,1a	0.0001
	Teste hiposmótico (%)			
0 (inicial)	63,9 \pm 3,2b	72,6 \pm 1,7a	74,2 \pm 2,2a	< 0.001
24 h	38,6 \pm 2.6b	43,6 \pm 2,1ab	48,4 \pm 2,3c	0.008
48 h	22,3 \pm 1,7b	28,4 \pm 2,1a	28,9 \pm 1,9a	0.034
	MTT absorbance (nm)			
0 (inicial)	0,692 \pm 0,03b	0,885 \pm 0,04a	0,873 \pm 0,04a	0.005
24 h	0,569 \pm 0,04b	0,683 \pm 0,04a	0,656 \pm 0,03a	0.04
48 h	0,377 \pm 0,03b	0,504 \pm 0,03a	0,490 \pm 0,02a	0.0276
	CFDA/PI (%)			
0 (inicial)	57,8 \pm 2,0b	66,85 \pm 1.9a	65,4 \pm 2.6a	< 0.0001
24 h	30,9 \pm 2,3b	45,35 \pm 2.6a	43,0 \pm 3,1a	< 0.0001
48 h	17,4 \pm 2,6b	34,0 \pm 1,6a	29,9 \pm 3,2a	0.0001
	Vitalidade espermática/Eosina/Nigrosina (%)			
0 (inicial)	48,6 \pm 1,65b	62,7 \pm 2,1a	62,8 \pm 1,8a	< 0.0001
24 h	31,5 \pm 1,5b	43,0 \pm 2,2a	38,5 \pm 2,5a	0.0002
48 h	16,1 \pm 2,1c	37,6 \pm 2,1a	21,5 \pm 2,2b	0.04

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

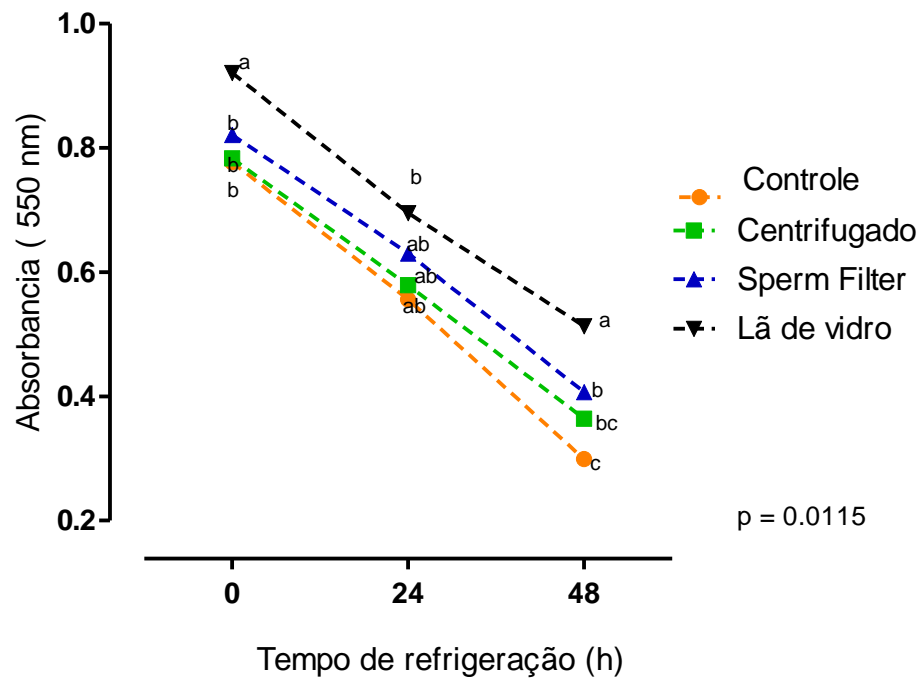


Figura 1: Atividade mitocondrial avaliada pela redução de MTT em amostras de sêmen de garanhões pôneis refrigeradas a 5 °C durante 48 h.

5- CONCLUSÕES

A técnica de seleção espermática por lã de vidro permite selecionar células com maior viabilidade para o resfriamento.

A técnica de seleção por lã de vidro reteve células com alterações morfológicas de cauda e perda mínima de células viáveis.

A separação dos espermatozoides de ganhões pôneis do plasma seminal pré-resfriamento com Sperm Filter foi possível aumentam a viabilidade do sêmen resfriado por até 48h a 5°C quando comparado a sêmen não separado ou centrifugado.

A seleção espermática por lã de vidro e Androcoll-E foram equivalentes em selecionar espermatozoides com maior viabilidade e capacidade de suportar o resfriamento.

REFERÊNCIAS

ABU-MUSA, A.; TAKAHASHI, K.; KITAO, M. Correlation between postswim-up hypoosmotic swelling test and in vitro fertilization results. **Int J Fertil**, v. 38, n. 2, p. 113-6, Mar-Apr 1993. ISSN 0020-725X (Print)

0020-725X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8097500> >.

AKCAY, E. et al. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. **Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 53, n. 9, p. 481-485, Nov 2006. ISSN 0931-184X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241388300010 >.

ALOMAR, M.; ALZOABI, M.; ZARKAWI, M. Kinetics of hydrogen peroxide generated from live and dead ram spermatozoa and the effects of catalase and oxidase substrates addition. **Czech Journal of Animal Science**, v. 61, n. 1, p. 1-7, 2016. ISSN 1212-1819. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000368231500001 >.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O. V., J. L. (Ed.). **Equine Reproduction**. . Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 80, p.717-718.

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. ISSN 0737-0806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987J236100007 >.

ARZONDO, M. M. et al. Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 201-9, Jul 1 2012. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537998> >.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Anim Reprod Sci**, v. 107, n. 3-4, p. 268-75, Sep 2008. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524507> >.

AZIZ, D. M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Anim Reprod Sci**, v. 92, n. 1-2, p. 1-8, Mar 2006. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023310> >.

AZIZ, D. M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1350-1356, Oct 1 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231992600010 >.

BACCETTI, B. Evolutionary trends in sperm structure. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, v. 85, n. 1, p. 29-36, 1986. ISSN 0300-9629 (Print)

0300-9629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2876819> >.

BACKMAN, T. et al. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **J Anim Sci**, v. 82, n. 3, p. 690-4, Mar 2004. ISSN 0021-8812 (Print)

0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032425> >.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Anim Reprod Sci**, v. 107, n. 3-4, p. 257-67, Sep 2008. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524506> >.

BALL, B. A. et al. Catalase activity in equine semen. **Am J Vet Res**, v. 61, n. 9, p. 1026-30, Sep 2000. ISSN 0002-9645 (Print)

0002-9645 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976731> >.

BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E. L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 203-5, Oct 2005. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261677> >.

BARRATT, C. L. et al. Hypoosmotic sperm swelling test as a sperm function test. **Fertil Steril**, v. 51, n. 2, p. 365-6, Feb 1989. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912786> >.

BARRIER-BATTUT, I. et al. Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 1, p. 64-71, Feb 2013. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524671> >.

BATELLIER, F. et al. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 degrees C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 229-36, Jul 15 1998. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734490> >.

BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Anim Reprod Sci**, v. 68, n. 3-4, p. 181-90, Dec 3 2001. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744263> >.

BEARER, E. L.; FRIEND, D. S. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. **J Electron Microsc Tech**, v. 16, n. 4, p. 281-97, Dec 1990. ISSN 0741-0581 (Print)

0741-0581 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250184> >.

BEDFORD, S. J. et al. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, n. 5, p. 955-67, Apr 1 1995. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727684> >.

BERGQVIST, A. S. et al. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa through Androcoll-E does not adversely affect their capacitation-like status, as measured by CTC staining. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 1, p. e74-8, Feb 2011. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546180> >.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 23, p. 19-24, Oct 1975. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060777> >.

BRINSKO, S. P. et al. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 735-742, Feb 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180566700004 >.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129-36, Jul 1 2000a. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10990354> >.

_____. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129-136, Jul 1 2000b. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089080300010 >.

BRITO, L. F. et al. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 745-50, Sep 1 2011. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612814> >.

BRITO, L. F. C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 12// 2007. ISSN 1534-7516. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751607000418> >.

BRITO, L. F. C. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, Nov 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185772600014 >.

CAMPOS, J. R. et al. Freezability of stallion spermatozoal subpopulations. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 313-313, Sep 2008. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258437800024 >.

CARD, C. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 558-67, Aug 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953630> >.

CARNEY, N. J. et al. Comparison of Pregnancy Rates from Transfer of Fresh Versus Cooled, Transported Equine Embryos. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 23-32, Jul 1991. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991FV26400003 >.

CASEY, P. J. et al. Column separation of motile sperm from stallion semen. **J Androl**, v. 14, n. 2, p. 142-8, Mar-Apr 1993. ISSN 0196-3635 (Print)

0196-3635 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8514620> >.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. Belo Horizonte: (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal), 2013. 104 ISBN 9788585584054.

CEPEA. **ESTUDO DO COMPLEXO DO AGRONEGÓCIO CAVALO**. CEPEA/ESALQ/USP: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada 2006.

CHECK, J. H. et al. The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. **Fertil Steril**, v. 52, n. 1, p. 159-61, Jul 1989. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2744184> >.

CHECK, J. H. et al. Correlation of semen analysis and hypoosmotic swelling test with subsequent pregnancies. **Arch Androl**, v. 20, n. 3, p. 257-60, 1988. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3190357> >.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-68, Aug 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993939> >.

CLAASSENS, O. E. et al. Comparison of motility characteristics and normal sperm morphology of human semen samples separated by percoll density gradient centrifugation. **Arch Androl**, v. 36, n. 2, p. 127-32, Mar-Apr 1996. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907673> >.

COCHRAN, J. D. et al. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 degrees C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 25-38, Jul 1984. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725933> >.

COETZEE, K. et al. Hypoosmotic swelling test in the prediction of male fertility. **Arch Androl**, v. 23, n. 2, p. 131-8, 1989. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2589908> >.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 1, p. 7-17, May 1 2003. ISSN 1059-910X (Print)

1059-910X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672118> >.

DELL'AQUA JR., J. A. et al. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science** v. 68, n. Abstracts p. 324-325, 2001.

DOTT, H. M. Morphology of stallion spermatozoa. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 23, p. 41-6, Oct 1975. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060816> >.

DOWSETT, K. F.; OSBORNE, H. G.; PATTIE, W. A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 463-72, Nov 1984. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725979> >.

DREVIUS, L. O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **J Reprod Fertil**, v. 28, n. 1, p. 41-54, Jan 1972. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5008006> >.

DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Exp Cell Res**, v. 42, n. 1, p. 136-56, Apr 1966. ISSN 0014-4827 (Print)

0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5948776> >.

ECOT, P. et al. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 245-8, Oct 2005. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265728> >.

ECOT, P. et al. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 56, p. 141-50, 2000. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20681126> >.

EDDY, E. M. O. B., D. A. . The spermatozoon. . In: KNOBIL, E. N., J. D. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 2, p.29-77.

FAWCETT, D. W. The mammalian spermatozoon. **Dev Biol**, v. 44, n. 2, p. 394-436, Jun 1975. ISSN 0012-1606 (Print)

0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/805734> >.

FERRER, M. S. et al. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1814-1823, Nov 2012. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310388200017 >.

GARNER, D. L. et al. Assessment of Spermatozoal Function Using Dual Fluorescent Staining and Flow Cytometric Analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138, Feb 1986. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986A094200016 >.

GATTI, J. L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 321-39, Jul 2004. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271463> >.

GOMES, G. M. G., L.P.M. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador **Rev Bras Reprod Anim** v. Supl, n. 6, p. 6, 2009.

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America-Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 119-&, Apr 1996. ISSN 0749-0739. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UF88100010 >.

HEITLAND, A. V. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Vet J**, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan 1996. ISSN 0425-1644 (Print)

0425-1644 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565953> >.

HENKEL, R. R. et al. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? **J Assist Reprod Genet**, v. 11, n. 8, p. 395-400, Sep 1994. ISSN 1058-0468 (Print)

1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606151> >.

HEUTELBECK, A. et al. Use of Density Centrifugation for Delayed Cryopreservation of Stallion Sperm: Perform Sperm Selection Directly after Collection or after Storage? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 1, p. 76-83, Feb 2015. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000348735300012 >.

HOOGEWIJS, M. et al. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. **Equine Vet J Suppl**, n. 40, p. 35-41, Nov 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082444> >.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 8, n. 1, p. 129-48, Apr 1992. ISSN 0749-0739 (Print)

0749-0739 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576546> >.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v. 10, p. 10, 1994.

JASKO, D. J. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, n. 6, p. 1241-1252, 6// 1992. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9290180Y> >.

JASKO, D. J. et al. Effect of Seminal Plasma Dilution or Removal on Spermatozoal Motion Characteristics of Cooled Stallion Semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, Jun 1991. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991FP07600001 >.

JASKO, D. J. et al. A Spectrophotometric Procedure for the Determination of Objective Measurements of Equine Spermatozoan Motility. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 945-954, May 1989. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989U443400001 >.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fertil**, v. 70, n. 1, p. 219-28, Jan 1984. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6694140> >.

JOHANNISSON, A. et al. Colloidal centrifugation with Androcoll-E prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Anim Reprod Sci**, v. 116, n. 1-2, p. 119-28, Nov 2009. ISSN 1873-2232 (Electronic)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217226> >.

JOHNSON, L. A. et al. STAINING SPERM FOR VIABILITY ASSESSMENT. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 37-47, 1995. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00004.x> >.

JOHNSON, T. M.; GARVIN, J. E. Separation of lymphocytes in human blood by means of glass wool column. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 102, p. 333-5, Nov 1959. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14407525> >.

KANEKO, S. et al. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. **Biol Reprod**, v. 35, n. 4, p. 1059-63, Nov 1986. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028515> >.

KANKOFER, M. et al. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1354-65, Mar 15 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725443> >.

KARESKOSKI, A. M. et al. Protein Composition of Seminal Plasma in Fractionated Stallion Ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. e79-e84, Feb 2011. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286382700023 >.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, Sep 2008a. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258437800008 >.

_____. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Anim Reprod Sci**, v. 107, n. 3-4, p. 249-56, Sep 2008b. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556156> >.

KARESKOSKI, M. et al. The Association of the Presence of Seminal Plasma and Its Components with Sperm Longevity in Fractionated Stallion Ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1073-1081, Dec 2011. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297512400021 >.

KATILA, T.; KARESKOSKI, M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v. 22, n. 2, p. 193-+, Mar-Apr 2006. ISSN 0177-7726. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236553900015 >.

KAYSER, J. P. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 4, p. 601-14, Oct 1992. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727163> >.

KELLER, A. et al. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science** v. 68, n. Abstracts p. 318-319, 2001.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. **Proc. Am Assoc Equine Practit.,** v. 21, p. 10, 1975.

KENNEY, R. M. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. . Proc. AAEP 1975. p.327-335.

KUISMA, P. et al. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Vet Scand,** v. 48, p. 14, 2006. ISSN 1751-0147 (Electronic)

0044-605X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987393> >.

LAGARES, M. A. et al. Effect of different extenders on sperm plasma membrane and fertility of equine cooled semen **Revista Brasileira de Ciência Veterinária,** v. 7, n. 3, p. 4, 2000.

LAGARES, M. A. et al. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia,** v. 32, n. 3, p. 163-7, May 2000. ISSN 0303-4569 (Print)

0303-4569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863971> >.

LEE, H. L. et al. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **J Vet Sci,** v. 10, n. 3, p. 249-55, Sep 2009. ISSN 1976-555X (Electronic)

1229-845X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687626> >.

LOOMIS, P. R. The equine frozen semen industry. **Anim Reprod Sci,** v. 68, n. 3-4, p. 191-200, Dec 3 2001. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744264> >.

_____. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Vet Clin North Am Equine Pract,** v. 22, n. 3, p. 663-76, Dec 2006. ISSN 1558-4224 (Electronic)

0749-0739 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129794> >.

LOVE, C. C. et al. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Theriogenology,** v. 60, n. 6, p. 1127-38, Oct 1 2003. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935852> >.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 23, p. 47-52, Oct 1975. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060826> >.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 1-2, p. 52-63, Apr 2008. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18255240> >.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 27, p. 47-51, 1979. ISSN 0449-3087 (Print)

0449-3087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/289825> >.

MCCUE, P. M. Evaluation of pH and Osmolarity of Semen. In: (Ed.). **Equine Reproductive Procedures**: John Wiley & Sons, Inc, 2014. p.399-400. ISBN 9781118904398.

MCDOWELL, K. J. et al. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone. **Res Vet Sci**, v. 61, n. 1, p. 33-7, Jul 1996. ISSN 0034-5288 (Print)

0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8819191> >.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 757-763, 2005. ISSN 0102-0935. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000600009&nrm=iso >.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-81, Jun 2005. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910920> >.

MORATO, R. et al. Pre-selection by double layer density gradient centrifugation improves the fertilising capacity of frozen-thawed, capacitated stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-4, p. 62-68, Jun 2013. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320493100009 >.

MORRELL, J. M. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 436-440, Aug 2012. ISSN 0737-0806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308258100004 >.

MORRELL, J. M. et al. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 879-84, Oct 1 2009. ISSN 1879-3231 (Electronic)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604571> >.

MORRELL, J. M. et al. Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 4, p. 642-5, Aug 2011. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114793> >.

MORRELL, J. M. et al. Techniques for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 333-334, Sep 2008. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258437800044 >.

MORTIMER, D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. **Reprod Fertil Dev**, v. 6, n. 1, p. 25-31, 1994. ISSN 1031-3613 (Print)

1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8066218> >.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biol Reprod**, v. 71, n. 2, p. 540-7, Aug 2004. ISSN 0006-3363 (Print)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084484> >.

NASR-ESFAHANI, M. H. et al. Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. **J Assist Reprod Genet**, v. 19, n. 10, p. 477-82, Oct 2002. ISSN 1058-0468 (Print)

1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12416652> >.

NEILD, D. M. et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v. 32, n. 6, p. 351-5, Nov 2000. ISSN 0303-4569 (Print)

0303-4569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131844> >.

NETO, C. R. et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1120-1123, Apr 15 2013. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317325300013 >.

NETO, C. R. M., G. A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 40-43, Jan 2013. ISSN 0737-0806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313388600008 >.

NIE, G. J.; WENZEL, J. G. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 1005-18, Mar 1 2001. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11291907> >.

NUNES, D. B. et al. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p. 434-9, Mar 3 2008. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681679> >.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 30 n. 1/2, p. 15, an./jun. 2006. 2006.

OEHNINGER, S. et al. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. **J Androl**, v. 11, n. 5, p. 446-52, Sep-Oct 1990. ISSN 0196-3635 (Print)

0196-3635 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2254178> >.

OLACIREGUI, M. et al. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 91-95, Feb 2014. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000332190100013 >.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 15 1995. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727781> >.

PAULSON, J. D.; POLAKOSKI, K. L. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. **Fertil Steril**, v. 28, n. 2, p. 178-81, Feb 1977. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/576215> >.

PICKETT, B. W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A. O. V., J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Filadelfia: Lea & Fabiger, 1993. p.746-754.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SUTHERLAND, T. M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **J Anim Sci**, v. 31, n. 4, p. 713-28, Oct 1970. ISSN 0021-8812 (Print)

0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5455685> >.

PICKETT, B. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 26, n. 2, p. 167-74, Feb 1975. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1126461> >.

PICKETT, B. W. B., D.G. Procedures for preparation, collection, evaluation, and insemination of stallion semen. . **Colo. State Univ. Exp. Sta. Anita. Reprod. Lab. General Series 935**, 1973.

PIOMBONI, P. et al. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. **Arch Androl**, v. 52, n. 1, p. 51-9, Jan-Feb 2006. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16338870> >.

PORTUS, B. J.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 6, p. 515-519, Nov 2005. ISSN 0425-1644. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233130600007 >.

PROVINCE, C. A. et al. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 925-934, 1985/06/01 1985. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X8590010X> >.

RAMIRES NETO, C. et al. 65 ARE “BAD FREEZER” STALLIONS ALSO “BAD COOLER” STALLIONS? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 125-126, 2014. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/RDv27n1Ab65> >.

RANA, N. et al. Glass wool-filtered spermatozoa and their oocyte penetrating capacity. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 6, n. 5, p. 280-4, Oct 1989. ISSN 0740-7769 (Print)

0740-7769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2632658> >.

RHEMREV, J. et al. Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Fertil Steril**, v. 51, n. 4, p. 685-90, Apr 1989. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924937> >.

RIGBY, S. L. et al. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 171-180, Dec 3 2001. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172960400005 >.

ROOSEN-RUNGE, E. C. The process of spermatogenesis in mammals. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 37, p. 343-77, Aug 1962. ISSN 1464-7931 (Print)

0006-3231 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14493721> >.

SANCHEZ, R. et al. Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligozoospermic patients with leukocytospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 13, n. 6, p. 489-494, Jul 1996. ISSN 1058-0468. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UW20900007 >.

SANCHEZ SARMIENTO, C. A. et al. Comparison between swim-up and glass wool column filtration of human semen in a gamete intrafallopian transfer program. **Arch Androl**, v. 36, n. 2, p. 155-60, Mar-Apr 1996. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8907677> >.

SAUER, R.; COULAM, C. B.; JEYENDRAN, R. S. Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. **Andrologia**, v. 44 Suppl 1, p. 248-51, May 2012. ISSN 1439-0272 (Electronic)

0303-4569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689135> >.

SCHURMANN, A. et al. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. **Cell Tissue Res**, v. 307, n. 2, p. 237-42, Feb 2002. ISSN 0302-766X (Print)

0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11845330> >.

SHERMAN, J. K.; PAULSON, J. D.; LIU, K. C. Effect of glass wool filtration on ultrastructure of human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 36, n. 5, p. 643-7, Nov 1981. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7308506> >.

SIEME, H. et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 2, p. 134-140, Apr 2003. ISSN 0936-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181743500009 >.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and Frozen Stallion Semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. ISBN 9780978590543. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=0WHcPQAACAAJ> >.

STUHTMANN, G. et al. EquiPure (TM) Pro, a method for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 53-53, Feb 2010. ISSN 0936-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273688500154 >.

TANPHAICHITR, N. et al. Comparison of the in vitro fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and Percoll gradient centrifugation. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 5, n. 3, p. 119-22, Jun 1988. ISSN 0740-7769 (Print)

0740-7769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3171318> >.

TANPHAICHITR, N. et al. An increase in in vitro fertilization ability of low-density human sperm capacitated by multiple-tube swim-up. **Fertil Steril**, v. 48, n. 5, p. 821-7, Nov 1987. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3666184> >.

TOSHIMORI, K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. **Cell Tissue Res**, v. 293, n. 2, p. 177-87, Aug 1998. ISSN 0302-766X (Print)

0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662641> >.

TREIN, C. R. et al. Cooling rate, centrifugation and percoll selection in equine semen stored at +4 degrees C. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 226-8, Oct 2005. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265720> >.

TROKEY, D. E.; MERILAN, C. P. Effect of Added Cold Shocked Cells Upon the Viability of Pony Stallion Spermatozoa. **Theriogenology**, v. 18, n. 6, p. 723-725, 1982. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1982PU03100011 >.

VAN DER VEN, H. H. et al. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. **Hum Reprod**, v. 3, n. 1, p. 85-8, Jan 1988. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3350941> >.

VAN HUFFEL, X. M. et al. Photomicrographic evaluation of stallion spermatozoal motility characteristics. **Am J Vet Res**, v. 46, n. 6, p. 1272-5, Jun 1985. ISSN 0002-9645 (Print)

0002-9645 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4026005> >.

VARNER, D. D. **composition of seminal extenders and its effect motility of equine spermatozoa.** Proceedings of the annual meeting of the society for theriogenology: 166-150 p. 1991.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-62, Aug 2008. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495237> >.

VARNER, D. D. et al. Effects of Semen Fractionation and Dilution Ratio on Equine Spermatozoal Motility Parameters. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 709-723, Nov 1987. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987L332800017 >.

_____. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-54, 1988. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726426> >.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 degrees C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-25, Oct 1989. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726699> >.

VEERAMACHANENI, D. N.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 22, n. 3, p. 683-92, Dec 2006. ISSN 1558-4224 (Electronic)

0749-0739 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129796> >.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 115-36, Oct 2005. ISSN 0378-4320 (Print)

0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112529> >.

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-17, Oct 15 1997. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728182> >.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **J Reprod Fertil**, v. 62, n. 2, p. 483-92, Jul 1981. ISSN 0022-4251 (Print)

0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7195939> >.

WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reprod Fertil Dev**, v. 9, n. 3, p. 279-84, 1997. ISSN 1031-3613 (Print)

1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261876> >.

WONG, P. C. et al. Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. **Fertil Steril**, v. 45, n. 1, p. 97-100, Jan 1986. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3943654> >.

WU, G. J. et al. Less NO production and better motion parameter in human sperm by swim-up processing. **Arch Androl**, v. 50, n. 5, p. 373-7, Sep-Oct 2004. ISSN 0148-5016 (Print)

0148-5016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551752> >.

YAMAMOTO, Y. et al. Comparisons of sperm quality, morphometry and function among human sperm populations recovered via SpermPrep II filtration, swim-up and Percoll density gradient methods. **Andrologia**, v. 29, n. 6, p. 303-10, Nov-Dec 1997. ISSN 0303-4569 (Print)

0303-4569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430435> >.

Anexo A: Publicação no Journal Reproduction Fertility and development

Impact Factor: 2.40

Pessoa, G. A., Trentin, J. M., Martini, A. P., Dotto, D. R., Centeno, L. A. M., Jardim, M. L., Aires, K. V., and Rubin, M. I. B. (2013). 180 SPERM SELECTION OF STALLION PONIES THROUGH GLASS WOOL. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 204–205.

<http://dx.doi.org/10.1071/RDV26N1AB180>

180 SPERM SELECTION OF STALLION PONIES THROUGH GLASS WOOL

G. A. Pessoa^{A,B}, J. M. Trentin^{A,B}, A. P. Martini^B, D. R. Dotto^B, L. A. M. Centeno^B,
M. L. Jardim^B, K. V. Aires^B, and M. I. B. Rubin^{A,B}

^AUniversidade Federal do Rio Grande do Sul - Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^BUniversidade Federal de Santa Maria - Embryolab, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

Two techniques of sperm concentration (centrifugation or filtering) and sperm separation technique with glass wool were applied to the sperm samples collected from 3 pony stallions (6 ejaculates; 2 from each stallion). Ejaculates were extended to a final concentration of 50×10^6 spermatozoa mL⁻¹ using a nonfat dry milk-based extender and evaluations occurred at 24, 48, and 72 h after immediate ejaculate dilution and cooling. Each stallion was considered as a block, and semen from each stallion was assigned to 4 treatments: Group A (control): extended semen alone; Group B: extended-centrifuged semen; Group C: extended-sperm filtered semen; Group D: extended-glass wool-separated semen. All groups were tested for pH, osmolarity, motility, morphology, membrane functionality (hyposmotic), and cell viability (MTT assay). The experimental design was performed using a split-plot model. Data analysis at the level of 5% was performed using ANOVA and Bonferroni as post-hoc test. Data are presented as mean \pm standard error. Group D had the highest rate of viable cells ($P < 0.05$) after the separation procedure (Table 1). Group B had a higher percentage of cells with tail defects after processing compared with the controls and Groups A, C, and D ($P < 0.05$). More than 60% of the cells retained on the filter showed defects ($P < 0.001$). Progressive motility was greater in group D at 0, 24, and 48 h ($P < 0.05$). Seventy-two hours after cooling, motility in groups A and B was lower than in Group D ($P < 0.01$). Group D showed a higher number of cells with mitochondrial activity during the cooling period. In conclusion, the technique of sperm selection by gravity using a glass wool filter resulted in an increased number of viable sperms after cooling pony semen for 24, 48, and 72 h.

Sperm Injection

Reproduction, Fertility and Development 205

Table 1. Effect of sperm concentration and separation techniques on mean \pm standard error percent of intact sperm from 3 stallions ponies (2 ejaculates/pony) stained with eosin-nigrosin

Morphology characteristic	Ejaculate (%)	Control (%)	Centrifugate (%)	Sperm filter (%)	Glass wool (%)	P-value
Acrosome	1.57 \pm 0.5	1.45 \pm 0.37	1.23 \pm 0.31	1.27 \pm 0.49	0 \pm 0	>0.05
Head	7.91 \pm 2.96	6.66 \pm 4.12	8.0 \pm 3.66	7.51 \pm 3.81	3.42 \pm 0.62	>0.05
Midpiece	6.43 \pm 2.18	4.03 \pm 1.48	3.75 \pm 1.27	3.0 \pm 1.82	1.77 \pm 2.45	>0.05
Tail	0.66 \pm 2.11 ^a	3.14 \pm 2.69 ^a	6.97 \pm 2.99 ^b	3.63 \pm 3.03 ^a	1.05 \pm 0.75 ^a	<0.05
Intact cell	84.43 \pm 3.11 ^a	82.72 \pm 2.8 ^a	80.05 \pm 3.76 ^b	83.59 \pm 2.34 ^a	93.76 \pm 3.35 ^b	<0.05
Abnormal cell	16.57 \pm 2.11 ^a	17.28 \pm 4.1 ^a	19.95 \pm 2.7 ^a	16.41 \pm 0.8 ^a	7.24 \pm 3.8 ^b	<0.05