

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Rômulo Oliveira Fernandes da Silva

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SÊMEN EQUINO PRÉ E PÓS-
CONGELAMENTO APÓS SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES
COM A UTILIZAÇÃO DE LÃ DE VIDRO**

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Rômulo Oliveira Fernandes da Silva

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SÊMEN EQUINO PRÉ E PÓS-CONGELAMENTO APÓS
SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES COM A UTILIZAÇÃO DE LÃ DE VIDRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Alfredo Quitês Antoniazzi
Coorientador: Prof. William Schoenau

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Rômulo Oliveira Fernandes da Silva

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SÊMEN EQUINO PRÉ E PÓS-CONGELAMENTO APÓS
SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES COM A UTILIZAÇÃO DE LÃ DE VIDRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2018:

Alfredo Quites Antoniazzi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Ricardo Pozzobon, Dr. (UFSM)

Henrique Kurtz Löf, Dr. (LRE)

AGRADECIMENTOS

Aos professores Alfredo Quites Antoniazzi e William Schoenau pelos ensinamentos e incentivo.

À professora Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade.

Aos meus pais, Luiz Carlos Fernandes da Silva e Marinez Silveira de Oliveira, pelo apoio incondicional.

À minha esposa Giana Burtet Prado Lima e meu filho Álvaro Prado Lima da Silva pelo incentivo de sempre, o amor e pela compreensão da ausência em alguns momentos.

Aos colegas da pós-graduação por terem participado no meu aprendizado profissional.

Aos estagiários pela amizade e colaboração na realização do experimento.

A todos os profissionais que tive a oportunidade de acompanhar durante minha trajetória.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SÊMEN EQUINO PRÉ E PÓS- CONGELAMENTO APÓS SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES COM A UTILIZAÇÃO DE LÃ DE VIDRO

AUTOR: Rômulo Oliveira Fernandes da Silva

ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

O mercado de equinos está em constante crescimento, com isso a busca pelo aperfeiçoamento na criação e por melhores exemplares se intensifica e o congelamento de sêmen auxilia nesse processo, sendo uma importante ferramenta para preservar a genética de animais considerados superiores dentro de suas raças. Neste estudo avaliou-se a técnica de seleção espermática através da lã de vidro, centrifugação e Sperm Filter[®] sobre a motilidade, vigor, pH, concentração, morfologia e integridade de membrana do sêmen equino congelado. O sêmen de cinco pôneis da raça Brasileira foi diluído em diluente a base de leite em pó desnatado na diluição de 1:1 e distribuído em três grupos: centrifugação (C), filtração em lã de vidro + centrifugação (LC) e filtração em lã de vidro + Sperm Filter[®] (LS). Foram utilizados quatro ejaculados de cada pônei. Nos três grupos avaliados após o descongelamento não houve diferença nos parâmetros de motilidade local, vigor e pH. O percentual maior de motilidade total ($52,50\% \pm 7,16$ e $48,50\% \pm 5,87$) ($P < 0,01$) e motilidade progressiva ($41,75\% \pm 7,30$ e $38,25\% \pm 6,93$) ($P < 0,01$) foi detectado nos grupos C e LC, respectivamente. Ao avaliar a integridade da membrana espermática, resultados superiores foram detectados nos grupos C e LC em relação ao LS ($43,25\% \pm 7,48$, $42,35\% \pm 8,39$ e $29,10\% \pm 12,31$) ($P < 0,01$). A concentração espermática foi superior no grupo C ($79,65 \pm 27,15 \times 10^6$ sptz/mL) em relação ao LC e LS ($43,97 \pm 18,67 \times 10^6$ sptz/ml e $25,95 \pm 21,84 \times 10^6$ sptz/mL) ($P < 0,01$). Na avaliação computadorizada da motilidade espermática, não houve diferença entre os grupos. Ao avaliar a morfologia espermática, encontrou-se menos defeitos morfológicos após as etapas de seleção espermática em relação a morfologia espermática imediata após a coleta. Sugere-se que, quando da preparação do sêmen para congelamento, o uso da centrifugação ou lã de vidro + centrifugação seja o protocolo de eleição.

Palavras-chave: criopreservação, seleção espermática, garanhão.

ABSTRACT

EVALUATION OF PARAMETERS PRE AND POST-FREEZE EQUINE SEMEN AFTER SPERMATOZOA SEPARATION WITH THE USE OF GLASS WOOL

AUTHOR: Rômulo Oliveira Fernandes da Silva

ADVISOR: Alfredo Quites Antoniazzi

The equine market is constantly growing, so the search for perfection in breeding and for better specimens intensifies and the freezing of semen helps in this process, being an important tool to preserve the genetics of animals considered superior within their breeds. In this study the sperm selection through glass wool, centrifugation and Sperm Filter[®] were evaluated on the motility, vigor, pH, concentration, morphology and membrane integrity of the frozen equine semen. The semen of five Brazilian ponies was diluted in an extender based on skim milk powder at a dilution of 1:1 and distributed in three groups: centrifugation (C), glass wool filtration + centrifugation (LC) and glass wool filtration + Sperm Filter[®] (LS). Four ejaculates of each pony were used. In the three groups evaluated after thawing there was no difference in the parameters of local motility, vigor and pH. The highest percentage of total motility ($52.50\% \pm 7.16$ and $48.50\% \pm 5.87$) ($P < 0.01$) and progressive motility ($41.75\% \pm 7.30$ and $38.25\% \pm 6.93$) ($P < 0.01$) was detected in groups C and LC, respectively. When evaluating sperm membrane integrity, superior results were detected in groups C and LC in relation to LS ($43.25\% \pm 7.48$, $42.35\% \pm 8.39$ and $29.10\% \pm 12.31$) ($P < 0.01$). Sperm concentration was higher in group C ($79.65 \pm 27.15 \times 10^6$ sptz/mL) than LC and LS ($43.97 \pm 18.67 \times 10^6$ sptz/ml and $25.95 \pm 21.84 \times 10^6$ sptz/mL) ($P < 0.01$). In the computerized evaluation of sperm motility there was no difference between groups. When evaluating sperm morphology, we found fewer morphological defects after sperm selection in relation to immediate sperm morphology after collection. It suggested that, when preparing the semen for freezing, the use of centrifugation or glass wool + centrifugation is the protocol of choice.

Keywords: cryopreservation, sperm selection, stallion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Valores médios e desvio padrão da concentração espermática de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lâ de vidro + centrifugação (LC) e lâ de vidro + Sperm Filter[®] (LS)..... 39
- Figura 2 – Médias e desvio padrão da motilidade espermática total de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lâ de vidro + centrifugação (LC) e lâ de vidro + Sperm Filter[®] (LS).40
- Figura 3 – Médias e desvio padrão da motilidade espermática progressiva de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lâ de vidro + centrifugação (LC) e lâ de vidro + Sperm Filter[®] (LS).41
- Figura 4 – Médias e desvio padrão do vigor espermático de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lâ de vidro + centrifugação (LC) e lâ de vidro + Sperm Filter[®] (LS).....42
- Figura 5 – Médias e desvio padrão do percentual de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira reagentes ao Teste Hiposmótico após o descongelamento nos grupos centrifugação (C), lâ de vidro + centrifugação (LC) e lâ de vidro + Sperm Filter[®] (LS).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da morfologia espermática de pôneis da raça Brasileira antes do congelamento e após o descongelamento nos grupos centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter® (LS).....44

Tabela 2 – Médias e desvio padrão da concentração espermática, motilidade total, progressiva, circular, rápida, lenta, local e espermatozoides imóveis analisadas após o descongelamento através do CASA nos grupos centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter® (LS).....45

LISTA DE ABREVIATURAS

C – centrifugação
LC – lâ de vidro + centrifugação
LS – lâ de vidro + Sperm Filter®
°C – graus Celsius
h – horas
min – minutos
g – força centrífuga
mL – mililitro
mg – miligramas
kg - quilogramas
% - percentagem
P – valor de P ou probabilidade de significância
pH – potencial de hidrogênio
HOST – teste hiposmótico
ROS – espécies reativas de oxigênio
GPC – glicerilfosforilcolina
ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoides
Sptz – espermatozoide
CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis
H₂O – água
mOsm – miliosmóis
IMOV – espermatozoides imóveis
MT – motilidade total
MP – motilidade progressiva
MC – motilidade circular
MR – motilidade rápida
MLENTA – motilidade lenta
MLOCAL – motilidade local

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 ESPERMATOZOIDE EQUINO.....	13
2.2 SELEÇÃO ESPERMÁTICA E REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL.....	14
2.2.1 LÃ DE VIDRO.....	16
2.2.2 CENTRIFUGAÇÃO.....	17
2.2.3 SELEÇÃO ESPERMÁTICA.....	18
2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN	19
2.3.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA	19
2.3.2 FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA – TESTE HIPOSMÓTICO	19
2.3.4 pH	20
2.3.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	20
2.3.6 SISTEMA COMPUTADORIZADO DE ANÁLISE ESPERMÁTICO (CASA)	21
3. CAPÍTULO 1	23
4. CONCLUSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Na reprodução equina, independente da maneira implantada, seja em manada ou utilizando biotecnologias avançadas, alguns fatores são fundamentais, como a fertilidade das éguas, dos garanhões, o manejo reprodutivo e o ambiente. O macho, por atender um grande número de fêmeas, tem na fertilidade um ponto crítico no sucesso do programa reprodutivo. A avaliação precisa da fertilidade do garanhão é a mais demorada, pois demanda um número elevado de matrizes férteis para serem acasaladas. Deste modo, há necessidade de se estabelecer a capacidade reprodutiva de um garanhão antes de iniciar a estação reprodutiva através de exame físico completo e análise da qualidade espermática. No entanto, os testes existentes identificam garanhões que não possuem fertilidade adequada, porém, os sub-férteis podem não ser identificados. Embora vários testes de função espermática se correlacionam com a fertilidade no campo, a maioria examina apenas um único ou uma pequena quantidade de requisitos necessários que o espermatozoide deve possuir para fertilizar um oócito *in vivo*. Portanto, são mais úteis para identificar causas específicas de subfertilidade do que para prever o nível de fertilidade. Por outro lado, combinar os resultados de vários testes aumenta a confiabilidade da estimativa da fertilidade (COLENBRANDER et al., 2003).

O acréscimo da demanda nos sistemas de criação equina possibilitou o desenvolvimento de técnicas que resultam em um melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo destes animais (BRANDÃO, 2008). A criopreservação do sêmen é um importante instrumento no melhoramento genético, pois maximiza o uso de bons reprodutores (FÜRST, 2005). Durante o procedimento algumas etapas podem danificar os espermatozoides, como a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (AMANN & PICKETT, 1987).

A refrigeração quando é feita de maneira inadequada pode causar choque térmico, causando danos parcialmente irreversíveis aos espermatozoides, como alteração no padrão de movimento (circular e retrógrado), diminuição da motilidade, lesões de acrossoma, danos à membrana plasmática, perda dos componentes intracelulares e redução da atividade metabólica (GRAHAM, 1996). O controle da taxa de resfriamento entre as temperaturas críticas, de 20°C a 5°C, com a adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluente, pode minimizar esses efeitos. A diminuição da temperatura de 20°C a 5°C é a fase onde ocorre o estresse inicial, ocorrendo alterações na membrana plasmática, o que dificultam a permeabilidade dos crioprotetores no meio intracelular (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002),

devido à evolução das fases do processo, indo do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996).

Durante o processo de congelamento, antes que ocorra a formação de cristais, a suspensão de espermatozoides alcança temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento). Quando começa a formação de cristais de gelo, ocorre um aumento na temperatura, necessário para a cristalização, porém deletério para os espermatozoides, mas minimizado pela curva adequada de congelamento (SQUIRES, 1999). Quando o processo de congelamento é rápido, não ocorre perda adequada de água e com isso formam-se cristais de gelo no interior da célula. Por outro lado, quando ocorre de maneira lenta, a água extracelular congela, ocorrendo a concentração de soluto e expondo a célula a uma concentração hipertônica momentaneamente, que promove perda rápida de água e ocasiona a desidratação celular (MAZUR, 1985). A desidratação e a perda de água são eventos esperados, pois reduzem a formação de grandes canais de gelo dentro da célula que causam danos às estruturas internas e/ou na membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

Existe grande variabilidade de parâmetros no ejaculado de garanhões e isso é relevante no momento de preparar o ejaculado para a inseminação artificial, desta maneira, obter espermatozoides concentrados, ou a maioria das células viáveis são de extrema importância para uso a fresco ou para preservação (SIEME et al., 2003). A seleção espermática muitas vezes é confundida com as técnicas de remoção do plasma seminal e concentração espermática. A centrifugação e o uso de filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter[®]) são técnicas de concentração/remoção parcial ou total do plasma seminal (SIEME et al., 2003; NETO, 2013). Entre as técnicas de seleção espermática pode-se citar a separação por gradiente (Percoll[®]), filtração (Sephadex, Glass Wool e membranas filtrantes), separação por migração ascendente (*Swim-up*) e centrifugação por suspensão coloidal (Androcoll-E[®]) (SIEME et al., 2003; CAMPOS et al., 2008; MORRELL et al., 2008; STUHTMANN et al., 2010; MORRELL, 2012; MORATÓ et al., 2013; HEUTELBECK et al., 2015).

A centrifugação é uma importante ferramenta a ser utilizada antes da adição do diluente para criopreservação pois propicia aumento considerável da motilidade e da taxa de concepção (MARTIN et al., 1979). No entanto, a centrifugação não é inócua aos espermatozoides e pode reduzir em alguns casos sua motilidade (DELL'AQUA JR et al., 2001; KELLER et al., 2001).

O uso da lã de vidro é aplicado em diversas espécies de mamíferos de forma semelhante ao *Swim-up* e Percoll[®] para a seleção do sêmen utilizado em biotécnicas *in vitro*. Na espécie equina, Sieme et al. (2003) utilizaram seringas de 5mL contendo lã de vidro e filtraram o sêmen fresco selecionando desta forma espermatozoides com defeitos menores de cabeça e maior

motilidade progressiva quando comparado à técnica do Percoll[®] e ao grupo controle (sêmen fresco não filtrado), porém, houve baixa recuperação de células e o percentual de alterações de cauda não diferiu do grupo controle.

A técnica de filtração por lã de vidro utilizada em bovinos apresenta baixo custo, é simples e eficaz para selecionar espermatozoides funcionalmente competentes para biotecnologias reprodutivas (ARZONDO et al., 2012). Essas vantagens podem ser aplicadas à espécie equina visando melhorar a viabilidade espermática após o descongelamento, com isso, melhorando os índices de fertilidade com o uso de inseminação artificial com sêmen congelado. Portanto, essa dissertação teve como objetivo avaliar os parâmetros espermáticos logo após o descongelamento utilizando a seleção espermática com lã de vidro pré-congelamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPERMATOZOIDE EQUINO

O espermatozoide é formado por três regiões, que são recobertas pela membrana plasmática, a cabeça que contém o DNA da célula, mede 6,00 µm de comprimento e 3,00 µm de largura, é uma estrutura vital para a interação do espermatozoide com o oócito, a peça intermediária, mede 1,00 µm de largura e a sua área corresponde a 2,00 µm², está envolvida na produção de energia por acondicionar as mitocôndrias e por fim o flagelo, relacionado com a motilidade espermática (EDDY, 1988; HIDALGO et al., 2005).

O espermatozoide resulta do processo da espermatogênese devido as divisões mitóticas, meióticas e fases pós meióticas que ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos (FAWCETT, 1975). As células são especializadas em armazenamento e transporte de material genético (AURICH, 2006). Esta complexa estrutura tem a função de garantir a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozoide para o oócito, onde ocorre a união dos pronúcleos masculino e feminino, produzindo o zigoto (EDDY O' BRIEN, 1994).

A estrutura que envolve a célula, a membrana plasmática, é composta por moléculas lipídicas e proteicas que define os seus limites e mantém as diferenças entre o ambiente extracelular e o citosol (AMANN & GRAHAM, 1992). Em temperatura corpórea, a membrana plasmática encontra-se na forma de um mosaico fluido onde as proteínas estão livres para se moverem entre os fosfolípidios bilaterais, uma vez que a própria função necessita que as

proteínas estejam aptas para moverem-se dentro da membrana, tornando-a uma estrutura dinâmica (GADELLA et al., 2001). As alterações de temperatura a que a membrana é exposta ou um desequilíbrio na composição relativa entre fosfolipídios e colesterol, são os principais fatores que afetam a fluidez (HAMMERSTEDT et al., 1990). A manutenção no estado líquido dos lipídeos e das proteínas da membrana permite a movimentação livre dos componentes, garantindo suas interações (FLESCH & GADELLA, 2000). As alterações na membrana induzem alterações de acrossoma causando redução da longevidade e capacidade de fertilização espermática após inseminação (MARSHBURN et al., 1992). Alterações fisiológicas ocorrem na membrana plasmática após a ejaculação e estão relacionadas a capacitação, que envolve entre outros processos, a aquisição da capacidade fecundante resultando em um padrão diferente de motilidade designada de hipermotilidade (YANAGIMACHI, 1994).

A membrana plasmática do espermatozoide equino apresenta um teor elevado de colesterol de cerca de 37%. No entanto, a percentagem de colesterol não só difere entre espécies, mas também entre machos dentro de uma mesma espécie e entre ejaculados do mesmo garanhão (GADELLA et al., 2001).

2.2 SELEÇÃO ESPERMÁTICA E REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL

O sêmen é composto pelo plasma seminal e os espermatozoides. O plasma seminal é um fluido produzido pelo epidídimo, a rede testicular e glândulas sexuais acessórias, sendo liberado em frações durante a ejaculação por meio das contrações uretrais. A primeira fração ejaculada no equino é a pré-espermática, translúcida e proveniente das glândulas bulbouretrais e da próstata, e possui a função de limpeza uretral. A segunda fração possui aspecto leitoso, é a porção rica em espermatozoides, ergotioneína e glicerilfosforilcolina (GPC), e é composta por secreções da ampola do ducto deferente e do epidídimo. A terceira fração possui poucos espermatozoides, grandes quantidades de ácido cítrico e gel oriundos das glândulas vesiculares, que tem a função de carrear os espermatozoides restantes na uretra (AMANN & GRAHAM, 1993). Existe uma variabilidade individual entre garanhões e entre ejaculados do mesmo garanhão em relação a composição bioquímica e proteica do plasma seminal dificultando a obtenção de resultados sólidos relacionados a esses componentes (enzimas, íons, hormônios e proteínas) (DACHEUX et al., 2003).

A maioria das enzimas presentes no plasma seminal funciona como agente antioxidante, evitando a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas de oxigênio e

fragmentação do DNA espermático (BALL et al., 2000). No plasma seminal existem substâncias moduladoras da reposta inflamatória uterina pós-cobertura, auxiliando na limpeza uterina de éguas suscetíveis a endometrite pós-cobertura (TROEDSSON, 1999). Também estão presentes ocitocina e prostaglandinas, que agem promovendo a contração uterina visando o transporte do gameta masculino até o local da fertilização (KATILA, 2001). Para minimizar os efeitos da peroxidação lipídica, atuam as substâncias antioxidantes como a ergotioneína, cisteína e a glutathione peroxidase (AMANN & GRAHAM, 1993).

O volume do ejaculado do garanhão pode chegar a 200mL, sendo 50 a 100 vezes maior do que o ejaculado de carneiros e 10 a 20 vezes maior do que o ejaculado de touros. Porém, o número total de espermatozoides por ejaculado é similar nas três espécies, salientando a grande contribuição do plasma seminal no sêmen de equinos (VARNER et al., 1987).

Grandes concentrações de plasma seminal no resfriamento do sêmen equino são prejudiciais a motilidade e fertilidade (JASKO et al., 1992). Para reduzir esses efeitos, o sêmen pode ser diluído, com pelo menos, quatro partes de diluente para uma parte de sêmen, não excedendo o percentual de 20% de plasma seminal (VARNER et al., 1987).

As técnicas de congelamento de sêmen equino preconizam a retirada do plasma seminal, pois existe efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas quando não é removido (PAPA et al., 2008). Os efeitos do plasma seminal sobre a motilidade espermática de alguns garanhões se tornam mais evidentes em condições de refrigeração (RIGBY et al., 2001). Animais que tiveram alta redução na motilidade espermática após o processo de refrigeração convencional (5°C/24-48h), demonstraram um aumento na motilidade espermática quando houve remoção parcial do plasma seminal antes da refrigeração. A adição de plasma seminal em concentrações reduzidas (<5%) melhora a qualidade do sêmen equino descongelado, diferente de quando há remoção total ou adição de altas concentrações (25%) de plasma seminal (ALGHAMDI et al., 2002).

A criopreservação de sêmen aumenta a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), que são responsáveis por induzir dano ao DNA espermático e causar rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozoides por meio da peroxidação lipídica da membrana plasmática (BALL et al., 2001).

Diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 5%, 25% e 50%) foram testados na proteção contra o estresse oxidativo e danos aos espermatozoides equinos criopreservados, e se observou que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Porém, concentrações acima de 25%, levam a uma redução na viabilidade dos

espermatozoides, indicando que baixas concentrações de plasma seminal são essenciais para a manutenção da qualidade espermática (ALMEIDA, 2006).

A adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de garanhões de baixa congelabilidade aumentou a resistência ao processo de congelamento e descongelamento, diferente de quando se adicionou plasma seminal oriundo de garanhões de baixa congelabilidade. Isso evidencia que a viabilidade individual na composição do plasma seminal é um dos fatores que determinam a congelabilidade do sêmen de garanhões (AURICH et al., 1996).

O Sperm Filter[®] é composto por uma membrana hidrofílica sintética com poros de 2 µm que retêm os espermatozoides, possibilitando a passagem somente do plasma seminal (NETO et al., 2013). Esse filtro se caracteriza por ser uma técnica eficiente na concentração espermática e por remover o plasma seminal sem causar danos as células, e foi equivalente para remoção do plasma seminal do sêmen de garanhões comparado com a centrifugação e centrifugação com colóide (ALVARENGA, 2012).

A seleção espermática muitas vezes é confundida com as técnicas de remoção do plasma seminal e concentração espermática. A centrifugação e o uso de filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter[®]) são técnicas de concentração/remoção parcial ou total do plasma seminal, mas não permitem selecionar espermatozoides (SIEME et al., 2003; NETO, 2013). Entre as técnicas de seleção espermática pode-se citar a separação por gradiente (Percoll[®]), filtração (Sephadex, lâ de vidro e membranas filtrantes), separação por migração ascendente (*Swim-up*) e centrifugação por suspensão coloidal (Androcoll-E[®]) (SIEME et al., 2003; CAMPOS et al., 2008; MORRELL et al., 2008; STUHTMANN et al., 2010; MORRELL, 2012; MORATÓ et al., 2013; HEUTELBECK et al., 2015).

2.2.1 LÃ DE VIDRO

Acredita-se que o mecanismo de funcionamento da lâ de vidro para a seleção espermática ocorra através da apreensão mecânica dos espermatozoides danificados, que são incapazes de passar pela barreira física da lâ de vidro (LEE et al, 2009).

Em bovinos, utilizando diferentes métodos de seleção espermática como filtração de lâ de vidro, Sephadex e Percoll[®], foi avaliado a funcionalidade da membrana através de coloração fluorescente CFDA/PI e HOST, as amostras de filtração de lâ de vidro apresentaram os maiores valores em ambos os métodos de avaliação. Estes resultados indicam que a filtração em lâ de

vidro é o melhor método para recuperar espermatozoides com membranas plasmáticas intacta (LEE et al., 2009).

Em humanos, a filtração por lã de vidro foi realizada utilizando uma pipeta de Pasteur de vidro de 5 polegadas preenchida com 40-60mg de fibra de lã de vidro, com a finalidade de reduzir a viscosidade do sêmen e eliminar detritos e espermatozoides aglutinados. Houve eliminação de 98% de espermatozoides mortos e redução na viscosidade do sêmen, que ajuda no seu congelamento e na sua capacidade de penetrar no muco cervical (PAULSON & POLAKOSKI, 1977). A técnica de lã de vidro foi eficiente em remover leucócitos do sêmen de pacientes humanos oligozoospermicos com leucocitospermia (SÁNCHEZ et al, 1996).

As taxas de fertilização foram semelhantes entre a filtração em lã de vidro e Percoll[®], mas a taxa de blastocistos de embriões bovinos fertilizados a partir de amostras de lã de vidro foi maior comparado ao Percoll[®]. A filtração em lã de vidro também melhorou a qualidade do embrião bovino em comparação com o método de centrifugação por gradiente de densidade após injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (LEE et al., 2009).

A técnica de lã de vidro selecionou espermatozoides congelados de bovinos com maior percentual de integridade de membrana e motilidade comparado as técnicas de Sephadex e Percoll[®], aumentando a produção de embriões in vitro (LEE et al., 2009).

2.2.2 CENTRIFUGAÇÃO

A centrifugação do sêmen para a retirada do plasma seminal é uma importante ferramenta a ser executada antes da adição do diluente para a criopreservação e também apresenta benefícios quando o período de refrigeração for superior a 24h. Martin et al., (1979), observaram aumento importante da motilidade e da taxa de concepção (63%) ao centrifugar o sêmen por 5 minutos antes da adição de diluente a base de lactose e gema de ovo.

Alguns detalhes influenciam na qualidade do sêmen, como o período de tempo da centrifugação, a força de centrifugação, componentes do diluente, percentual de plasma seminal retirado e o diluente utilizado na ressuspensão do sêmen após a centrifugação (PICKETT et al., 1975; MARTIN et al., 1979; JASKO et al., 1992). A centrifugação pode causar efeitos negativos sobre a motilidade espermática quando não executada adequadamente, podendo ser minimizada ajustando o tempo, força de centrifugação, volume centrifugado e o diluente (HEITLAND et al., 1996).

A sobrevivência do espermatozoide após centrifugação e refrigeração não foi prejudicada pelo protocolo de centrifugação se este estiver utilizando o volume, diluente tempo

e força de centrifugação adequada. Protocolos de centrifugação que aceleram a sedimentação podem melhorar a recuperação de espermatozoides móveis e viáveis (FERRER et al., 2012)

A remoção do plasma seminal através de centrifugação em diluentes a base de leite desnatado aumenta a estabilidade do sêmen fresco e refrigerado, apresentando melhores resultados nas alterações hiposmóticas e na resposta a indução *in vitro* da reação acrossômica (BARRIER-BATTUT et al., 2013).

2.2.3 SELEÇÃO ESPERMÁTICA

A subfertilidade presente em parte dos garanhões torna necessária a seleção de subpopulações de espermatozoides viáveis para o procedimento de inseminação artificial, resfriamento ou congelamento. A centrifugação remove o plasma seminal que apresenta efeitos deletérios no resfriamento e congelamento, porém, somente a centrifugação e o Sperm Filter[®] não permitem selecionar espermatozoides de alta qualidade para uso na reprodução (PESSOA et al., 2016).

As técnicas de separação espermática têm sido utilizadas em diversas espécies. Em humanos, para fecundação *in vitro* foi utilizada a migração espermática (*Swim-up*) (WONG et al., 1986; WU et al., 2004), filtração em colunas filtrantes por gravidade (lã de vidro e lã de vidro-Sephadex) (VAN DER VEM et al., 1988; RANA et al., 1989; COULAM & JEYENDRAN, 2012) e centrifugação por gradiente de densidade (Percoll[®]) (TANPHAICHITR et al., 1988; CLAASSENS et al., 1996).

Em bovinos, as técnicas de Percoll[®] e *Swim-up* são bastante aplicadas e as vantagens e desvantagens bem descritas. Para a produção *in vitro* de embriões bovinos a técnica de gradiente de Percoll[®] destaca-se como a mais utilizada. O meio comercial é um preparado em diferentes densidades que seleciona os espermatozoides na centrifugação, apresentando uma taxa de recuperação espermática de 50% (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995).

Em equinos, as técnicas de *Swim-up*, Percoll[®], lã de vidro e lã de vidro-sefadex foi realizada no sêmen fresco selecionando desta forma espermatozoides com defeitos menores de cabeça e maior motilidade progressiva quando comparado ao grupo controle (sêmen fresco não filtrado). Porém, com esta técnica houve baixa recuperação de células e o percentual de alterações de cauda não diferiu do grupo controle. Para sêmen utilizado para o resfriamento e a criopreservação, os autores compararam lã de vidro-sefadex e centrifugação com o grupo controle, observando maior motilidade para lã de vidro-sefadex para sêmen refrigerado por 24h

e criopreservado. No entanto, no teste de fertilidade não houve diferença após a inseminação das éguas (SIEME et al., 2003).

2.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

2.3.1 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado na avaliação de sêmen fresco e após conservação em laboratórios e propriedades, pois é facilmente aplicável e rápido de executar (KATILA, 2001). Considera-se um parâmetro importante na estimativa da viabilidade espermática (PICKETT et al., 1975). Rotineiramente, a motilidade dos espermatozoides no ejaculado do garanhão é avaliada por estimativa subjetiva da proporção de espermatozoides com motilidade progressiva, utilizando lâmina e lamínula aquecidas e um microscópio com fonte de luz (VARNER, 2008).

Para a fertilização em condições fisiológicas, a motilidade é indispensável, pois sua perda resulta em falha na função celular. Porém, sua manutenção não significa que há integridade celular (BEDFORD et al., 1995; KUISMA et al., 2006). Para se obter uma avaliação mais confiável, avalia-se também a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, pois estão relacionados com maiores índices de fertilidade (PICKETT, 1975). Os espermatozoides com movimentos circulares amplos devem ser considerados com motilidade progressiva, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979). Para a avaliação da motilidade é importante a experiência do avaliador e por isso é considerada um método subjetivo de avaliação.

2.3.2 FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA – TESTE HIPOSMÓTICO

As membranas biológicas são as responsáveis por manter a homeostase celular através de suas trocas com o meio externo (DELL'AQUA et al., 2002). O teste hiposmótico (HOST) tem a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática em espermatozoides de diferentes espécies (JEYEDRAN et al., 1984). É um método simples, prático e confiável que tem sido rotineiramente utilizado nas avaliações de sêmen equino (ARRUDA et al., 2011).

A membrana plasmática do espermatozoide permite o transporte de moléculas de forma seletiva, provocando aumento de volume ou edema do espermatozoide, sendo visível na cauda, pois apresenta uma membrana plasmática mais frágil que a presente na região da cabeça (VASQUEZ et al., 1997). A capacidade da cauda espermática enrolar na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando que encontra-se intacta (DREVIUS & ERIKSSON, 1966). Existe correlação positiva entre caudas enroladas e penetração em oócitos de hamsters (JEYEDRAN et al., 1984). Em equinos, o uso da água destilada aquecida a 38°C foi adaptada (LAGARES et al., 2000) para a avaliação da funcionalidade de membrana espermática, utilizando a proporção de 1:3, ou seja, uma parte de sêmen e duas de água destilada, com a osmolaridade aproximada de 100mOsm.Kg H₂O⁻¹.

2.3.3 pH

O pH do sêmen equino varia entre 6,8 e 7. Pode ser influenciado pela estação do ano, frequência de coletas/coberturas e concentração espermática. Existe uma correlação negativa entre o volume seminal e o pH, e entre o número de espermatozoides no ejaculado e o pH, ou seja, quanto menor o número de espermatozoides no ejaculado, maior o pH (PICKETT et al., 1987). Durante o armazenamento, espermatozoides e bactérias contaminantes produzem metabólitos que reduzem o pH do diluente, diminuindo o metabolismo e motilidade espermática (YÁNIZ et al., 2011).

2.3.4 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Possivelmente a morfologia espermática seja um dos parâmetros mais importantes, junto com a motilidade, para avaliar um ejaculado das espécies domésticas (VARNER, 2008).

Os defeitos de morfologia dos espermatozoides podem ser divididos em maiores ou menores. Os defeitos maiores, como alterações no acrossoma ou defeitos no núcleo da célula, são aqueles que causam morte embrionária precoce ou impedem que ocorra a fertilização, ou seja, estão relacionados a diminuição do potencial fecundante, e os defeitos menores, como as anomalias de cauda, alteram a motilidade espermática, impedindo que o espermatozoide alcance o oócito (SAACKE et al., 2000).

Existem inúmeros trabalhos que demonstram a importância de avaliar a morfologia espermática, correlacionando com a motilidade espermática e com a fertilidade (DUFOUR et al., 1984; JASKO et al., 1990; KRUGER et al., 1988; KUMAR & RANI, 1999). Verdadeiramente, algumas anomalias têm sido associadas com redução da fertilidade, como as anomalias da peça intermediária e caudas dobradas ou enroladas em espiral (VARNER, 2008). Da mesma forma, qualquer defeito morfológico devido a um processo de maturação espermático incompleto (por exemplo, defeitos de cauda e pequenas diferenças geométricas na cabeça) podem originar um movimento anormal que incapacite o espermatozoide de progredir no aparelho genital feminino e posterior fecundação (DRESDNER & KATZ, 1981).

2.3.6 SISTEMA COMPUTADORIZADO DE ANÁLISE ESPERMÁTICO (CASA)

Com o objetivo de diminuir a subjetividade da avaliação de alguns parâmetros convencionais do espermograma clássico, se começou a investigar uma forma de automatizar as análises do movimento espermático mediante o uso de sistemas informatizados. Com o avanço da tecnologia de digitalização da imagem em vídeo, implementou-se os sistemas semiautomáticos e automáticos, denominados pela sigla CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), que permitem avaliar de forma rápida e precisa, tanto as variáveis cinéticas como as morfometrias do espermatozoide de humanos e animais (JAGOE et al., 1986; DAVIS & KATZ, 1989; HIDALGO et al., 2008).

A utilização de programas computadorizados para avaliação espermática (CASA) pode ser mais objetivo e com maiores repetições. A avaliação da cinética de um grande número de espermatozoides pode ser determinada em análise do movimento espermático monitorada por computador, onde cada trajetória percorrida pela cabeça do espermatozoide é registrada, repetida e mensurada. O sistema automatizado de análise de motilidade oportuniza avaliar múltiplas característica espermáticas em uma única amostra de sêmen com grande repetibilidade (MORTIMER & MAXWELL, 2004). A importância deste tipo de teste é pela avaliação acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, diminuição da possibilidade de erros e disponibilidade de mais informações tais como a velocidade e o tipo de trajetória dos espermatozoides (VERSTEGEN et al., 2002). A desvantagem do uso desta técnica é em relação ao custo necessário para cada avaliação (AURICH, 2005). Os sistemas CASA refletem uma série de medidas de análise do deslocamento da cabeça do espermatozoide através do tempo. Existem diversos parâmetros que são avaliados nas amostras seminais que se

caracterizam por uma série de parâmetros globais, que dependem da configuração do equipamento. Entre eles encontramos a percentagem de espermatozoides imóveis (IMOV), motilidade total (MT), progressiva (MP), circular (MC), rápida (MR), lenta (MLENTA) e local (MLOCAL).

A concentração espermática pode ser determinada através das análises do CASA, porém, as amostras podem sofrer influência na identificação dos espermatozoides e suas trajetórias por parte do sistema. Portanto, existe a necessidade de diluir previamente as amostras de sêmen com diluentes que não alterem as características cinéticas do espermatozoide (VANTMAN et al., 1988; FARREL et al., 1998; MAXWELL & JONHSON, 1999; IGUEROUADA & VERSTEGEN, 2001). Por esse motivo, cabe salientar que estudos prévios têm demonstrado que a composição do diluente utilizado e o grau de diluição podem influenciar nos resultados obtidos com os sistemas CASA, além de outras variáveis, entre elas, influência da temperatura da análise, tipo de câmara e o número de espermatozoides capturados em cada amostra (JASKO et al., 1990; VARNER et al., 1991; DAVIS et al., 1993; FARRELL et al., 1996; VERSTEGEN et al., 2002; MORTIMER & MAXWELL, 2004).

3. CAPÍTULO 1

Avaliação dos parâmetros do sêmen equino pré e pós-congelamento após separação dos espermatozoides com a utilização de lã de vidro

Evaluation of pre and post-freeze equine semen parameters after separation of spermatozoa with glass wool

Rômulo Oliveira Fernandes da Silva^I Alfredo Quites Antoniazzi^{II} William Schoenau^{III}

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a técnica de seleção espermática através da lã de vidro, centrifugação e Sperm Filter[®] sobre a motilidade, vigor, pH, concentração, morfologia e integridade de membrana do sêmen equino congelado. O sêmen de cinco pôneis da raça Brasileira foi diluído em diluente a base de leite em pó desnatado na diluição de 1:1 e distribuído em três grupos, centrifugação (C), filtração em lã de vidro + centrifugação (LC) e filtração em lã de vidro + Sperm Filter[®] (LS), utilizou-se quatro ejaculados/pônei. Nos três grupos avaliados após o descongelamento não houve diferença nos parâmetros de motilidade local, vigor e pH. Maior percentual de motilidade total ($52,50\% \pm 7,16$ e $48,50\% \pm 5,87$) ($P < 0,01$) e motilidade progressiva ($41,75\% \pm 7,30$ e $38,25\% \pm 6,93$) ($P < 0,01$) foi detectado nos grupos C e LC, respectivamente. Ao avaliar a integridade da membrana espermática, resultados superiores foram detectados nos grupos C e LC em relação ao LS ($43,25\% \pm 7,48$, $42,35\% \pm 8,39$ e $29,10\% \pm 12,31$) ($P < 0,01$). A concentração espermática foi superior no grupo C ($79,65 \pm 27,15 \times 10^6$ sptz/mL) em relação ao LC e LS ($43,97 \pm 18,67 \times 10^6$ sptz/mL e $25,95 \pm 21,84 \times 10^6$ sptz/mL)

^I Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II} Prof. Adjunto, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria.

^{III} Prof. Associado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM, Santa Maria.

($P < 0,01$). Na avaliação computadorizada da motilidade espermática, não houve diferença entre os grupos. Ao avaliar a morfologia espermática, encontrou-se menos defeitos morfológicos após as etapas de seleção espermática em relação a morfologia espermática imediata após a coleta. Sugere-se que, quando da preparação do sêmen para congelamento, o uso da centrifugação ou lã de vidro + centrifugação seja o protocolo de eleição.

Palavras-chave: criopreservação, seleção espermática, garanhão.

ABSTRACT

In this study the sperm selection through glass wool, centrifugation and Sperm Filter[®] on the motility, vigor, pH, concentration and membrane integrity of the frozen semen were evaluated. The semen of five Brazilian ponies was diluted in a diluent of skim milk at 1: 1 dilution and distributed in three groups, centrifugation (C), glass wool + centrifugation (LC) and glass wool filtration + Sperm Filter[®] (LS), four ejaculates / ponies were used. In the three groups evaluated after thawing there was no difference in parameters of local motility, vigor and pH. Higher percentage of total motility ($52.50\% \pm 7.16$ and $48.50\% \pm 5.87$) ($P < 0.01$) and progressive motility ($41.75\% \pm 7.30$ and 38.25 ± 6.93) ($P < 0.01$) was detected in groups C and LC, respectively. When evaluating sperm membrane integrity, superior results were detected in groups C and LC in relation to LS ($43.25\% \pm 7.48$, $42.35\% \pm 8.39$ and $29.10\% \pm 12.31$) ($P < 0.01$). Sperm concentration was higher in group C ($79.65 \pm 27.15 \times 10^6$ sptz / mL) than LC and LS ($43.97 \pm 18.67 \times 10^6$ sptz / ml and $25.95 \pm 21.84 \times 10^6$ sptz / mL) ($P < 0.01$). In the objective evaluation of sperm motility through CASA there was no difference between the groups. When evaluating sperm morphology, we found fewer morphological defects after sperm selection in relation to immediate sperm morphology after collection. It is suggested that,

when preparing the semen for freezing, the use of centrifugation or glass wool + centrifugation is the protocol of choice.

Key words: cryopreservation, sperm selection, stallion.

INTRODUÇÃO

Na espécie equina a criopreservação do sêmen é um importante instrumento no melhoramento genético, pois maximiza o uso de bons reprodutores (FÜRST, 2005). Durante o procedimento algumas etapas podem danificar os espermatozoides, como a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (AMANN & PICKETT, 1987).

Existe grande variabilidade de parâmetros no ejaculado de garanhões e isso é relevante no momento de preparar o ejaculado para a inseminação artificial, desta maneira, obter a maioria das células viáveis é de extrema importância para uso a fresco ou para preservação (SIEME et al., 2003).

Muitas vezes a seleção espermática é confundida com as técnicas de remoção do plasma seminal e concentração espermática. A centrifugação e o uso de filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter[®]) são técnicas de concentração/remoção parcial ou total do plasma seminal, porém não permitem selecionar espermatozoides (SIEME et al., 2003; NETO, 2013). Entre as técnicas de seleção espermática pode-se citar a separação por gradiente (Percoll[®]), filtração (Sephadex, lã de vidro e membranas filtrantes), separação por migração ascendente (*Swim-up*) e centrifugação por suspensão coloidal (Androcoll-E[®]) (SIEME et al., 2003; CAMPOS et al., 2008; MORRELL et al., 2008; STUHTMANN et al., 2010; MORRELL, 2012; MORATO et al., 2013; HEUTELBECK et al., 2015).

A centrifugação é uma importante ferramenta a ser utilizada antes da adição do diluente para criopreservação, pois propicia aumento considerável da motilidade e da taxa de concepção (MARTIN et al., 1979). No entanto, a centrifugação não é inócua aos espermatozoides e pode reduzir em alguns casos sua motilidade (DELL'AQUA JR et al., 2001; KELLER et al., 2001).

Acredita-se que o mecanismo de funcionamento da lâ de vidro para a seleção espermática ocorra através da apreensão mecânica dos espermatozoides danificados, que são incapazes de passar pela barreira física da lâ de vidro (LEE et al, 2009).

Em bovinos, utilizando diferentes métodos de seleção espermática como filtração de lâ de vidro, Sephadex e Percoll[®] foi avaliado a funcionalidade da membrana através de coloração fluorescente CFDA/PI e HOST, as amostras de filtração de lâ de vidro apresentaram os maiores valores em ambos os métodos de avaliação. Estes resultados indicam que a filtração em lâ de vidro é o melhor método para recuperar espermatozoides com membranas plasmáticas intacta (LEE et al., 2009).

O uso da lâ de vidro é aplicado em diversas espécies de mamíferos de forma semelhante ao *Swim-up* e Percoll[®] para a seleção do sêmen utilizado em biotécnicas *in vitro* (SIEME et al., 2003). Na espécie equina, SIEME et al. (2003) utilizaram seringas de 5mL contendo lâ de vidro e filtraram o sêmen fresco selecionando desta forma espermatozoides com defeitos menores de cabeça e maior motilidade progressiva quando comparado à técnica do Percoll[®] e ao grupo controle (sêmen fresco não filtrado), porém, houve baixa recuperação de células e o percentual de alterações de cauda não diferiu do grupo controle.

A técnica de lâ de vidro foi eficiente em remover leucócitos do sêmen de pacientes humanos oligozoospermicos com leucocitospermia (SÁNCHEZ et al, 1996).

As taxas de fertilização foram semelhantes entre a filtração em lâ de vidro e Percoll[®], mas a taxa de blastocistos de embriões bovinos fertilizados a partir de amostras de lâ de vidro foi maior comparado ao Percoll[®]. A filtração em lâ de vidro também melhorou a qualidade do

embrião bovino em comparação com o método de centrifugação por gradiente de densidade após injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (LEE et al., 2009).

A técnica de filtração por lã de vidro utilizada em bovinos apresenta baixo custo, é simples e eficaz para selecionar espermatozoides funcionalmente competentes para tecnologias reprodutivas (ARZONDO et al., 2012). Essas vantagens podem ser aplicadas à espécie equina para aumentar a eficiência da criopreservação selecionando somente os espermatozoides viáveis. Este estudo teve como hipótese a utilização de lã de vidro para separar espermatozoides equinos com maior motilidade e menos defeitos morfológicos assim como já ocorre em diversas espécies. Portanto, o objetivo foi avaliar a técnica da seleção espermática com uso da lã de vidro anterior e posterior ao congelamento comparando com técnicas comumente utilizadas, como a centrifugação e o Sperm Filter[®].

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Os experimentos com a utilização dos pôneis foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (Protocolo nº 1318280916). Foram utilizados cinco pôneis da raça Brasileira com idades entre 9 e 16 anos. A alimentação era composta por aveia branca, ração e sal mineral além de campo nativo e água *ad libitum*. Antes da realização do experimento os garanhões tiveram as reservas extragonadais de espermatozoides esgotadas com coletas diárias durante uma semana.

2. Coleta e avaliação do sêmen

As coletas de sêmen (quatro coletas por garanhão) foram realizadas com vagina artificial modelo Hannover, com o auxílio de uma fêmea pônei-manequim condicionada à atividade e contida adequadamente. O período da realização das coletas foi em datas diferentes, compreendendo o final e o meio da estação reprodutiva. A metade das coletas foi realizada nos meses de março e abril de 2017, e a outra etapa foi em novembro de 2017. Para a coleta do ejaculado, um filtro de nylon acoplado ao copo coletor foi utilizado para separação da fração de gel, que foi desprezada. As análises macroscópicas do ejaculado como volume, cor e aspecto ocorreram imediatamente após a coleta. Para as avaliações imediatas do sêmen, uma fração de 1mL do sêmen fresco foi separada e utilizada para avaliação do pH com a utilização de medidor de pH (pH Meter Tec-2-Tecal[®]) e concentração espermática através de câmara de Neubauer. Para avaliação da morfologia espermática foi efetuado um esfregaço com 5 μ L de sêmen distendido sobre lâmina e corado com eosina-negrosina. Com o restante do ejaculado efetuou-se uma diluição 1:1 (sêmen:diluyente) com diluyente a base de leite em pó desnatado e glicose (diluyente modificado de KENNEY et al., 1975; Equidil[®]). Após esta diluição, a motilidade espermática e o vigor foram avaliados de forma subjetiva utilizando microscopia de contraste de fase (40X) e a avaliação da integridade funcional da membrana espermática através do teste hiposmótico (HOST). Para isso, utilizou-se água destilada aquecida a 37°C na proporção de 1:2, ou seja, uma parte de sêmen e duas de água destilada, perfazendo a osmolaridade de aproximadamente 100mOsm.Kg H₂O⁻¹. As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, segundo protocolo de Lomeo & Giambérsio (1991), e adaptado para equinos por Lagares et al. (2000). Na sequência, a análise foi conduzida sob microscópio de contraste de fase (40X) sob lâmina e lamínula contando 100 espermatozoides por amostra, onde foi avaliado o total de caudas dobradas. A concentração espermática foi ajustada para 100 x10⁶sptz/palheta, antes da

separação dos grupos. O sêmen diluído foi dividido em três frações para ser utilizado nos seguintes procedimentos de seleção/concentração espermática: centrifugação (grupo C); lã de vidro + centrifugação (grupo LC) e lã de vidro + Sperm Filter[®] (grupo LS).

3. Separação com lã de vidro

A técnica da lã de vidro foi realizada com a utilização de seringa estéril de 10mL contendo 700mg de lã de vidro (Sigma-Aldrich, 20411) comprimida até a altura de 1mL. A mesma foi lavada com 20mL de água ultra-pura e esterilizada em autoclave. Previamente a passagem da fração de sêmen dos grupos LC e LS realizava-se a passagem de 20mL de diluente Equidil[®] através da seringa contendo a lã de vidro.

Após a separação espermática pela lã de vidro o volume filtrado do sêmen foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos para concentração (grupo LC) e ressuspenso em diluente (Botucrío[®]) para congelamento de sêmen equino. Este diluente é composto de açúcares, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e metilformamida, e comercializado exclusivamente para criopreservação de sêmen equino. A segunda fração do ejaculado foi submetida à separação pela lã de vidro e pelo filtro composto por membrana hidrofílica sintética (Sperm Filter[®]) por um período de 5 minutos, concentrando assim o sêmen (grupo LS) para ressuspenso em Botucrío[®] e envasar nas palhetas para criopreservação. A terceira fração do ejaculado foi submetida à centrifugação a 600 x g por 10 minutos e o pellet foi ressuspenso em Botucrío[®] e envasado para criopreservação para compor o (grupo C) deste experimento.

4. Congelamento de sêmen

Para compor cada grupo experimental foram congeladas cinco palhetas de 0,5mL. O congelamento foi realizado em aparelho automatizado específico para sêmen e embriões modelo TK 1000® (TK – Equipamentos para reprodução, Uberaba – MG). O programa de refrigeração/congelamento utilizado estava pré-estabelecido pelo equipamento e foi conduzido de maneira lenta e em três etapas. O primeiro passo envolveu o resfriamento de 20°C a 5°C a 0,25°C/min. No segundo passo o resfriamento foi de 5°C a -90°C a 15°C/min e o último de -90°C a -120°C a 10°C/min. As amostras congeladas e identificadas foram armazenadas em raques e mantidas em nitrogênio líquido, por no mínimo dez dias até o descongelamento.

5. Avaliações pós descongelamento

Foram utilizadas duas palhetas de cada grupo e de cada animal para realizar as análises de pH, motilidade em microscópio óptico, vigor, concentração, teste hiposmótico e análise seminal computadorizada (CASA). Para o descongelamento, as palhetas foram submersas individualmente em água a uma temperatura de 37° C por 30 segundos. As avaliações foram executadas por um avaliador experiente.

6. Análise estatística

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita através do Teste de Duncan. Os dados são representados pela média \pm desvio padrão. Os valores foram considerados diferentes com $P < 0,05$.

RESULTADOS

A média do volume dos ejaculados dos cinco pôneis foi $11,70 \pm 5,84$ mL e a média da concentração total foi $239,75 \pm 107,74 \times 10^6$ spz/mL, avaliados imediatamente após a coleta.

Os valores da média da concentração e o desvio padrão pós-descongelamento dos ejaculados centrifugados (grupo C) foi $79,65 \pm 27,15 \times 10^6$ spz, de lã de vidro + centrifugação (grupo LC) foi $43,97 \pm 18,67 \times 10^6$ spz e do lã de vidro + Sperm Filter[®] (grupo LS) foi $25,95 \pm 21,84 \times 10^6$ spz ($P < 0,01$) (Figura 1).

Os valores de pH e motilidade local foram similares nos três grupos pós-descongelamento. As médias e o desvio padrão do pH encontradas foram ($6,22 \pm 0,25$; $6,17 \pm 0,24$ e $6,20 \pm 0,25$) e da motilidade local foi ($10,75 \pm 4,37\%$; $10,25 \pm 4,43\%$ e $10,50 \pm 3,94\%$) ($P > 0,05$) nos grupos C, LC e LS, respectivamente.

Valores maiores de motilidade total foram observados nos grupos C e LC ($52,50\% \pm 7,16$ e $48,50\% \pm 5,87$), respectivamente, em relação ao grupo LS ($35,00\% \pm 11,47$) (Figura 2). Valores maiores de motilidade progressiva foram observados nos grupos C e LC ($41,75\% \pm 7,30$ e $38,25\% \pm 6,93$), respectivamente, em relação ao grupo LS ($24,50\% \pm 12,55$) ($P < 0,01$) (Figura 3).

Valores maiores de vigor espermático foram observados nos grupos C e LC ($2,65 \pm 0,48$; $2,65 \pm 0,48$), respectivamente, em relação ao grupo LS ($2,20 \pm 0,41$) ($P < 0,01$) (Figura 4).

No teste hiposmótico verificou-se que os melhores resultados foram encontrados nos grupos C e LC ($43,25 \pm 7,48$ e $42,35 \pm 8,39$), respectivamente, comparado ao grupo LS ($29,10 \pm 12,31$) ($P < 0,01$) (Figura 5).

Na morfologia espermática realizada após o descongelamento, não houve diferença entre os grupos, porém existiu diferença entre a morfologia realizada imediatamente após a

coleta e após o descongelamento, indicando que as técnicas empregadas foram capazes de selecionar espermatozoides (Tabela 1).

Estas observações indicam superioridade das técnicas de centrifugação e lâ de vidro + centrifugação sobre o uso da lâ de vidro + Sperm Filter®.

DISCUSSÃO

Uma das metodologias mais utilizadas para concentração de sêmen equino é a centrifugação, por essa razão foi escolhido como grupo controle. Após a primeira avaliação do sêmen a concentração espermática foi ajustada para 100×10^6 sptz/palheta, antes da divisão nos diferentes grupos. O grupo centrifugação (C) apresentou maior concentração espermática após o descongelamento, seguido do grupo lâ de vidro + centrifugação (LC) e do grupo lâ de vidro + Sperm Filter® (LS), demonstrando que em cada grupo houve diferença na quantidade de células recuperadas. Quanto a concentração espermática da palheta, parece ser provável que a qualidade seminal pós-descongelamento esteja relacionada com a quantidade de agentes crioprotetores por unidade de volume (ANGOLA et al., 1992). Entretanto, foram encontrados índices de fertilidade semelhantes em éguas inseminadas com sêmen congelado armazenado em macrotubos de 4 mL, na concentração espermática de 100×10^6 sptz/mL e em palhetas de 2 mL, contendo 200×10^6 sptz/mL (PAPA et al., 1989). Isso justifica não ter havido alteração nos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, vigor e teste hiposmótico do grupo lâ de vidro mais centrifugação em relação ao grupo centrifugação. Para o congelamento de sêmen equino, tem-se utilizado em média concentrações finais que variam de 25 a 400 milhões sptz/mL (JASKO, 1994; VIDAMENT et al., 1997). Contudo, os melhores resultados de motilidade total e progressiva foram encontrados nas concentrações espermáticas de 20, 200 e

400 x 10⁶ spz/mL comparado com as concentrações de 800 e 1.600 x 10⁶ spz/mL (HEITLAND et al., 1996).

Em humanos, o filtro de lã de vidro apresentou aumento significativo de espermatozoides normais em relação a morfologia e diminuição na quantidade de espermatozoides mortos (ENGEL et al., 2001). Neste estudo, os dados de morfologia espermática de todos os grupos foram melhores após o descongelamento comparado com o sêmen fresco, confirmando que houve seleção espermática.

Em estudos com sêmen equino fresco ou resfriado ocorreu o aumento da motilidade total e da motilidade progressiva com a utilização da filtração em lã de vidro e está atribuído a eliminação de espermatozoides de baixa qualidade (CASEY et al., 1993). Os dados de motilidade total e a motilidade progressiva observados, concordam com outro estudo onde a seleção de espermatozoides viáveis foi realizada utilizando filtração em lã de vidro para congelamento de sêmen equino (SIEME et al., 2003). Em um estudo conduzido em caninos, o filtro de lã de vidro levou a uma melhoria na morfologia, na motilidade espermática, na viabilidade e na integridade de membrana plasmática (KIM; YU; KIM, 2010). Portanto, confirma-se que o uso da lã de vidro não altera a motilidade dos espermatozoides equinos.

O uso da centrifugação na concentração e remoção do plasma seminal para resfriamento do sêmen equino tem demonstrado que em baixa velocidade não afeta a qualidade espermática (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000). A centrifugação é uma importante ferramenta a ser utilizada antes da adição do diluente para criopreservação, pois propicia aumento considerável da motilidade e da taxa de concepção (MARTIN et al., 1979). A centrifugação não é inócua aos espermatozoides e pode reduzir em alguns casos sua motilidade (DELL'AQUA JR et al., 2001; KELLER et al., 2001). Neste estudo, a centrifugação e a lã de vidro mais centrifugação apresentaram bons resultados nos parâmetros espermáticos avaliados.

No terceiro grupo do presente estudo foi utilizado o Sperm Filter[®] associado a lã de vidro, onde se observou uma menor concentração espermática quando comparado ao grupo centrifugação. O Sperm Filter[®] é composto por uma membrana hidrofílica sintética com poros de 2 µm que retêm os espermatozoides, possibilitando a passagem somente do plasma seminal (NETO et al., 2013). Esse filtro se caracteriza por ser uma técnica eficiente na concentração espermática e por remover o plasma seminal sem causar danos as células, e foi equivalente para remoção do plasma seminal do sêmen de garanhões comparado com a centrifugação e centrifugação com colóide (ALVARENGA, 2012). Diferente deste estudo, a utilização do Sperm Filter[®] associado a lã de vidro diminuiu a concentração espermática comparado aos outros grupos. Esperava-se não haver diferença na concentração devido ao diâmetro da cabeça do espermatozoide, que é de 3 µm de largura, sendo maior em relação ao filtro. A diminuição na concentração pode ser atribuída ao baixo volume de sêmen utilizado na filtração com o Sperm Filter[®] e também por já ter sido filtrado em lã de vidro.

No teste hiposmótico, os grupos centrifugação e lã de vidro mais centrifugação tiveram melhores resultados comparado ao grupo lã de vidro mais Sperm Filter[®]. O teste hiposmótico tem a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática em espermatozoides de diversas espécies e vem sendo muito utilizado nas publicações mais recentes em conjunto com outros testes *in vitro* para avaliar a qualidade do sêmen equino congelado (JEYENDRAN et al., 1984; OLACIREGUI et al., 2014). Na espécie equina, devido à individualidade das células dos garanhões em suportar o resfriamento, o teste hiposmótico é uma ferramenta útil na predição desta capacidade (NIE & WENZEL, 2001; MELO et al., 2005). Na avaliação da funcionalidade de membrana espermática equina durante o resfriamento, os espermatozoides filtrados em lã de vidro e Sperm Filter[®] apresentaram melhores resultados comparados aos centrifugados e aos não centrifugados (PESSOA et al., 2017). O Sperm Filter[®] promove menos dano a membrana plasmática quando comparado a centrifugação (ALVARENGA et al., 2012). Diferente deste

estudo, onde a funcionalidade da membrana apresentou melhores resultados nos grupos onde houve centrifugação.

CONCLUSÃO

A diferença da concentração espermática entre os grupos centrifugação e lã de vidro mais centrifugação, não alterou os parâmetros espermáticos pós descongelamento.

Os dados de morfologia espermática foram melhores após o descongelamento em todos os grupos quando comparado ao sêmen fresco. Isso sugere que as técnicas utilizadas selecionam uma maior quantidade de células íntegras.

A utilização da centrifugação e da lã de vidro mais centrifugação foram semelhantes nos parâmetros avaliados, sendo indicadas para a utilização em coletas de garanhões por manterem os valores mínimos necessários para utilização de sêmen equino congelado.

A utilização da lã de vidro mais Sperm Filter[®] apresentou resultados inferiores aos outros grupos, mais estudos são necessários na associação de lã de vidro mais Sperm Filter[®] com maiores volumes de sêmen e diferentes tempos de filtração.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A. et al. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 424-429, 2012.

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. 145-73, 1987.

ANGOLA, A. P.; MENDEZ, J. V.; QUINTERO, L. Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen equino. **Veterinaria México**, v. 4, p. 315-318, 1992.

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. 201-209, 2012.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. E.; 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, 2000.

CAMPOS, J. R. et al. Freezability of stallion spermatozoal subpopulations. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 313-313, 2008.

CASEY, P. J. et al. Column separation of motile sperm from stallion semen. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 2, p. 142-148, 1993.

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

ENGEL, S. et al. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 33, n. 4, p. 223-230, 2001.

FÜRST, R. et al. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.5, p. 599-607, 2005.

HEITLAND, A. V. et al. Factors affecting motion characteristic of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.47-53, 1996.

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, 2015.

HIDALGO, M. et al. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphology by the Sperm Class Analyzer. **Veterinární Medicína Czech**, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2005.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

KENNEY, R. M.; Minimal contamination techniques and preliminary findings. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 21, p. 327-336, 1975.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HOTT, A. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 318-319, 2001.

KIM, S. H.; YU, D. H.; KIM, Y. J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1-2, p. 106-114, 2010.

LAGARES, M. de A. et al. Effect of different extenders on sperm plasma membrane and fertility of equine cooled semen. **Revista Brasileira de Ciencia Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LOMEO, A. M.; GIAMBÉRSIO, A. M. 'Water test': A simple methods to asses sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 27, p. 47-51, 1979.

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, n. 6, p. 757-763, 2005.

MORATÓ, 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, 2013.

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, 2008.

MORRELL, J. M. Stallion sperm selection: past, present, and future trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 436-440, 2012.

NETO, C. R. et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1120-1123, 2013.

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. 1005-1018, 2001.

OLACIREGUI, M. et al. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2014.

PAPA, F. O. et al. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 223, 1989.

PESSOA, G. A. et al. Response to cooling of pony stallion sêmen selected by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 49, n. 10, 2017.

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, 2003.

STUHTMANN, G. et al. EquiPure (TM) Pro, a method for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL, 2010. p. 53-53.

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.

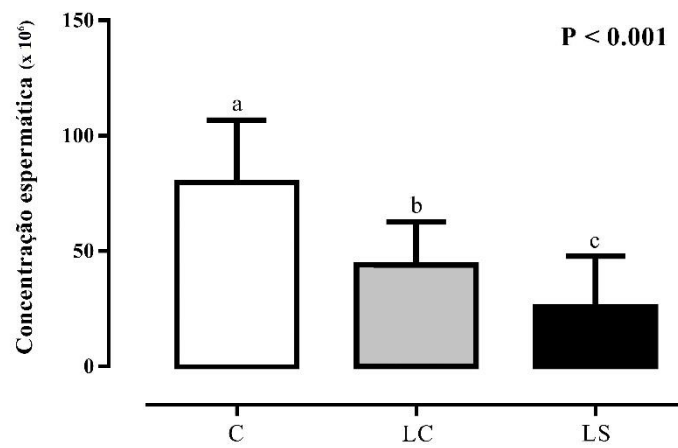


Figura 1 – Valores médios e desvio padrão da concentração espermática de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

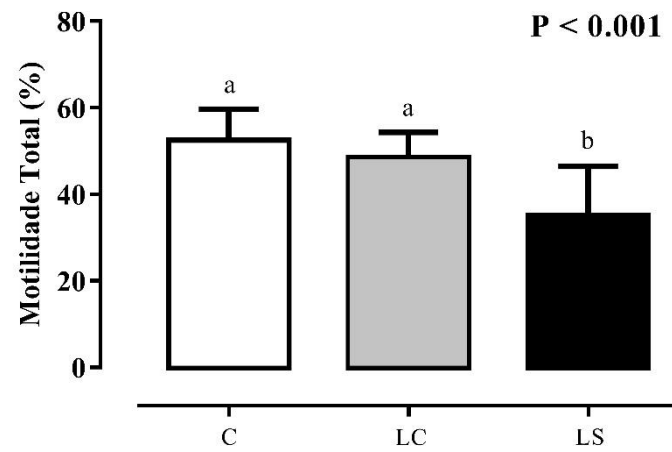


Figura 2 – Médias e desvio padrão da motilidade espermática total de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

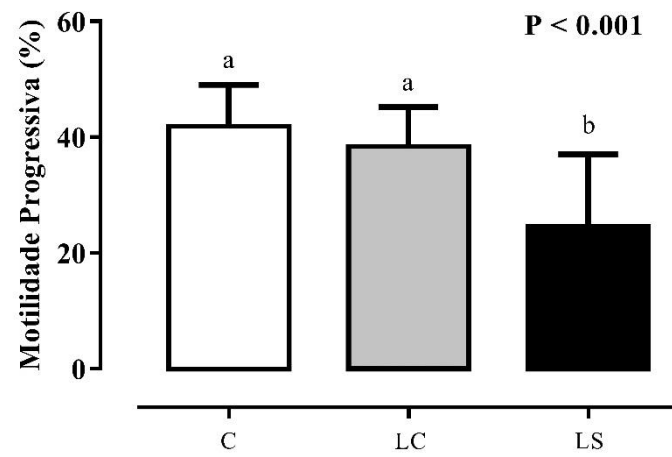


Figura 3 – Médias e desvio padrão da motilidade espermática progressiva de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

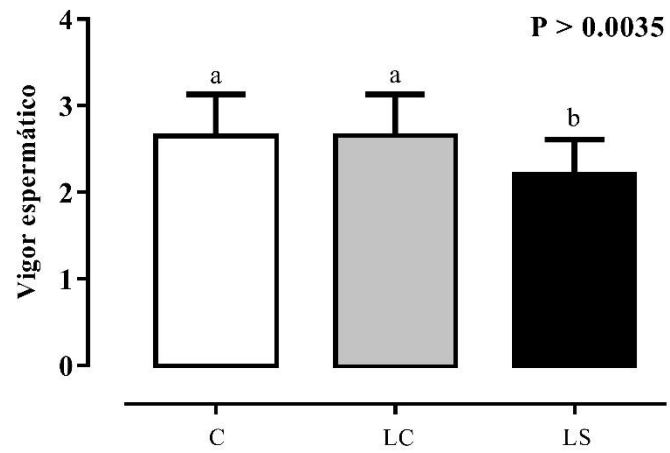


Figura 4 – Médias e desvio padrão do vigor espermático (escala de 1-5) de pôneis da raça Brasileira submetidos à centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

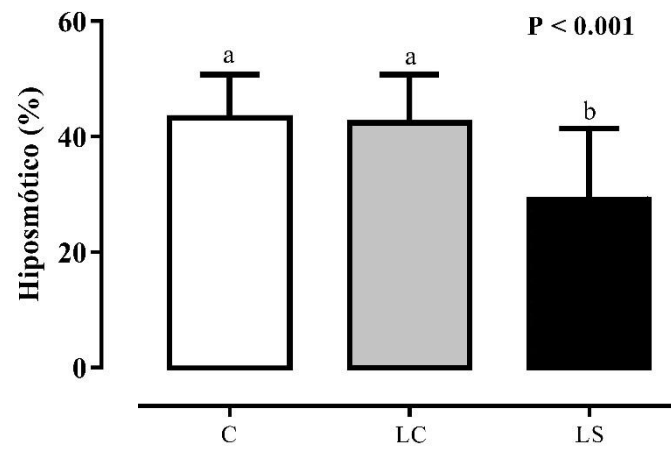


Figura 5 – Médias e desvio padrão do percentual de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira reagentes ao Teste Hiposmótico após o descongelamento nos grupos centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

Morfologia espermática	Fresco	C	LC	LS	Valor de P
Espermatozoides íntegros	90,17 ± 6,04 ^b	93,31 ± 3,62 ^a	94,36 ± 2,82 ^a	94,18 ± 4,49 ^a	>0,6323
Espermatozoides defeitos maiores	6,22 ± 4,69 ^b	3,34 ± 2,23 ^a	3,00 ± 1,73 ^a	3,22 ± 2,19 ^a	>0,8734
Espermatozoides defeitos menores	3,51 ± 2,39 ^a	3,33 ± 1,87 ^a	2,61 ± 1,66 ^a	2,49 ± 2,79 ^a	>0,4222

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da morfologia espermática de pôneis da raça Brasileira antes do congelamento (fresco) e após o descongelamento nos grupos centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

^{a,b,c} Letras diferentes sobrescritas indicam diferença.

CASA	C	LC	LS	Valor de P
Concentração espermática (x 10 ⁶)	99,35 ± 27,79 ^a	84,35 ± 33,99 ^a	54,00 ± 41,14 ^b	>0,0005
Motilidade Total (%)	45,49 ± 18,43 ^a	43,09 ± 19,38 ^a	27,49 ± 24,36 ^b	>0,0171
Motilidade Progressiva (%)	19,00 ± 10,73 ^a	17,40 ± 12,17 ^a	8,49 ± 8,53 ^b	>0,0083
Motilidade Circular (%)	1,52 ± 0,94 ^a	0,92 ± 0,74 ^a	0,49 ± 0,59 ^b	>0,0005
Motilidade Rápida (%)	1,70 ± 1,58 ^a	1,96 ± 2,46 ^a	0,65 ± 0,70 ^a	>0,0483
Motilidade Lenta (%)	15,78 ± 9,18 ^a	14,48 ± 9,50 ^a	7,79 ± 7,78 ^b	>0,0130
Motilidade Local (%)	25,39 ± 9,78 ^a	25,68 ± 10,70 ^a	18,54 ± 17,69 ^a	>0,1628
Imóveis (%)	55,61 ± 17,40 ^b	56,93 ± 19,40 ^b	72,54 ± 24,39 ^a	>0,0204

Tabela 2 – Médias e desvio padrão da concentração espermática, motilidade total, progressiva, circular, rápida, lenta, local e espermatozoides imóveis analisadas após o descongelamento através do CASA nos grupos centrifugação (C), lã de vidro + centrifugação (LC) e lã de vidro + Sperm Filter (LS).

^{a,b} Letras diferentes sobrescritas indicam diferença.

4. CONCLUSÃO

A diferença da concentração espermática entre os grupos centrifugação e lã de vidro mais centrifugação, não alterou os parâmetros espermáticos pós descongelamento.

Os dados de morfologia espermática foram melhores após o descongelamento em todos os grupos quando comparado ao sêmen fresco. Isso sugere que as técnicas utilizadas selecionam uma maior quantidade de células íntegras.

A utilização da centrifugação e da lã de vidro mais centrifugação foram semelhantes nos parâmetros avaliados, sendo indicadas para a utilização em coletas de garanhões por manterem os valores mínimos necessários para utilização de sêmen equino congelado.

A utilização da lã de vidro mais Sperm Filter[®] apresentou resultados inferiores aos outros grupos, mais estudos são necessários na associação de lã de vidro mais Sperm Filter[®] com maiores volumes de sêmen e diferentes tempos de filtração.

5. REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI A. S. et al. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal Veterinary Research**, v. 63, n. 6, p. 880-885, 2002.
- ALMEIDA J. L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino [dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2006.
- ALVARENGA, M. A. et al. Methods of concentratings stallion sêmen. **Jornal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 424-429, 2012.
- 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. 145-73, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J. L.: **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea and Febiger, v. 7, p. 715-745. 1992.
- AMANN RP, GRAHAM JK. Spermatozoal function. In: MCKINNON A. O., VOSS J. L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea and Febiger, p.715-745, 1993.
- ANGOLA, A. P.; MENDEZ, J. V.; QUINTERO, L. Z. Efecto del Sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrossomal y la motilidad posdescongelación del semen equino. **Veterinária México**, v. 4, p. 315-318, 1992.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- 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. 201-209, 2012.
- AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.
- AURICH, J. E.; AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2006.
- AURICH J. E. et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 791-797, 1996.
- BALL B. A. et al. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1026-1030, 2000.
- BALL B. A.; VO A. T.; BAUMBER J. Generation of reactive species by equine spermatozoa. **American Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

BARRIER-BATTUT, I. et al. Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 64-71, 2013.

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. 955-967, 1995.

BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in sêmen from stallion of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 27, p. 39-45, 1979.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. E.; 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, 2000.

CAMPOS, J. R. et al. Freezability of stallion spermatozoal subpopulations. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 313-313, 2008.

CASEY, P. J. et al. Column separation of motile sperm from stallion semen. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 2, p. 142-148, 1993.

CLAASSENS, O. E. et al. Comparison of motility characteristics and normal sperm morphology of human semen samples separated by percoll density gradient centrifugation. **Archives of Andrology**, v. 36, n. 2, p. 127-132, 1996.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 305-311, 2003.

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, n. s1, p. 248-51, 2012.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research Technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Computer-aided sperm analysis (CASA): image digitization and processing. **Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs**, v. 17, n. 1, p. 93-116, 1989.

DAVIS, R. O.; GRAVANCE, C. G. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 2, p. 412-417, 1993.

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

DELL'AQUA, J. A. et al. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de semen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 189-191, 2002.

DRESDNER, R. D.; KATZ, D. F. Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. **Biology of Reproduction**, v. 25, n. 5, p. 920-930, 1981.

DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, n. 1, p. 136-156, 1966.

DUFOUR, J. J.; FAHMY, M. H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *Journal Animal Science*. v. 58, n. 2, p. 416-422, 1984.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBILL, E. **The physiology of reproduction**, New York: Raven Press, p. 27-68, 1988.

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

ENGEL, S. et al. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 33, n. 4, p. 223-230, 2001.

FAWCETT, D. W. The mammalian spermatozoon. **Developmental Biology**, v. 44, n. 2, p. 394-436, 1975.

FARRELL, P. B.; FOOTE, R. H.; ZINAMAN, M. J. Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer-assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 3, p. 446-453, 1996.

FARREL, P. B. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

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, 2012.

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

FÜRST, R. et al. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.5, p. 599-607, 2005.

GADELLA, B. M. et al. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 249-265, 2001.

GRAHAM, J. K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 119-130, 1996.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HEITLAND, A. V. et al. Factors affecting motion characteristic of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.47-53, 1996.

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, 2015.

HIDALGO, M. et al. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphology by the Sperm Class Analyzer. **Veterinární Medicína Czech**, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2005.

HIDALGO, M. et al. Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 374-378, 2008.

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

JAGOE, J. R.; WASHBROOK, N. P.; HUDSON, E. A. Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 39, n. 12, p. 1347-1352, 1986.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.

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

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 129-148, 1992.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 2, p. 199, 2001.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HOTT, A. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 318-319, 2001.

KENNEY, R. M.; Minimal contamination techniques and preliminary findings. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 21, p. 327-336, 1975.

KIM, S. H.; YU, D. H.; KIM, Y. J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1-2, p. 106-114, 2010.

KRUGER, T. F. et al. Predictive value of abnormal sperm morphology *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 1, p. 112-117, 1988.

KUISMA, P. et al. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 14, 2006.

KUMAR, V.; RANI, S. Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: wavelength and intensity effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 1053-1064, 1999.

LAGARES, M. de A. et al. Effect of different extenders on sperm plasma membrane and fertility of equine cooled semen. **Revista Brasileira de Ciencia Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

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, 2009.

LOMEO, A. M.; GIAMBÉRSIO, A. M. 'Water test': A simple methods to asses sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991.

MARSHBURN, P.B. et al. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 1, p. 179-186, 1992.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 27, p. 47-51, 1979.

MAXWELL, W. M. C.; JONHSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, n. 8, p. 1353-1362, 1999.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cell. In: Deep freezing of boar semen, **Proceedings**, Uppsala, 1985, p.199- 222.

MEDEIROS, A. S. L. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-276, 2002.

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, n. 6, p. 757-763, 2005.

MORATÓ, 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, 2013.

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, 2008.

MORRELL, J. M. Stallion sperm selection: past, present, and future trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 436-440, 2012.

MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Effect of medium on kinematics of frozen thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, n. 2, p. 285-291, 2004.

NETO, C. R. et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1120-1123, 2013.

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. 1005-1018, 2001.

OLACIREGUI, M. et al. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2014.

PAPA F. O. et al. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 293-301, 2008.

PAPA, F. O. et al. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 223, 1989.

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. 859-869, 1995.

PAULSON, J. D.; POLAKOSKI, K. L. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. **Fertility and Sterility**, v. 28, n. 2, p. 178-181, 1977.

PESSOA, G. A. Separação espermática pré refrigeração do sêmen equino [Tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

PESSOA, G. A. et al. Response to cooling of pony stallion sêmen selected by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 49, n. 10, 2017.

PICKETT, B. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, n. 2, p. 167-174, 1975.

RANA, N. et al. Glass wool-filtered spermatozoa and their oocyte penetrating capacity. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v. 6, n. 5, p. 280-284, 1989.

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, 2001

SAACKE, R. G. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 663-677, 2000.

SÁNCHEZ, 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, 1996.

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, 2003.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, v. 9, p. 1-38. 1999.

STUHTMANN, G. et al. EquiPure (TM) Pro, a method for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL, 2010. p. 53-53.

TANPHAICHITR, N. et al. Comparison of the in vitro fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and Percoll gradient centrifugation. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v. 5, n. 3, p. 119-122, 1988.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461-471, 1999.

WONG, P. C. et al. Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. **Fertility and Sterility**, v. 45, n. 1, p. 97-100, 1986.

WU, G. J. et al. Less no production and better motion parameter in human sperm by swim-up processing. **Archives of Andrology**, v. 50, n. 5, p. 373-377, 2004.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E. NEIL, J.D. (Eds.), **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

YÁNIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. **Small Ruminant Research**, v. 95, n. 1, p. 54-60, 2011.

VAN DER VEN, H. H. et al. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. **Human Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 85-88, 1988.

VANTMAN, D. et al. Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 3, p. 510-515, 1988.

VARNER, D. D.; VAUGHAN, S. D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 2, p. 224-230, 1991.

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, 1987.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008.

VASQUEZ, J. M. et al. Hyposmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 913-922, 1997.

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

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.