

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAGEM DO SÊMEN
BOVINO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA**

Suzane Peres Campanholi

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAGEM DO SÊMEN
BOVINO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA**

Suzane Peres Campanholi

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientador: Dr. Fabio Morato Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

2016

Campanholi, Suzane Peres
C449e Efeito da centrifugação e filtragem do sêmen bovino sobre a
criopreservação espermática / Suzane Peres Campanholi. --
Jaboticabal, 2016
ix, 58 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Coorientador: Fabio Morato Monteiro
Banca examinadora: Cesar Roberto Esper, Marcelo Roncoletta
Bibliografia

1. Sêmen-centrifugação. 2. Criopreservação. 3. Sêmen-filtragem.
4. Bovinos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:636.08:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAGEM DO SÊMEN BOVINO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

AUTORA: SUZANE PERES CAMPANHOLI

ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA

COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Pesquisador FABIO MORATO MONTEIRO
Instituto de Zootecnia / Estação Experimental de Sertãozinho

Prof. Dr. CESAR ROBERTO ESPER
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Diretor e Responsável Técnico MARCELO RONCOLETTA
INPRENHA / Top in Life Biotecnologia e Genética Animal - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Suzane Peres Campanholi – nascida em São Paulo/SP, em 13 de junho de 1991. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Jaboticabal em fevereiro de 2014. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, pelo Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizado em Sertãozinho/SP, sob a orientação do PQC Dr. Fabio Morato Monteiro de agosto de 2012 a julho de 2013. Em março de 2014 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia. Durante o período de mestrado foi bolsista de treinamento técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, de março a abril de 2014 e bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, de maio de 2014 a fevereiro de 2016.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; é escudo para os que caminham na sinceridade, guarda as veredas do juízo e conserva o caminho dos seus santos. Então, entenderás justiça, juízo e equidade, todas as boas veredas. Porquanto a sabedoria entrará no teu coração, e o conhecimento será agradável à tua alma”.

Provérbios 2:6-10.

Aos meus pais Heleine e Gilberto, irmão
Heitor, avó Luzia, avô Manoel (*in
memorian*) e noivo Marcus Vinicius.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me abençoado com a realização de mais este sonho, pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Heleine e Gilberto, por permanecerem ao meu lado em todos os momentos desta caminhada e por não pouparem esforços para que eu chegasse ao fim, torcendo sempre pela realização dos meus sonhos e dedicando grande parte das suas vidas para construir a minha.

Ao meu irmão Heitor, por ser o meu fiel companheiro desde pequena, alegrando os meus dias e tornando todas as lutas mais leves. Thank you!

A minha avó Luzia, por ter sido a minha companheira em todas as viagens nesses dois anos, me ajudando a superar os momentos difíceis e comemorando as minhas vitórias em cada momento.

Ao meu noivo Marcus Vinicius, por sempre torcer pelo meu sucesso, me amar em todos os momentos e me dar forças para não desistir em nenhuma dificuldade.

A todos os meus familiares e amigos, que confiaram na minha capacidade, estiveram ao meu lado e sempre torceram por mim. Cada um de vocês faz diferença na minha vida.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal-SP, em especial ao Departamento de Reprodução Animal pela oportunidade e acolhida, e a todos docentes e servidores por me proporcionarem um ensino de ótima qualidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelo exemplo profissional e ensinamentos, pela prestatividade de sempre, por confiar no meu trabalho e abrir as portas para esse crescimento profissional tão importante em minha vida.

Ao meu coorientador, PQC Dr. Fabio Morato Monteiro, pelo incentivo e apoio durante todo o mestrado, pelas correções e aprendizado em cada momento e

motivação para chegar até o fim. Aquele que acreditou em mim desde a iniciação científica.

A técnica de laboratório do Departamento de Reprodução Animal da UNESP de Jaboticabal, Roberta Vantini, por toda ajuda e ensinamentos passados durante a produção *in vitro* dos embriões, pelas conversas diárias, pela paciência e colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos amigos e funcionários do Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho, pela atenção e companheirismo durante o período de parceria para realização de etapas muito importantes deste trabalho de pesquisa. Especialmente a pesquisadora Dra. Claudia Cristina Paro Paz, pela colaboração nas análises estatísticas, por sua paciência para sanar todas as dúvidas e por sua prestatividade em todos os momentos que precisei.

Aos docentes, funcionários e amigos da UNESP de Botucatu, pelo apoio, ajudando a sanar dúvidas em todo tempo e a Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pela parceria para realização das análises por citometria de fluxo.

A todos docentes que fizeram parte das bancas de qualificação que contribuíram com seus ensinamentos, críticas e sugestões para melhorar o meu trabalho e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização do meu mestrado.

Aos meus colegas de mestrado que dividiram os momentos de dificuldades, me dando apoio para acreditar que no final tudo daria certo e dividindo as alegrias em cada conquista do trabalho de cada um.

A todos os estagiários que em algum momento caminharam comigo uma parte desta jornada, aliviaram momentos de estresse e trocaram experiências importantes que contribuíram para a finalização deste trabalho e para meu crescimento pessoal também.

A FAPESP pelo auxílio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa da forma que fora planejada desde o princípio.

A CAPES pela concessão da bolsa durante o período do mestrado.

A BotuPharma® pelos produtos utilizados neste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os animais que são o motivo da minha paixão pela profissão. Com vocês aprendi que respeito e afetividade não são transmitidos somente com palavras.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Criopreservação espermática.....	3
2.2 Plasma seminal.....	8
2.3 Métodos para remoção do plasma seminal.....	13
2.3.1 Centrifugação do sêmen.....	13
2.3.2 Filtragem com Sperm Filter®.....	16
3. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 – REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TOUROS.....	32
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Colheita do sêmen.....	35
2.2 Grupos experimentais.....	36
2.3 Criopreservação.....	36
2.4 Avaliações pós-descongelação.....	37
2.4.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática.....	37
2.4.2 Citometria de fluxo.....	38
2.4.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	39
2.5 Análise estatística.....	40
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	42
4.1 Conclusão.....	48
REFERÊNCIAS.....	48

TABELAS.....56



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009713/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de touros Nelore sobre a capacidade de fertilização *in vitro* e integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de junho de 2014.

Jaboticabal, 06 de junho de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

EFEITO DA CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAGEM DO SÊMEN BOVINO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

RESUMO – O plasma seminal já foi descrito como benéfico e ao mesmo tempo prejudicial aos espermatozoides e isto está relacionado com o tempo de contato entre eles. A criopreservação do sêmen em touros pode ser prejudicada por exposição contínua dos espermatozoides ao plasma seminal (PS) e a aplicação de métodos para sua remoção pode aumentar a qualidade dos espermatozoides recuperados pós-descongelamento, melhorando os resultados de biotécnicas que utilizam sêmen criopreservado. Pelo fato da centrifugação causar muitos danos aos espermatozoides, a filtragem com Sperm Filter® apresenta-se como um novo método de remoção do PS que almeja melhores resultados, porém não foi encontrado relato da sua aplicação em bovinos até o momento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos métodos de centrifugação e filtragem com Sperm Filter® sobre a criopreservação do sêmen bovino. Para isso, o sêmen de 38 touros Nelore foi colhido por eletroejaculação. Após a colheita, o sêmen foi fracionado em três alíquotas iguais para divisão em três grupos: controle (N), em que o sêmen foi diluído com PS; centrifugação (C), em que o PS foi removido por centrifugação a 600 X g por 10 minutos; e filtragem (F), em que o PS foi removido por filtragem com Sperm Filter®. As amostras foram criopreservadas, e pós-descongelamento foram avaliados a cinética espermática, a integridade das membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, o estresse oxidativo e a capacidade fecundante através da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Com relação à cinética, maiores valores da velocidade do trajeto ($P = 0,0005$) e velocidade progressiva ($P = <0,0001$) foram observados nos grupos C e F e os parâmetros frequência de batimento, retilinearidade e linearidade foram superiores no grupo F ($P = 0,0008$; $P = 0,0133$ e $P = 0,0005$, respectivamente). A integridade de membrana foi prejudicada pela centrifugação e filtragem do sêmen ($P < 0,0001$), porém o estresse oxidativo foi reduzido com esses métodos de remoção do PS ($P < 0,0001$). Na PIVE, as maiores taxas de desenvolvimento embrionário (blastocistos e blastocistos eclodidos) foram observadas no grupo N e F ($P = 0,008$ e $P = 0,0042$, respectivamente). Portanto, a remoção do plasma seminal pelo método da centrifugação reduz a qualidade do sêmen criopreservado bovino, interferindo negativamente na fertilidade dos espermatozoides e o método da filtragem com Sperm Filter® apresentou melhor resultado evidenciado por altas taxas de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: centrifugação, criopreservação, filtragem, plasma seminal, sêmen, touro

EFFECT OF CENTRIFUGATION AND FILTRATION OF BOVINE SEMEN ON SPERM CRIOPRESERVATION

ABSTRACT – Seminal plasma has been described as beneficial and harmful to the spermatozoa and this is related to the contact time between them. Cryopreservation of semen from bulls can be undermined by continuous exposure of sperm to the seminal plasma (SP) and the application of methods for removal can increase the quality of post-thaw sperm recovered, improving fertilization. Centrifugation cause a lot of damage to sperm and filtering with Sperm Filter[®] is a new SP removal method that aims to better results, but has not yet been applied in bull. The aim of this study was to evaluate the effect of the methods of centrifugation and filtering with Sperm Filter[®] on cryopreservation of bovine semen. For this, semen of 38 Nelore bulls was collected by electroejaculation. Semen was fractioned into three equal aliquots for division into three groups: control (N), wherein the semen was diluted with SP; centrifugation (C), in which the SP was removed by centrifugation at 600 X g for 10 minutes; and filtration (F), in which the SP was removed by filtration with Sperm Filter[®]. Samples were cryopreserved and was evaluated after thawing sperm kinetics, the integrity of plasma and acrosomal membranes, mitochondrial potential, oxidative stress and the fertilizing capacity by *in vitro* embryo production (IVP). The kinetics, higher values of the path velocity ($P = 0.0005$) and progressive speed ($P = <0.0001$) were observed in the groups C and F and the beat frequency parameters, straightness and linearity were higher in group F ($P = 0.0008$, $P = 0.0133$ and $P = 0.0005$, respectively). Membrane integrity was impaired by centrifugation and filtration of semen ($P <0.0001$), though oxidative stress was reduced with these SP removal methods ($P <0.0001$). In IVP, the highest rate of embryonic development (blastocyst and hatched blastocyst) were observed in the C and F group ($P = 0.008$ and $P = 0.0042$, respectively). Therefore, removal of seminal plasma by the method of centrifugation reduces the quality of semen cryopreserved cattle, a negative effect on fertility of sperm, and the method of filtering with Sperm Filter[®] showed better results evidenced by high rates of embryonic development.

Keywords: centrifugation, cryopreservation, filtration, seminal plasma, semen, bull

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH	Deslocamento lateral da cabeça
AMPc	Adenosina de monofosfato cíclico
APM	Alto potencial mitocondrial
APTA	Agência paulista de tecnologia dos agronegócios
aSFP	Proteína ácida do fluido seminal
ATP	Trifosfato de adenosina
BCF	Frequência de batimento
BPM	Baixo potencial mitocondrial
BSA	Albumina do soro bovino
BSP	Proteína de ligação ao espermatozoide
°C	Graus Celsius
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CASA	Análise computadorizada da cinética espermática
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CIROS+	Células íntegras com ROS positivo
cm	Centímetro
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo cumulus-oócito
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CORR	Correlation
CTROS+	Células totais com ROS positivo
D7	7º dia pós-fertilização
D9	9º dia pós-fertilização
DCFDA	2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão da média
FAPESP	Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo

FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> associada ao isoticionato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GLM	General linear models
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H342	Hoescht 33342
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IP	Iodeto de propídio
JC-1	Carbocianina catiônica lipofílica
kDa	Kilodalton
LIN	Linearidade
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOT	Motilidade total
MPAI	Membrana plasmática e acrossomal íntegras
MPAL	Membrana plasmática e acrossomal lesionadas
MPIAL	Membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada
MPLAI	Membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra
MPM	Médio potencial mitocondrial
mw	Milliwatts
nº	Número
nm	Nanômetro
PGK	Proteína fosfoglicerato-cinase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂

PQC	Pesquisador
PROG	Motilidade progressiva
PS	Plasma seminal
RAP	Velocidade rápida
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SAS	Statistical Analysis Software
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SOF	Fluido sintético do oviduto
SP	São Paulo
STR	Retilinearidade
TALP	Tyrode's Albumin Lactate and Piruvate
TCM 199	Tissue culture medium 199
UNESP	Universidade estadual paulista
VAP	Velocidade do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µm/s	Micrômetro por segundo
%	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Média (\pm EPM) das características da cinética espermática avaliadas pelo CASA pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtração.	55
Tabela 2	Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtração.	55
Tabela 3	Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise do potencial mitocondrial pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtração.	56
Tabela 4	Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise do estresse oxidativo pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtração.	56
Tabela 5	Taxas de desenvolvimento da produção <i>in vitro</i> de embriões utilizando o sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtração.	56
Tabela 6	Correlação dos parâmetros avaliados pós-descongelamento no sêmen bovino que apresentaram pelo menos uma diferença entre os grupos controle, centrifugação e filtração.	57

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

No Brasil, a pecuária, é uma atividade econômica muito importante, consistindo em um subsetor valoroso na composição do produto interno bruto do país (FONSECA, 2000). As raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e seus cruzamentos apresentam grande importância na formação dos rebanhos brasileiros, representando cerca de 80% do efetivo bovino nacional (CARTAXO et al., 2001). Esta subespécie também pode ser observada em todo o mundo, sendo que mais da metade da população mundial de bovinos possui uma proporção da sua constituição genética proveniente dos zebuínos (ABEYGUNAWARDENA; DEMATAWEWA, 2004).

A eficiência reprodutiva é o principal fator que afeta a produção e a eficiência econômica em um rebanho (VISHWANATH, 2003) e o aumento da produtividade pode ser obtido com o emprego de biotecnologias que potencializem o sistema produtivo (CELEGHINI, 2005). As biotecnologias reprodutivas são ferramentas para aumentar o número de descendentes de animais geneticamente superiores, desse modo, existe uma relação natural e uma interação entre o uso dessas tecnologias e o progresso genético do rebanho, aumento da produtividade e redução de custos da produção (VIANA et al., 2010).

A criopreservação de gametas tornou-se um procedimento complementar fundamental na aplicação das biotecnologias reprodutivas, pois elimina as limitações de tempo e localização (PARKS, 1997). Entretanto, os mecanismos envolvidos no processo de criopreservação são prejudiciais aos espermatozoides e mesmo com a utilização das técnicas mais aprimoradas de conservação, somente cerca da metade da população espermática sobrevive à congelação e descongelação (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002). Ademais, a maioria das células que sobrevivem são comprometidas estrutural ou funcionalmente (NAGY et al., 2004). Conseqüentemente, estes danos prejudicam o desempenho reprodutivo do rebanho, visto que uma fertilização bem sucedida depende de um número suficiente de

espermatozoides plenamente competentes e que sobrevivam até a ovulação (WATSON, 2000).

Em geral muitas das estratégias estudadas para alcançar o sucesso da criopreservação não atuam sobre o espermatozoide em si, mas sobre o meio que o envolve (MOCÉ et al., 2010). O plasma seminal que se mistura com os espermatozoides na ejaculação, já foi descrito como benéfico e ao mesmo tempo prejudicial para o espermatozoide (BERGERON et al., 2004). O efeito prejudicial do plasma seminal parece estar relacionado com o tempo de contato com as células (MANJUNATH et al., 2007). Na monta natural o espermatozoide passa um intervalo de tempo relativamente curto em contato com o plasma seminal, mas durante o processamento do sêmen para a criopreservação, o espermatozoide pode passar muito tempo no plasma seminal diluído (BURROUGHS et al., 2013).

Usualmente, a técnica utilizada para a retirada do plasma seminal é a centrifugação. No entanto, vários trabalhos relatam que esse processamento causa injúrias aos espermatozoides, prejudicando a fertilização (ECOT et al., 2005; KNOP et al., 2005; SIEME; KNOP; RATH, 2006). Outro método de separação proposto por Alvarenga et al. (2010) é a filtragem do sêmen, que é aplicada em garanhões. O filtro retém apenas os espermatozoides e permite a passagem do plasma seminal, mas ainda não há relato da sua aplicação em bovinos.

A partir disto, acredita-se que ejaculados de touros colhidos por eletroejaculação possam ter sua criopreservação prejudicada devido à ação deletéria do plasma seminal neste processo. Dessa forma, técnicas de remoção do plasma seminal como a centrifugação e a filtragem podem contribuir para melhores resultados com a criopreservação. Espera-se melhores resultados com a técnica de filtragem, que pode ser menos lesiva aos espermatozoides, podendo contribuir para melhorar a qualidade da criopreservação em touros e com isso melhorar os índices de biotecnologias reprodutivas que utilizam o sêmen criopreservado, como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões. Sendo assim, este trabalho tem como finalidade estudar o efeito das técnicas de centrifugação e filtragem do sêmen para remoção do plasma seminal, sobre a criopreservação do sêmen bovino.

2. Revisão de literatura

A revisão de literatura a seguir relata os assuntos relevantes para a pesquisa de forma detalhada. Nos capítulos que seguem, os temas criopreservação espermática, plasma seminal, centrifugação do sêmen e filtragem com Sperm Filter[®] são abordados de forma mais minuciosa.

2.1 Criopreservação espermática

Desde a descoberta do glicerol como agente crioprotetor efetivo para o espermatozoide do galo por Polge, Smith e Parks (1949), um vasto campo na evolução da biopreservação foi criado. O desenvolvimento de pesquisas foi iniciado a partir da necessidade de melhor conhecimento sobre os crioprotetores, de um processo pelo qual as células possam ser expostas com sucesso a penetração do crioprotetor e de um modo de congelação e descongelação (BAUST; GAO; BAUST, 2009). Diversos estudos vêm sendo realizados em busca de novos agentes crioprotetores, meios de diluição e metodologias para o aprimoramento do processo de criopreservação espermática (CELEGHINI, 2005).

A criopreservação do sêmen busca a produção de um banco de células espermáticas para ser utilizado em diferentes biotecnologias reprodutivas, especialmente a IA, tornando-se uma ferramenta muito importante na distribuição de material genético. A utilização do sêmen bovino criopreservado possibilita a disseminação da genética de diferentes touros para o comércio mundial, visto que um único ejaculado de um touro pode ser utilizado para inseminar várias fêmeas, e também atua na prevenção da disseminação de doenças passíveis de transmissão por meio da monta natural (AMIRAT et al., 2004; BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014; VERBERCKMOES et al., 2005).

A indústria do sêmen criopreservado procura obter taxas de fertilidade semelhantes à do sêmen fresco, utilizando técnicas tradicionais de IA e um baixo número de espermatozoides em cada dose inseminante, para que mais doses possam ser produzidas a partir de cada ejaculado, mas isso só pode ser alcançado melhorando a taxa de sobrevivência celular na criopreservação (MOCÉ et al., 2010;

VISHWANATH; SHANNON, 2000). Para o sucesso da criopreservação do sêmen faz-se necessário a manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides, que devem apresentar integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; MEDEIROS et al., 2002).

A interação entre os espermatozoides e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002). Os constituintes essenciais dos meios de criopreservação são as substâncias iônicas e não iônicas responsáveis pela conservação da osmolaridade e tamponamento, as fontes de lipoproteínas necessárias para a prevenção do choque frio, os crioprotetores como glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO), as fontes de energia apresentadas por açúcares, como glicose e frutose, e os demais aditivos, como antibióticos, enzimas e detergentes (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Geralmente, os diluidores utilizados para criopreservação do sêmen contém leite desnatado, gema de ovo e glicerol como agentes protetores a refrigeração e a criopreservação (SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015). Os espermatozoides de touros são rotineiramente criopreservados usando 4 a 8 % de glicerol (HOLT, 2000).

O sucesso da criopreservação não depende apenas da preservação da motilidade dos espermatozoides, mas também da manutenção da sua função metabólica (WATSON, 2000). Os espermatozoides devem manter integridade do flagelo (para garantir a produção de adenosina trifosfato (ATP) e a motilidade), do núcleo (para manter estável o armazenamento de DNA), do acrossomo (para manter a capacidade de fecundação) e da superfície do segmento equatorial (para que ocorra a ligação ao oócito) (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). No entanto, vários compartimentos anatômicos e bioquímicos dos espermatozoides podem ser alterados durante a refrigeração, congelação e descongelação do sêmen (WATSON, 2000; AMIRAT et al., 2004). Os danos gerados nestes compartimentos são responsáveis pela perda de motilidade, viabilidade, integridade do acrossoma e, finalmente, a perda da capacidade fecundante (HOLT, 2000).

A refrigeração leva a célula a um estado de quiescência, através da redução do seu metabolismo que propicia uma redução dos gastos energéticos e da produção de catabólitos tóxicos, o que contribui para a preservação celular. Porém,

da mesma forma que a congelação pode diminuir ou paralisar algumas reações bioquímicas celulares, ela também pode acelerar outras, gerando injúrias à célula ou até mesmo levar a sua morte (WATSON, 1995; HOLT, 2000). A diminuição da temperatura leva à fase de transição dos lipídeos da membrana, passando da fase líquida ou fluida para a cristalina ou gel o que resulta em uma organização mais rígida da membrana (WATSON, 2000; SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015).

Com relação à curva de congelação, quando um diluidor com crioprotetor alcança temperaturas entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular que resulta em aumento da concentração de solutos no fluido restante fora da célula, fazendo com que os espermatozoides fiquem expostos a uma condição hipertônica. Esta condição leva a uma desidratação celular devido ao transporte de água para fora da célula para manter o equilíbrio entre as concentrações de soluto intra e extracelulares. Este processo de desidratação ocorre quando a curva é lenta o que evita a formação de cristais de gelo intracelular, porém, a alta concentração de solutos pode causar danos às células. Quando a curva é rápida, não haverá tempo para ocorrer a desidratação da célula e a concentração dos meios extra e intracelular serão semelhantes. Isto levará a formação de cristais de gelo intracelulares, que geram estresse osmótico e danos ao espermatozoide (MAZUR, 1963, WATSON, 2000; LEITE et al., 2011; SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2015). Dessa forma, a velocidade da congelação deve ser lenta o bastante para evitar a formação de gelo intracelular, porém rápida o bastante para evitar os danos causados pela exposição prolongada às altas concentrações de soluto (HOLT, 2000).

Um processo diferente ocorre durante a descongelação, onde os espermatozoides são expostos a condições hipotônicas resultantes da absorção de água. A descongelação deve ser realizada de acordo com a velocidade de congelação que foi utilizada, para não ocorrer danos letais às células. Se o sêmen foi congelado em velocidade lenta e for descongelado de forma rápida, poderá ocorrer grande influxo de água, que causará o rompimento da membrana plasmática. Por outro lado, se a velocidade de congelação for rápida e a descongelação lenta, o gelo intracelular poderá se recrystalizar em cristais maiores,

provocando a lesão mecânica da membrana espermática (MAZUR, 1963, SQUIRES et al., 1999; LEITE et al., 2011)

De uma forma geral, 40 a 50% da população espermática não sobrevive ao processo de criopreservação e as células que sobrevivem são comprometidas estrutural ou funcionalmente pós-descongelação, prejudicando sua capacidade de fertilização (WATSON, 2000; NAGY et al., 2004). Após a criopreservação, espermatozoides de touro mostram danos na membrana plasmática (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009; FORERO-GONZALEZ et al., 2012) no citoesqueleto (FELIPE-PÉREZ et al., 2012), aumento dos níveis de cálcio intracelular (BAILEY; BUHR, 1993.; PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009) e potássio (BLÄSSE et al., 2012), a redistribuição de proteínas da membrana plasmática, diminuição da tolerância ao estresse hipotônico, e uma diminuição do pH intracelular e AMPc (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009; BLÄSSE et al., 2012). As modificações e os danos subletais induzidos pela criopreservação resultam em uma vida útil dos espermatozoides reduzida e uma diminuição da capacidade do espermatozoide interagir com o ambiente do trato reprodutor feminino (MEDEIROS et al., 2002; BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

Os efeitos da criopreservação sobre a função do espermatozoide são semelhantes aos efeitos da capacitação espermática, e ambas conduzem a aumento da permeabilidade da membrana e aumento da geração de espécies reativas ao oxigênio (em inglês, ROS) (MEDEIROS et al., 2002). Imediatamente após a descongelação, quase 50% dos espermatozoides estão capacitados e mais de 20% perderam o acrossoma (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). Espermatozoides submetidos à criopreservação são expostos às condições combinadas de diluição do plasma seminal, baixa temperatura, e ambiente hipertônico. Estas condições conduzem a perda e recuperação de componentes da membrana plasmática do espermatozoide semelhantes aos observados na capacitação (MEDEIROS et al., 2002).

Hu et al. (2010) relataram que o processo de congelamento e descongelamento do sêmen por si só leva à geração de ROS que prejudicam a motilidade espermática, integridade de membrana e o potencial fertilizante. A adição de colesterol para aumentar a estabilidade das membranas e a utilização de compostos antioxidantes

para neutralizar os efeitos das ROS, podem melhorar a qualidade dos espermatozoides criopreservados (MORAES et al., 2010; ANSARI et al., 2011). Entretanto, estas substâncias podem não ser suficientes para melhorar a capacidade de fertilização na população de espermatozoides móveis, pois os eventos relacionados com o colesterol da membrana e a produção de ROS podem ser parte de uma cascata de eventos iniciados com a diluição do plasma seminal e redução da temperatura (MEDEIROS et al., 2002).

As dificuldades associadas com a congelação do sêmen são principalmente as variações de temperatura que os espermatozoides são submetidos durante o processamento, os efeitos prejudiciais dos componentes presentes no meio de diluição e dos crioprotetores e os efeitos da descongelação (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Em revisão de Mocé et al. (2010) os autores relataram que a criopreservação do sêmen é um problema multifatorial, onde os diluidores, os protocolos, a espécie, a raça e os touros individualmente dentro de cada raça são apenas alguns dos muitos parâmetros que precisam ser incluídos na equação final para o sucesso. Cada um desses parâmetros possui uma variedade de fatores e cada um influencia os outros parâmetros. Testar todos os fatores ao mesmo tempo para otimizar um protocolo de congelação é tecnicamente impossível, portanto, várias estratégias (cada uma testando alguns fatores) são utilizadas para resolver este problema.

Algumas das estratégias para alcançarmos o sucesso da criopreservação incluem a mudança dos diluidores, dos crioprotetores e suas concentrações, assim como alteração das curvas de congelação e/ou descongelação do protocolo. Outras estratégias se concentram na compreensão das diferenças existentes entre o sêmen que criopreserva bem daquele que não apresenta bons resultados, incluindo as diferenças na composição do plasma seminal, ou tentando determinar quando e onde os danos aos espermatozoides ocorrem para modificar ou ultrapassar esse ponto crítico no protocolo. Em geral, essas estratégias não atuam sobre o espermatozoide em si, mas sobre o meio que o envolve (MOCÉ et al., 2010). Para melhor compreensão das alterações bioquímicas ocorridas durante os processos de criopreservação também é importante o esclarecimento sobre as interações do plasma seminal e dos meios diluidores, frente aos diferentes padrões de fertilidade

e/ou congelabilidade do sêmen de indivíduos de uma mesma população (RONCOLETTA, 2003).

2.1 Plasma seminal

O fluido que é adicionado aos espermatozoides durante o transporte epididimário e a ejaculação é denominado de plasma seminal (PS) e é produzido pelo epidídimo e glândulas sexuais anexas (BURROUGHS et al., 2013). Constitui-se em uma secreção complexa que contribui significativamente para o volume do sêmen (REGO et al., 2015) e apresenta uma grande importância fisiológica por carrear os gametas masculinos até o sistema reprodutor feminino, dando condições para a viabilização do processo de fertilização (RONCOLETTA et al., 1999).

Em bovinos ele apresenta diferentes funções, como o transporte ao trato genital feminino (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; BERGERON et al., 2004), participação no processo de capacitação espermática, reação acrossomal (THÉRIEN; BLEAU; MANJUNATH, 1995; THÉRIEN; SOUBEYRAND; MANJUNATH, 1997; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; MOURA et al., 2007) e fertilização (MOURA et al., 2007; GWATHMEY et al., 2006; SOUZA et al., 2008) e proteção ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica (MOURA et al., 2007; RAO et al., 2013).

O principal componente do plasma seminal (em peso) é proteína, e é este componente que é considerado como sendo o modulador dominante da função dos espermatozoides (LEAHY; GRAAF, 2012). Segundo Rego et al. (2015) o plasma seminal proveniente de diferentes métodos de colheita apresenta diferenças em sua proteômica. A maior quantidade das proteínas em amostras obtidas por vagina artificial são de origem epididimal e em amostras obtidas por eletroejaculação são de origem das glândulas sexuais anexas. Os mesmos autores relataram que no plasma seminal recuperado por vagina artificial foram identificadas 21 proteínas caracterizando-se a transferrina, albumina e glutathione peroxidase, entre outras, e em amostras obtidas por eletroejaculação 26 proteínas foram identificadas, como a espermedesina 1, clusterina, espermedesina Z13, catepsinas, entre outras. Em outro estudo recente em touros, foi relatado que as proteínas de ligação a espermatozoides (em inglês, BSPs) são mais abundantes no líquido seminal obtido

por eletroejaculação do que por massagem retal e que as proteínas fosfoglicerato-cinase (em inglês, PGK) e fosfolipase A₂ (em inglês, PLA₂) somente são encontradas no plasma seminal de sêmen colhido por massagem retal (SARSAIFI et al., 2015)

As proteínas do plasma seminal advindas do epidídimo desempenham papéis na maturação final dos espermatozoides e as proteínas das glândulas sexuais anexas contribuem para a capacitação espermática, motilidade, reação acrossomal e proteção dos espermatozoides ao estresse oxidativo e respostas imunes. Tais proteínas também participam da interação do espermatozoide com o epitélio do oviduto e o processo de fertilização (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010; REGO et al., 2014, REGO et al., 2015). Moura et al. (2010) relataram proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo de touros que desempenham importante papel na remodelação da membrana dos espermatozoides, no transporte de substâncias lipofílicas e íons, na proteção dos espermatozoides a reações oxidativas e ataque imunológico e na prevenção a uma reação acrossômica prematura.

Uma importante proteína encontrada em grande quantidade no plasma seminal de bovinos é a proteína ácida do fluido seminal (aSFP), secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo. Esta proteína parece ser um bom marcador bioquímico para a alta fertilidade dos touros (RONCOLETTA, 2003), pois preserva a integridade da membrana, agindo como um redutor da peroxidação lipídica espermática, além de regular de acordo com a sua concentração, a atividade mitocondrial e a motilidade espermática (SCHÖNECK; BRAUM; EINSPANIER, 1996).

Em bovinos, já foi relatado que existe diferença nas proteínas do plasma seminal entre os animais que tem boa resposta à congelação e aqueles que são mais sensíveis, sugerindo que o estudo dessas proteínas poderiam ser utilizadas como marcadores da congelabilidade ou funcionar como biomarcadores da fertilidade (JOBIM et al., 2003, RONCOLETTA et al., 1999). Em estudo mais recente, também foi demonstrado que as proteínas do plasma seminal podem servir como biomarcadores da fertilidade em touros e sugere-se que a avaliação simultânea da expressão dessas proteínas, juntamente com outros ensaios de fertilidade possa

ajudar a determinar a fertilidade em bovinos (ASLAM et al., 2014). Além disto, já foi relatado que há proteínas específicas do plasma seminal de touros Brahman que tem associação com porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e que essas relações indicam que a composição proteica do plasma seminal em touros pós púberes representa impressões acerca da função do testículo e epidídimo ou da homeostase do trato genital masculino (BOE-HANSEN et al., 2015).

Os espermatozoides e o plasma seminal possuem um sistema antioxidante que compreende diferentes substâncias, como a taurina, glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) para prevenir o dano oxidativo. No entanto, esta capacidade antioxidante é limitada nas células espermáticas, devido ao componente citoplasmático que contém os antioxidantes ser de tamanho reduzido, mostrando a função do plasma seminal na prevenção do estresse oxidativo (SARIÖZKAN et al., 2009). Recentemente, em bovinos, foi relatado que o fator touro é responsável por mais de 86% da variação da capacidade antioxidante total no plasma seminal, enquanto o fator ejaculado contribui com apenas 2% dessa variação (GÜRLER; CALISICI; BOLLWEIN, 2015).

Apesar dos vários relatos do efeito benéfico do plasma seminal aos espermatozoides, ele também já foi descrito como prejudicial (BERGERON et al., 2004) e isto está intimamente relacionado com o tempo de contato entre eles (MANJUNATH et al., 2007). Na monta natural o espermatozoide passa um intervalo de tempo relativamente curto em contato com o plasma seminal, mas durante o processamento do sêmen para a criopreservação ou sexagem, o espermatozoide pode passar horas, até mesmo um dia, no plasma seminal diluído (BURROUGHS et al., 2013). Moore, Squires e Graham (2005) relataram que, em garanhões, a presença do plasma seminal apresenta um efeito muito pequeno para a qualidade e viabilidade espermática quando o sêmen é criopreservado imediatamente após a colheita, porém, quando o sêmen é exposto por um longo tempo ao plasma seminal antes da congelação, ele torna-se prejudicial para a sobrevivência espermática pós-criopreservação.

A maior fração proteica (50 a 70%) do plasma seminal bovino é composta por uma família de proteínas de ligação a fosfolipídeos, chamadas coletivamente de proteínas BSPs (MANJUNATH et al., 2007). Suas características e funções foram

amplamente descritas em estudo de Manjunath et al. (2002), principalmente em relação ao efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana do espermatozoide que se relacionam com o processo de capacitação espermática. Este efluxo é concentração e tempo dependente e, por isso, uma exposição contínua das células ao plasma seminal pode ser lesiva à membrana dos espermatozoides (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1999, BERGERON et al., 2004). Este fato pode tornar o espermatozoide mais sensível ao processo de preservação através da criopreservação (MANJUNATH et al., 2007) ou levar a uma capacitação prematura pós-descongelamento, afetando o processo de fertilização (NAUC; MANJUNATH, 2000).

Mais informações sobre a função das BSPs nos touros foi possível devido ao vasto conjunto de dados referentes à reprodução que é gerada pela grande indústria da IA nos rebanhos (LEAHY; GRAAF, 2012). Avaliando touros com alta e baixa fertilidade, foi visto uma abundância relativa de BSP1 (D'AMOURS et al., 2010) e BSP3 (RONCOLETTA et al., 2006) positivamente associada com baixa fertilidade. Outro estudo relatou que maiores quantidades de BSP 30 kDa tornou-se prejudicial para a fertilidade (MOURA et al., 2006) concordando com estudos que relatam que a exposição do espermatozoide a concentrações crescentes de BSP provoca danos na membrana espermática, resultante de um excesso de efluxo de lipídios (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Em outro estudo foi relatado o efeito deletério do plasma seminal sobre o espermatozoide bovino, pelo aumento da liberação de L-aminoácido oxidase e redução da motilidade espermática quando a criopreservação foi realizada na presença do plasma seminal (MARTINUS; MOLAN; SHANNON, 1991).

Em garanhões, a remoção do plasma seminal é um processo complementar essencial para refrigeração ou criopreservação do sêmen (LOOMIS, 2006; RAMIRES NETO et al., 2013b). Diversos estudos já relataram que o plasma seminal apresenta efeitos deletérios para refrigeração do sêmen equino (KARESKOSKI; KATILA, 2008; RIGBY et al., 2001; BRINSKO et al., 2000). A refrigeração do sêmen de alguns garanhões, apresentam menor qualidade seminal e viabilidade na presença do plasma seminal (RAMIRES NETO et al., 2013). A motilidade espermática e integridade do DNA são superiores em amostras com remoção

completa do plasma seminal, em comparação com as amostras com plasma seminal (LOVE et al., 2005).

Como evidenciado, muitas proteínas presentes no plasma seminal bovino têm importância nos processos de maturação espermática, proteção, capacitação, reação acrossomal e fertilização (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; JUYENA; STELLETTA, 2012; REGO et al., 2014). Para o processo de fecundação, é muito importante uma composição apropriada do plasma seminal que viabilize as funções metabólicas do espermatozoide, tanto em situação de monta natural como no processo de criopreservação espermática e utilização do sêmen para IA (RONCOLETTA et al., 1999). Apesar disso, parece que os efeitos benéficos destas substâncias não são transferidos para o desenvolvimento embrionário (STINSHOFF et al., 2012).

Em estudo realizado para avaliar o efeito do plasma seminal na fertilidade *in vitro* em bovinos foi relatado que espermatozoides congelados na ausência do plasma seminal geraram mais oócitos fertilizados, maior taxa de clivagem e de embriões no estágio de blastocisto em relação ao sêmen congelado na presença do plasma seminal (KAŤSKA; RYŃSKA; SMORAĞ, 1996). Rodríguez-Villamil et al. (2016) estudaram o efeito da proteína BSP1 do plasma seminal sobre a capacitação espermática *in vitro* e taxas de clivagem e blastocistos após fertilização *in vitro* (FIV) com espermatozoides de ejaculado e do epidídimo. Esses autores observaram a capacidade de ligação da BSP1 com o espermatozoide para realização do processo de capacitação e consequente reação acrossomal, através do efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana plasmática. Com relação à FIV, quando baixas concentrações de BSP1 purificada foram adicionadas ao meio Fert-TALP, maiores taxas de clivagem e de blastocistos foram observadas, porém altas concentrações resultou um efeito prejudicial relatado pela menor taxa de blastocistos. Em contraste com o que foi detectado com espermatozoides do ejaculado, a BSP1 não foi prejudicial para as taxas da FIV quando foi utilizado espermatozoides epididimários. Desta forma, ficou evidente que a exposição prévia ao plasma seminal e as concentrações distintas de BSP1 interferem na resposta dessa proteína sobre a capacitação e fertilização em touros.

2.2 Métodos para remoção do plasma seminal

A seguir serão relatados dois processos de remoção do plasma seminal que serão alvo de estudo deste trabalho de pesquisa: centrifugação do sêmen e filtragem com Sperm Filter®.

2.2.1 Centrifugação do sêmen

A centrifugação é uma técnica usualmente utilizada para concentrar espermatozoides do ejaculado e remover o plasma seminal para minimizar seus efeitos deletérios sobre a qualidade do sêmen (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al., 2013; SIEME et al., 2015). Estudos sobre diferentes protocolos de centrifugação já foram relatados em humanos (SHEKARRIZ et al., 1995) e diferentes espécies animais, como: ratos (KATKOV; MAZUR, 1998), cães (RIJSSELAERE et al., 2002), cavalos (MACPHERSON et al., 2001) e javalis (CARVAJAL et al., 2004).

Especialmente em equinos este é o método que rotineiramente é utilizado, pelo fato da remoção do plasma seminal ser um procedimento complementar essencial para refrigeração e criopreservação do sêmen nesta espécie (SIEME et al., 2003). A centrifugação do sêmen é muitas vezes aplicada em programas de melhoramento genético em equinos, mostrando a importância de estudar e aprimorar este procedimento (WAITE et al., 2008).

O objetivo da centrifugação é atingir uma elevada taxa de recuperação de espermatozoides, com o mínimo possível de danos celulares (MACPHERSON et al., 2001). A intensidade e o tempo de centrifugação adequados a uma maior recuperação de células espermáticas, com mínimos danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, é um fator fundamental para obtenção de bons índices de congelabilidade do sêmen (HEITLAND et al., 1996).

Apesar da centrifugação não exercer efeito sobre a morfologia dos espermatozoides (VIDAMENT et al., 2001), ela deve ser realizada com muito cuidado, pois diversos estudos científicos já relataram que esta técnica causa injúrias aos espermatozoides, reduzindo sua motilidade e fertilidade (SHARMA et al., 1997; AURICH, 2008, KARESKOSKI et al., 2006; SIEME et al., 2003).

As complicações resultantes deste processo se concentram no fato de que a intensidade e o tempo da centrifugação podem interferir negativamente na motilidade, na integridade da membrana plasmática e na taxa de recuperação dos espermatozoides (RAMIRES NETO et al., 2013). Hallap et al. (2004) observaram em bovinos que valores da motilidade total avaliados de forma subjetiva ou pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA; Computer Assisted Sperm Analysis) são reduzidos pelo processo de centrifugação, da mesma forma que a integridade da membrana plasmática é prejudicada por esse processo.

Um fator depreciativo da centrifugação está no fato de que este método apresenta perda de 25% dos espermatozoides no sobrenadante, resultando em taxa de recuperação de apenas 75% (AURICH, 2008; LOOMIS, 2006), sendo que o sedimento final da centrifugação apresenta um grande número de espermatozoides mortos, comprometidos ou anormais (HALLAP et al., 2004). A centrifugação pode estimular espermatozoides com a capacidade funcional prejudicada (caracterizados por significativa redução da motilidade e capacidade fecundante) a produzir ROS, o que prejudica a capacidade de fertilização das células normais presentes na mesma suspensão (AITKEN; CLARKSON, 1988).

Pelo fato dos espermatozoides que não passam pelo processo de centrifugação apresentarem maior número de espermatozoides móveis, viáveis e sem reação no acrossoma, em comparação com espermatozoides que são centrifugados, este processamento chega a ser indicado somente quando é realmente necessário, como nos casos de ganhões oligospermicos ou que são sensíveis à refrigeração por ação do plasma seminal (LEN et al., 2010).

A relação entre a força centrífuga e a duração do processo está diretamente relacionada ao dano causado aos espermatozoides e também a quantidade de espermatozoides que são recuperados. Quando usamos uma força centrífuga muito alta, os espermatozoides se aderem fortemente no momento da formação do sedimento, o que é prejudicial para as células; e se a força centrífuga for muito baixa, a taxa de recuperação espermática também é muito baixa (VIDAMENT et al., 2001; KATKOV; MAZUR, 1999; WAITE et al., 2008). Além disso, a aplicação de força muito baixa por um curto período de tempo leva a perda de espermatozoides

com qualidade alta no sobrenadante, o que deve ser evitado (HOOGEWIJS et al., 2010).

Diversos estudos já buscaram determinar a melhor força e tempo de centrifugação para remoção do plasma seminal no sêmen (BRINSKO et al., 2000; JASKO et al., 1991; MOORE; SQUIRES, GRAHAM, 2005; MACPHERSON et al., 2001). Geralmente ela é realizada com sêmen diluído, a uma força de 400 a 600 X g por 10 a 15 minutos, pelo fato de uma centrifugação mais vigorosa resultar em perda da qualidade espermática por causar danos aos espermatozoides no momento da formação do sedimento na parte inferior dos tubos de centrifugação (AURICH, 2008).

Dell'Aqua Jr et al. (2001) relataram que a centrifugação a 600 X g por 10 minutos proporciona melhor integridade de membrana e qualidade dos espermatozoides, além de reduzir a perda espermática em equinos. Ramires Neto et al. (2013b) afirmaram que este protocolo de centrifugação não causa danos aos espermatozoides e não afeta a cinética espermática em garanhões. Em estudo de Alberti (2007) em bovinos, foi relatado que a remoção do plasma seminal por centrifugação a 600 X g por 10 minutos foi positiva para a criopreservação do sêmen, resultando em boa taxa de recuperação espermática, sem comprometer a qualidade morfofuncional dos espermatozoides.

Alvarenga et al. (2010) observaram que espermatozoides refrigerados são provavelmente mais sensíveis ao processo de centrifugação. A realização da centrifugação após a refrigeração resulta em porcentagens menores de integridade de membrana em comparação com o sêmen que passou pela centrifugação imediatamente após a colheita (HEUTELBECK et al., 2015), sendo melhor realizar a centrifugação do sêmen o mais rápido possível, de forma a diminuir os danos que se acumulam durante a refrigeração (SIEME et al., 2015).

O processo de centrifugação também é rotineiramente utilizado em laboratórios comerciais no momento da preparação do sêmen através do gradiente de Percoll®, para selecionar espermatozoides vivos e aumentar sua concentração para utilização na FIV (LEE et al., 2009). Risopatrón et al. (1996) relataram efeito depreciativo da lavagem e centrifugação do sêmen a 500 X g por 10 minutos antes

da FIV, sobre a motilidade, integridade acrossomal e fertilização dos espermatozoides que foi avaliada através da formação de pronúcleos.

Machado et al. (2009) relataram que menor tempo de centrifugação (5 minutos), com força maior (5000 X g) sobre volume reduzido de Percoll, reduz os efeitos negativos desse processamento sobre a qualidade espermática e o desenvolvimento embrionário em bovinos. Guimarães et al. (2014) observaram que alta força de centrifugação (9000 X g) reduz a taxa de penetração dos espermatozoides nos oócitos e prejudica a fertilização, sugerindo que uma força menor (2200 X g) seja melhor para ser utilizada na FIV de embriões bovinos. Esses autores também relataram que altas forças de centrifugação em bovinos, aumentam a produção de ROS e reduzem diversos parâmetros da qualidade espermática, como o vigor e a motilidade, quando o sêmen é processado em *pool*.

A força de centrifugação pode influenciar na integridade do acrossoma e membrana plasmática do espermatozoide, bem como na motilidade, com efeitos na interação do espermatozoide com o oócito, na fertilização e na produção de embriões (MACHADO et al., 2009). Porém, nenhum estudo científico determinou a melhor força de centrifugação para remoção do plasma seminal e de outros constituintes em touros, isto é, a velocidade em que a perda celular é menor e os espermatozoides que ficam no pellet permanecem funcionais para sua utilização na fertilização (GUIMARÃES et al., 2014).

2.2.2 Filtragem com Sperm Filter®

Outro método de separação do plasma seminal de fácil aplicabilidade proposto por Alvarenga et al. (2010) é a filtragem do sêmen. Para realização da filtragem é utilizado o dispositivo Sperm Filter® (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil), que permite a passagem do plasma seminal e retém apenas os espermatozoides. Esses autores relataram que o filtro retém os espermatozoides de forma eficaz e não causa danos à motilidade e viabilidade espermática, além de ser uma técnica potencialmente útil para animais que apresentam sêmen de baixa qualidade e precisam passar por separação dos

espermatozoides do plasma e/ou diluidor ou concentração espermática para refrigeração, criopreservação e produção de doses para IA.

Este filtro apresenta 12 cm de diâmetro e é constituído por uma membrana hidrofílica sintética com poros de 2 µm; o filtro está ligado a um anel de plástico que pode conter até 50 ml de sêmen para filtração. O sêmen é diluído com extensor e é depositado sobre a membrana, e o filtro é então manuseado suavemente sobre uma placa de Petri de 15 cm. Devido ao tamanhos dos poros e capilares de ação, 90 a 95% do plasma seminal passa através do filtro, retendo os espermatozoides, como é ilustrado na Figura 1. Depois de passar pela filtragem, os espermatozoides que ficaram retidos no filtro são ressuspensos com diluidor até que a concentração espermática desejada seja atingida. O processo de filtração de 20 ml de sêmen diluído e posterior ressuspensão exige um intervalo médio de cinco minutos para ser concluído (RAMIRES NETO et al., 2013b).

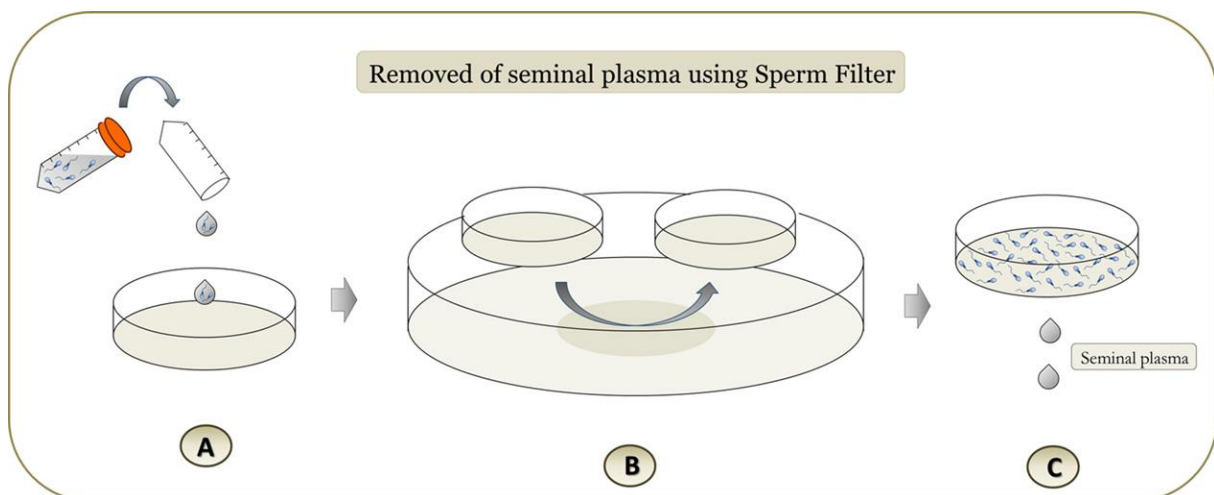


Figura 1. Sêmen do garanhão é diluído com um diluente e é depositado sobre a membrana (A), o filtro é manuseado suavemente sobre uma placa de Petri de 15 cm (B). Por causa do tamanho dos poros e ação dos capilares o plasma seminal passa através do filtro e os espermatozoides ficam retidos (C).

(RAMIRES NETO et al., 2013b)

Já foi relatado em garanhões que este filtro é tão eficiente quanto a centrifugação para remoção do plasma seminal e apresenta como vantagem, maior praticidade e menor taxa de perda espermática (RAMIRES NETO et al., 2013). Em outro estudo com uso do Sperm Filter®, foi afirmado que seu uso não causa danos

aos espermatozoides, sendo que não houve diferenças na cinética espermática e integridade da membrana plasmática em comparação com sêmen fresco em diluidor à base de leite desnatado (RAMIRES NETO et al., 2013b). Alvarenga et al. (2012) relataram que a retirada do plasma seminal após 24 horas de refrigeração pela filtragem com Sperm Filter® apresentou melhores parâmetros cinéticos em comparação com a centrifugação no sêmen de garanhões.

Outro trabalho em equinos, não encontrou diferença entre a centrifugação convencional (600 X g por 10 minutos), a centrifugação com cushion e a filtragem com Sperm Filter® nos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e funcionalidade e integridade da membrana plasmática, além de relatar que a filtragem não diferiu na taxa de recuperação espermática em relação aos outros métodos (filtragem: 77%; centrifugação convencional: 72% e centrifugação com cushion: 85%) (DAVOLLI et al., 2012). Porém outros autores encontraram resultados melhores e observaram que a taxa de recuperação proveniente da filtragem com Sperm Filter® é superior (89%) em comparação com a centrifugação (81%), fato que é de grande importância por influenciar o número de doses do sêmen que podem ser produzidas (RAMIRES NETO et al., 2013b).

Alvarenga et al. (2012) observaram que a filtragem no sêmen de garanhões reduz o crescimento bacteriano no sêmen, possivelmente por permitir a passagem de bactérias juntamente com o plasma seminal, o que tem grande importância, sendo que a contaminação do sêmen pode reduzir as taxas de fertilidade. Porém, ainda há a necessidade de realizar estudos que avaliem a fertilidade do sêmen submetido a remoção do plasma seminal pela filtragem com Sperm Filter® (RAMIRES NETO et al., 2013b). Não há relatos de descrição dessa metodologia em bovinos até o presente momento.

3. Referências

ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C. M. B. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 373- 387, 2004.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 9, n. 6, p. 367-376, 1988.

ALBERTI, K. **Inovações metodológicas na congelação do sêmen bovino**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MAGALHÃES, L. C. O.; PAPA, F. O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121S, p. S186–S187, 2010.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; KIEVITSBOSCH, T. ; CHAVES, M. M. B. C.; RAMIRES NETO, C. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 32, 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**, Maryland Heights, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, New York, v. 61, p. 895-907, 2004.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; ULLAH, N.; ANDRABI, S. M. H.; KHALID, M.; AKHTER, S. Effect of L-cysteine in Tris-citric egg yolk extender on post-thaw quality of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa, **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 43, n. 1, p. 41-47, 2011.

ASLAM, M. K. M.; KUMARESAN, A.; SHARMA, V. K.; TAJMUL, MD.; CHHILLAR, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; MANIMARAN, A.; MOHANTY, T. K.; SRINIVASAN, A.; YADAV, S. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. **Theriogenology**, New York, v. 82, p. 1254-1262, 2014.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, p. 268-275, 2008.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Ca²⁺ regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, p. 470-481, 1993.

BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 90-96, 2009.

BERGERON, A.; CRÊTE, M.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 70, p. 708–717, 2004.

BLÄSSE, A. K.; OLDENHOF, H.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; WOLKERS, W. F.; SIEME, H.; BOLLWEIN, H. Osmotic tolerance and intracellular ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 78, p. 1312-1320, 2012.

BOE-HANSEN, G. B.; REGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; BURNS, B. M.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 162, p. 20-30, 2015.

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**, New York, v. 54, p. 129-136, 2000.

BURROUGHS, C. A.; GRAHAM, J. K.; LENZ, R. W.; SEIDEL JR, G. E. Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. **Theriogenology**, New York, v. 79, p. 551-557, 2013.

BÜYÜKLEBLEBİCİ, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; EKEN, A.; SARIÖZKAN, S.; TAŞDEMİR, U.; ENDİRLİK, B. Ü. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, p. 77–83, 2014.

CARTAXO, W. O.; PEÑA-ALFARO, C. E.; BACALHAU, A.; ALBUQUERQUE, R. P. F.; SILVA, M. A. V.; AZEVEDO NETO, J.; BAKKE, A. O.; SOUZA, N. L.; TORRES, L. L.; GUEDES, P. L.; NASCIMENTO, M. S. Parâmetros seminais e circunferência escrotal de touros jovens da raça Guzerá criados no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 214-215, 2001.

CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 3, p. 389-396, 2004.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; FORTIER, M.; LECLERC, P.; SULLIVAN R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction**, Chicago, v. 139, p. 545–556, 2010.

DAVOLLI, G. M.; CAMOZZATO, G. C.; FIGUEIREDO, M. M.; BASTOS, H. B. A.; CAZALES, N.; MATTOS, R. C. Effect of different sperm concentration methods on sperm quality and recovery rate. **Journal of Equine Veterinary Science**, Maryland Heights, v. 32, p. 482-483, 2012.

DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 324-325, 2001.

ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; DELHOMME, G.; VIDAMENT, M. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, p. 245-248, 2005.

FELIPE-PÉREZ, Y. E.; VALENCIA, J.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M. L.; PESCADOR, N.; ROA-ESPITIA, A. L.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O. Cytoskeletal proteins F-actin and β -dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 64, p.103–109, 2012.

FONSECA, V. O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva do rebanho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 205, p. 48-63, 2000.

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, Malden, v. 44, p. 154–159, 2012.

GUIMARÃES, A. C. G.; LEIVAS, F. G.; SANTOS, F. W.; SCHWENGBER, E. B.; GIOTTO, A. B.; MACHADO, C. I. U.; GONÇALVES, C. G. M.; FOLCHINI, N. P.; BRUM, D. S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 146, p. 103-110, 2014.

GÜRLER, H.; CALISICI, O.; BOLLWEIN, H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 155, p. 99-105, 2015.

GWATHMEY, T. Y. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 75, p. 501-507, 2006.

HALLAP, T.; HÅÅRD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 3-4, p. 702-713, 2004.

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

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

HEUTELBECK, A.; OLDENHOF, H.; ROHN, K.; MARTINSSON, G.; MORRELL, J. M.; SIEME, H. Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: perform sperm selection directly after collection or after storage? **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 76-83, 2015.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 47–58, 2000.

HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; VliegHER, S.; VANHAESEBROUCK, E.; SCHAUWER, C.; GOVAERE, J.; THYS, M.; HOFLACK, G.; SOOM, A. V.; KRUIF, A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, New York, v. 74, p. 118-126, 2010.

HU, J. H.; ZAN, L. S.; ZHAO, X. L.; LI, Q. W.; JIANG, Z. L.; LI, Y. K.; LI, X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen–thawed bovine semen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 1657-1662, 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, Kaunas v. 17, n. 39, p. 1-8, 2002.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, 1991.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 21-30, 2003.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, p. 249-256, 2008.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n.1, p. 33–38, 2006.

KĄTSKA, L.; RYŃSKA, B.; SMORAĞ, Z. Effect of seminal plasma on the *in vitro* fertilizability of bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 44, p. 23-31, 1996.

KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 31, p. 231-245, 1999.

KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Influence of centrifugation regimes on motility, yield and cell associations of mouse spermatozoa. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 19, n. 2, p. 232-241, 1998.

KELLY, V. C.; KUY, S.; PALMER, D. J.; XU, Z.; DAVIS, S. R.; COOPER, G. J. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5826–5833, 2006.

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

LEAHY, T.; GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, suppl. 4, p. 207-213, 2012.

LEE, H.; KIM, S.; JI, D.; KIM, Y. 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**, Seoul, v. 10, n. 3, p. 249–255, 2009.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científicas Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

LEN, J. A.; JENKINS, J. A.; EILTS, B. E.; PACCAMONTI, D. L.; LYLE, S. K.; HOSGOOD, G. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology**, New York, v. 73, p. 225-231, 2010.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 22, p. 663-676, 2006.

LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, New York, v. 63, p. 1584–1591, 2005.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 71, p. 1289–1297, 2009.

MACPHERSON, M. L.; SHORE, M. D.; FERNANDEZ, M. H.; MILLER, C. D.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n. 6, p. 27-29, 2001.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 217-228, 2007.

MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A., MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, Concado de Clare, v. 53, p. 109–119, 2002.

MARTINUS, R. D.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryo-preservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 34, n. 3, p. 281-285, 1991.

MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal of General Physiology**, New York, v. 47, p. 347–369, 1963.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 327-344, 2002.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, supl. 2, p. 57-66, 2010.

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

MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, p. 148–154, 2010.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, p. 169–188, 2007.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 201–211, 2006.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 2006-2020, 2010.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 80, p. 225-235, 2004.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, p. 1058–1066, 2000.

PARKS, J. E. Hypothermia and mammalian gametes, In: KAROW, A. M.; RITSER, J. K. (Ed.). **Reproduction tissue banking: scientific principles**. San Diego: Academic, 1997. p. 229-261.

POLGE, J. E.; SMITH, A. U.; PARKS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666, 1949.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v. 21, n. 4, p. 525- 537, 2009.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, 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**, Maryland Heights, v. 33, p. 40-43, 2013.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O.; CASTRO-CHAVES, M. M.; ALVARENGA, M. A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, New York, v. 79, p.1120-1123, 2013b.

RAO, T. K. S.; KUMAR, N.; PATEL, N. B.; CHAUHAN, I.; CHAURASIA, S. Sperm selection techniques and antioxidant fortification in low grade semen of bulls: Review. **Veterinary World**, v. 6, p. 579-585, 2013.

REGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 148, p. 1-17, 2014.

REGO, J. P. A.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; MCGOWAN, M. R.; BOE-HANSEN, G. B. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 160, p. 126-137, 2015.

RIGBY, S. L.; BRINSKO, S. P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 171-180, 2001.

RIJSSELAERE, T.; SOOM, A. V.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on *in vivo* survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 1669–1681, 2002.

RISOPATRÓN, J.; SANCHÉZ, R.; SEPÚLVEDA, N.; PEÑA, P.; VILLAGRAN, E.; MISKA, W. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 65-73, 1996.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal plasma proteins: What role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, Malden, v. 66, supl. 1, p. 11–22, 2011.

RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, A. N.; AGUIAR, L. H.; MORENO, F. B.; VELHO, A. L. M. C. S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A. A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine *in vitro* embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, New York, v. 85, p. 540-554, 2016.

RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. 2003. 104 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em *SDS-PAGE* das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 82-86, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; ESPER, C. R.; BARNABE, V. H.; FRANCESCHINI, P. H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 91, p. 77–87, 2006.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAS, P. A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and

fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, p. 134-138, 2009.

SARSAIFI, K.; VEJAYAN, J.; HARON, A. W.; YUSOFF, R.; HANI, H.; RASOLI, M.; OMAR, M. A.; OTHMAN, A. M. Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 172, p. 96-105, 2015.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSPF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 633-642, 1996.

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

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. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 38, p. 134-140, 2003.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; MARTINSSON, G.; BURGER, D.; WOLKERS, W. F. Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n.1, p. 11-14, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, suppl. 3, p. 20-26, 2015.

SHARMA, R. K.; VEMULAPALLI, S.; KOHN, S.; AGARWAL, A. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. **Archives of Andrology**, v. 39, p. 33-38, 1997.

SHEKARRIZ, M.; DEWIRE, D. M.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**, Amsterdam, v. 28, p. 31–35, 1995.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. (Colorado State University Bulletin, 9).

STINSHOFF, H.; KRIENKE, M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; FRESE, D.; RATH, D.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 78, p. 132-139, 2012.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; MONACO, E.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, p. 72-89, 2008.

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 52, p. 1372-1379, 1995.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 61, p. 590-598, 1999.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A. V.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, New York, v. 63, p. 912-922, 2005.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, supl. 2, p. s661-s674, 2010.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J., NOUE, P.; COTTRON, S.; TELLIER, A. L.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M.

Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 201-218, 2001.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 571-584, 2003.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 23-53, 2000.

WAITE, J. A.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; TEAGUE, S. R.; SALAZAR JR, J. L.; MANCILL, S. S.; VARNER, D. D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, New York, v. 70, p. 704-714, 2008.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v. 7, p. 871-91, 1995.

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

CAPÍTULO 2 – Remoção do plasma seminal na criopreservação do sêmen de touros

Resumo

A criopreservação do sêmen de touros é uma biotécnica largamente utilizada na reprodução de bovinos. Entretanto, quando o ejaculado é obtido por eletroejaculação há uma grande variação na relação plasma seminal (PS)/espermatozoides, podendo afetar os índices de congelabilidade nessa espécie. Nesse sentido, a remoção do PS pode ser um fator que contribua na melhoria da qualidade do sêmen congelado de touros. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a remoção do plasma seminal do ejaculado sobre a criopreservação do sêmen de touros. Foi utilizado um ejaculado de 38 touros da raça Nelore entre dois e seis anos obtido através de eletroejaculação. Após a colheita, o ejaculado foi dividido igualmente em três alíquotas: 1) controle (N): diluída em diluidor BotuBov[®] para a concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL e congelada com plasma seminal, (2) centrifugação (C): centrifugada a 600 X g por 10 minutos, descartado o sobrenadante e o pellet resuspendido e congelado após diluição com BotuBov[®] para a concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL e 3) filtração (F): filtrada em SpermFilter[®] e os espermatozoides recuperados e congelados com BotuBov[®] para a concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL. Após a criopreservação as amostras foram avaliadas em relação a cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, estresse oxidativo e fertilidade *in vitro*. A análise estatística dos dados foi efetuada através do pacote SAS 9.2 e foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$. Os grupos onde o PS foi removido apresentaram valores superiores para as variáveis VAP e VSL em relação ao grupo controle. Já as amostras que foram filtradas obtiveram BCF, STR e LIN superiores aos demais grupos estudados. A integridade da membrana plasmática foi inferior quando se removeu o PS, e os grupos C e F apresentaram menor estresse oxidativo em relação ao grupo controle. Já a porcentagem de blastocistos eclodidos foi similar entre o grupo controle e o filtração e superior aos valores obtidos nas amostras centrifugadas. Nesse sentido, a remoção do plasma seminal para congelação de

sêmen de touros por centrifugação diminui a taxa de embriões produzidos, entretanto, a filtragem do sêmen pré-congelação se mostrou como uma alternativa eficiente na congelabilidade e produção de embriões *in vitro* bovinos.

Palavras-chave: sêmen, touro, criopreservação, plasma seminal, centrifugação, filtragem.

1. Introdução

A inseminação artificial (IA) é a primeira geração de avanços da biotecnologia da reprodução animal que gerou grande contribuição para o melhoramento genético. Por meio da IA, um único ejaculado de um touro é utilizado para inseminação de várias fêmeas e este resultado não poderia ter sido possível sem a criopreservação espermática [1]. Busca-se pela criopreservação do sêmen obter taxas de fertilidade semelhantes à do sêmen fresco, utilizando técnicas tradicionais de IA e baixo número de espermatozoides [2].

Apesar do sêmen de touro ser criopreservado há mais de meio século para a IA [3], muitos dos protocolos utilizados ainda são empíricos, com número considerável de espermatozoides que não sobrevivem ao processo de congelação e aqueles que sobrevivem são afetados estrutural ou funcionalmente pós-descongelação [4]. O sucesso da criopreservação não depende apenas da preservação da motilidade dos espermatozoides, mas também da manutenção de sua função metabólica e isto envolve um grande número de fatores [5]. Em geral, muitas das estratégias estudadas para alcançar o sucesso da criopreservação não atuam sobre o espermatozoide em si, mas sobre o meio que o envolve [2].

O fluido que é adicionado aos espermatozoides durante o transporte epididimário e a ejaculação é denominado de plasma seminal (PS) e é produzido pelo epidídimo e glândulas sexuais anexas [6]. Em bovinos, sua função está relacionada com o transporte ao trato genital feminino [7,8], processo de capacitação espermática, reação acrossomal [7,9,10,11], fertilização [11-13] e proteção ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica [11, 14]. Apesar dos vários relatos do efeito benéfico do PS ao espermatozoide, ele também já foi descrito como prejudicial [8] e isto está intimamente relacionado ao tempo de contato entre eles [15]. Na monta

natural, o espermatozoide passa um intervalo de tempo relativamente curto em contato com o PS, mas durante o processamento do sêmen para a criopreservação ele pode passar horas, até mesmo um dia, no PS diluído [6]. Além disso, em touros criados a campo, geralmente a colheita do sêmen é através de eletroejaculação e com esse método obtemos ejaculados com quantidade e qualidade de plasma seminal diferentes dos obtidos por vagina artificial, alterando consideravelmente a relação plasma seminal/espermatozoides no sêmen [16,17].

A composição do PS apresenta uma alta variabilidade individual em touros Nelore [18] o que influencia nas diferentes respostas dos animais frente a criopreservação espermática [19, 20]. Porém, o principal componente do PS (em peso) é proteína, e este componente é considerado como modulador dominante da função dos espermatozoides [21]. Algumas proteínas participam da regulação do efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana do espermatozoide. Este efluxo é este é concentração e tempo dependente e, por isso, uma exposição contínua dos espermatozoides ao PS pode ser lesiva à sua membrana [8,22]. Este fato pode tornar o espermatozoide mais sensível ao processo de criopreservação [15] ou levar a uma capacitação prematura pós-descongelção, afetando o processo de fertilização [23]. Em touros também já foi relatada abundância relativa de proteínas do PS positivamente associadas com baixa fertilidade [24-26].

A técnica que usualmente é utilizada para remoção do PS é a centrifugação, no entanto sua intensidade e tempo podem interferir negativamente na motilidade espermática e integridade da membrana plasmática [27]. Em garanhões, a centrifugação a 600 X g durante 10 minutos proporciona melhor qualidade e menor perda de espermatozoides [28]. Entretanto, em bovinos, nenhum estudo científico determinou a melhor força de centrifugação para remoção do PS e de outros constituintes [29].

Outro método de separação de fácil aplicabilidade é o SpermFilter® (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil), proposto por Alvarenga et al. [30]. Este método consiste em um filtro de membrana hidrofílica sintética com porosidade que permite a passagem do PS, retendo apenas os espermatozoides. Já foi relatado em garanhões que este filtro é tão eficiente quanto a centrifugação na

remoção do PS e tem como vantagem, maior praticidade e menor taxa de perda espermática [27].

A partir do exposto, acredita-se que ejaculados de touros obtidos através de eletroejaculação possam ter sua criopreservação prejudicada por ação deletéria do plasma seminal neste processo e que técnicas para remoção do PS melhorem a qualidade da criopreservação espermática em bovinos. A técnica de centrifugação é a mais utilizada para este fim, porém provoca muitas injúrias celulares e a filtragem surge como uma alternativa para melhores resultados. Pelo fato de, até o momento, não haver qualquer estudo da aplicação da filtragem em touros, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a remoção do plasma seminal do ejaculado pelos métodos de centrifugação e filtragem sobre a criopreservação do sêmen de touros.

2. Material e métodos

Comissão de Ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP, Jaboticabal, em 06 de junho de 2014 sob o Protocolo nº 009713/14.

2.1 Colheita do sêmen

Foram utilizados 38 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre dois e seis anos, pertencentes ao Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizado em Sertãozinho, SP, Brasil. Os touros foram mantidos a pasto, com disponibilidade de água e sal mineral *ad libitum* e foram previamente avaliados quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos, segundo as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ; motilidade espermática: $\geq 60\%$; concentração: 350 milhões de espermatozoides/mL; nº total de espermatozoides no ejaculado: 3 – 5 bilhões; espermatozoides morfolologicamente normais: $\geq 70\%$; defeitos maiores: $\leq 10\%$; defeitos menores: $\leq 20\%$; defeitos individuais maiores: $\leq 5\%$; defeitos individuais menores: $\leq 10\%$) [31]. Foi realizada somente a colheita de um ejaculado por touro

com o eletroejaculador Autojac[®] (Neovet[®], Uberaba, Brasil) no modo manual, totalizando 38 ejaculados.

2.2 Grupos experimentais

Após a colheita, cada ejaculado obtido foi dividido igualmente em três alíquotas para confrontar três técnicas realizadas antes da criopreservação espermática. O grupo controle (grupo N) passou pela criopreservação convencional, sem a separação do PS. A amostra de sêmen foi diluída de modo convencional para a concentração final de 60×10^6 espermatozoides/mL com diluidor BotuBov[®] (BotuPharma[®], Botucatu, Brasil) que contém 7% do crioprotetor glicerol. O grupo centrifugação (grupo C) passou pela separação do PS pelo método da centrifugação. A amostra de sêmen foi diluída na proporção 1:4 com BotuBov[®] sem crioprotetor e centrifugado em centrífuga Baby II[®] (Fanem[®], São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 600 X g, em temperatura ambiente, conforme Dell'aqua Jr. et al. [28]. Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão com BotuBov[®] na mesma concentração do grupo N. O grupo filtragem (grupo F) passou pela separação do PS pelo método da filtragem. Para isso, a terceira alíquota do ejaculado foi diluída na proporção 1:4 com BotuBov[®] sem crioprotetor e em seguida foi submetida à filtração do PS em temperatura ambiente, através do dispositivo SpermFilter[®] (BotuPharma/Pat req. US2010/0099075) e os espermatozoides retidos no filtro foram ressuspensos com BotuBov[®], na mesma concentração do grupo N. Nos grupos C e F foi utilizada uma câmara de Neubauer para verificar a concentração espermática após a passagem pelos processos de centrifugação e filtragem e ajustar a diluição final das amostras de sêmen para a mesma concentração do grupo N. Os três grupos passaram por suas técnicas de forma concomitante, sendo que cada tratamento no seu respectivo grupo foi realizado sempre pelo mesmo técnico.

2.3 Criopreservação

Imediatamente após a colheita e processamento, as amostras de sêmen dos três grupos foram envasadas à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL com a concentração final de 60×10^6 espermatozoides/mL. Para a refrigeração e congelação do sêmen, foi utilizado um sistema programável de criopreservação de sêmen TK[®] 4000 (TK[®], Uberaba, Brasil). A máquina foi programada para realizar a curva de refrigeração de $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$. até atingir 5°C a partir da temperatura ambiente (25°C). Após estabilização a 5°C por quatro horas foi realizada a curva de congelação de $-20^\circ\text{C}/\text{min}$. até atingir -120°C . Quando atingiu esta temperatura, as palhetas foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas até o momento de realização das análises pós-descongelação. Todas as palhetas dos grupos experimentais passaram concomitantemente pelas etapas do processo de criopreservação descritas.

2.4 Avaliações pós-descongelação

Para cada análise realizada pós-descongelação foram utilizadas duas palhetas do mesmo touro de cada grupo para retirar o efeito palheta. A descongelação para todos os grupos foi realizada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As avaliações realizadas pós-descongelação foram: avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e estresse oxidativo por citometria de fluxo e capacidade fecundante do sêmen pelo resultado da produção *in vitro* de embriões (PIVE).

2.4.1 Avaliação computadorizada da cinética espermática

Para avaliação da cinética espermática pelo CASA foram colocados 10 μL de sêmen na câmara de leitura Makler (Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel), previamente aquecida à 38°C , que foi inserida no aparelho Ivos-Ultimate (Versão 14.0, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA). Pelo programa Animal Motility foi realizada a escolha automática e padronizada de cinco campos de leitura e análise. O setup do CASA foi pré-ajustado para análise do

sêmen bovino, conforme a Tabela 1. As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e espermatozoides com velocidade rápida (RAP, %).

2.4.2 Citometria de fluxo

Para as análises por citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BD[®] LSR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW e vermelho 640-nm, 40 mW. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva[™] Software v6.1.

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas Iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), Aglutinina de *Pisum sativum*, associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA; L0770, Sigma) e Hoescht 33342 (H342; 14533, Sigma). Em uma amostra de 200 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foram adicionados 50 μL de H342 (100 $\mu\text{g/mL}$), 50 μL de IP (50 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 μL de FITC-PSA (2 mg/mL). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz para posterior análise, conforme Freitas Dell'aqua et al. [32]. Nesta avaliação quatro subpopulações foram identificadas: MPLAI (membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra), MPLAL (membrana plasmática e acrossomal lesionadas), MPIAI (membrana plasmática e acrossomal íntegras) e MPIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada).

Para avaliação do potencial mitocondrial foram utilizadas as sondas Carbocianina catiônica lipofílica (JC-1; T3168, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e H342. Em uma amostra de 200 μL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL foi adicionado 50 μL de H342 (100 $\mu\text{g/mL}$) e 10 μL de JC-1 (10 $\mu\text{g/mL}$). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz para posterior análise. Quanto à análise do potencial

mitocondrial, foram identificadas três subpopulações: APM (alto potencial mitocondrial), MPM (médio potencial mitocondrial) e BPM (baixo potencial mitocondrial).

Para avaliação do estresse oxidativo através da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) foi utilizada a sonda 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA ; D6883; Sigma), IP e H342. Em 500 µL de sêmen diluído em TALP na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL foi adicionado 0,5 µL da sonda DCFDA (concentração final de 20 µM), 50 µL de IP (50 µg/mL) e 50 µL de H342 (100 µg/mL). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz para posterior análise, conforme Guthrie e Welch [33]. Nesta avaliação encontramos duas subpopulações: CT ROS+ (células totais com ROS positivo) e CI ROS+ (células íntegras com ROS positivo).

2.4.3 Produção *in vitro* de embriões

Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) bovinos foram obtidos por aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro. Foram selecionados COCs com citoplasma homogêneo e compactação das células do *cumulus*, com pelo menos três camadas de células de revestimento. Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10mM de HEPES sódico (Sigma Chemical Company, St.Louis, Mo., USA), 10 mM de HEPES ácido (Sigma), 10% de soro fetal bovino (SFB; Cripion, Andradina, SP, Brasil), 0,20 mM de piruvato sódico e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e uma vez em meio de maturação TCM-199 (Gibco BRL), tamponado com bicarbonato de sódio a 25 mM e suplementado com 10% de SFB (Cripion, Andradina, SP, Brasil), 1,0 µg/mL de FSH (Folltropin; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 50 µg/mL de hCG (Vetercor; Intervet, São Paulo, SP, Brasil), 1,0 µg/mL de estradiol, 0,20 mM de piruvato sódico e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico), conforme Gaspar et al. [34]. Grupos de 20 a 25 COCs foram cultivados em microgotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral estéril durante 24 horas a 38,5°C, em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar.

Após a maturação, os grupos de COCs foram lavados e transferidos para gotas de 100 µL de meio TALP-FIV suplementado com 0,6% de albumina do soro bovino (BSA) livre de ácidos graxos e baixa endotoxina, 10 µg/ml de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina, sob óleo mineral estéril. O sêmen foi descongelado e colocado em um tubo contendo gradiente descontínuo de 45% e 90% de Percoll e foi submetido a uma força centrífuga de 3240 X g por 5 minutos em centrífuga Universal 32R® (Hettich®, Tuttlingen, Alemanha), em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 500 µL de meio TALP-FIV suplementado. Foi realizada nova sedimentação por centrifugação com força de 900 X g por 5 minutos em temperatura ambiente. O volume do sedimento foi ajustado para a concentração final de aproximadamente 5×10^3 espermatozoides por oócito. Sêmen e COCs foram co-incubados por 18 a 22 horas a 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar.

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram desnudados das células do *cumulus* por sucessivas pipetagens e transferidos para placas de cultivo celular com quatro poços contendo meio fluido sintético do oviduto (SOF) suplementado com 2,5% de SFB e 5 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina, para cultivo a 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar. Como foi utilizada a placa de cultivo com quatro poços, foi colocado 500 µl de meio SOF suplementado em cada poço, não sendo necessário realizar troca de meio durante o cultivo. A taxa de clivagem foi avaliada 24 horas depois dos prováveis zigotos serem colocados em cultivo. No 7º dia a partir da fertilização (D7) foi verificada a taxa de blastocistos formados e no 9º dia (D9) foram avaliados somente blastocistos eclodidos. Devido ao alto custo da técnica de PIVE, esta avaliação foi realizada somente em 31 touros escolhidos de forma aleatória.

2.5 Análise estatística

Após a análise e adequação da normalidade da distribuição e homocedasticidade da variância, os dados foram analisados usando o procedimento GLM do Statistical Analysis Software Institute SAS® (SAS Inst., Inc., Cary, NC). A

comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey com as médias corrigidas por quadrados mínimos. O efeito touro foi incluído no modelo como efeito aleatório e o efeito de tratamento como fixo. Foi considerado nível de significância de 5% de probabilidade. As análises de correlação foram realizadas pelo procedimento CORR do Statistical Analysis Software Institute SAS® (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

3. Resultados

Na avaliação da cinética espermática pós-descongelamento não houve diferença nas características MT, MP, VCL, ALH e RAP entre os grupos ($P > 0,05$). No entanto, os valores de VAP e VSL foram superiores ($P < 0,05$) na ausência do PS, independente do método utilizado para sua retirada e as características BCF, STR e LIN apresentaram valores maiores quando a retirada do PS foi realizada pela filtragem (Tabela 2).

Os resultados obtidos na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides nos grupos N, C e F estão apresentados na Tabela 3. Foi observada menor porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras no grupo F ($18,04 \pm 0,70$) em relação aos grupos N ($23,88 \pm 0,70$) e C ($22,45 \pm 0,70$) que não diferiram entre si. Em relação à porcentagem de espermatozoides com as duas membranas lesionadas, o grupo N ($30,61 \pm 0,98$) apresentou menor valor em comparação com os grupos C ($38,46 \pm 0,98$) e F ($39,34 \pm 0,98$) que não diferiram entre si. Além disso, no grupo centrifugação foi observada menor porcentagem de espermatozoides que apresentaram somente lesão na membrana plasmática ($38,49 \pm 0,99$), e o grupo N ($45,19 \pm 0,99$) não diferiu do F ($42,20 \pm 0,99$) nesta subpopulação ($P = 0,094$). Com relação à subpopulação de espermatozoides somente com lesão na membrana acrossomal o grupo C apresentou maior porcentagem ($0,59 \pm 0,06$) em relação ao grupo N ($0,31 \pm 0,06$) e o grupo filtragem ($0,40 \pm 0,06$) não diferiu do centrifugação ($P = 0,091$) e do controle ($P = 0,611$).

Não houve diferença entre os grupos em relação ao potencial mitocondrial pós-descongelamento (Tabela 4). Entretanto, na avaliação do estresse oxidativo, o

grupo N apresentou os maiores valores de células totais e íntegras com ROS positivo quando comparado com os grupos sem o PS, sendo que o método utilizado para a retirada do PS não alterou esta característica (Tabela 5).

As taxas de desenvolvimento com relação à PIVE utilizando o sêmen dos grupos N, C e F estão apresentadas na Tabela 6. A taxa de clivagem dos embriões não diferiu entre os grupos. Em relação ao desenvolvimento até blastocisto e sua eclosão, o grupo F e N obtiveram as maiores taxas e não diferiram entre si. Entretanto, o grupo C que até o estágio de blastocisto apresentou taxa inferior aos grupos N e F, não apresentou diferença do grupo N na avaliação do D9 (taxa de eclosão) ($P > 0,05$).

As correlações entre os parâmetros avaliados pelo CASA, citometria de fluxo e PIVE que apresentaram pelo menos uma diferença entre os grupos controle, centrifugação e filtragem estão apresentadas na Tabela 7. Com relação as taxas de desenvolvimento embrionário avaliadas, o valor de blastocistos no D7 apresentou uma baixa correlação ($r^2 = 0,22$) com MPIAL e o D9 foi positivamente correlacionado com o D7 ($r^2 = 0,75$).

4. Discussão

Várias espécies utilizam a remoção do plasma seminal para a criopreservação do sêmen, como equinos [35], suínos [36], cães [37], entre outras. Pelas características do ejaculado dos bovinos apresentar baixa relação espermatozoides/plasma seminal, a remoção do PS não se apresenta como técnica eletiva no processamento espermático nesta espécie, porém essa relação se altera quando o sêmen é colhido através de eletroejaculação, visto que obtemos maior volume e menor concentração espermática com esse método de colheita [38].

Na espécie bovina, os touros coletados por eletroejaculação apresentam grande variação em relação aos resultados de congelabilidade. Essa diversidade pode ocorrer pela diferença da composição do PS apresentada em virtude do método de colheita do sêmen. Em touros Brahman o plasma seminal recuperado por vagina artificial apresenta 21 proteínas, sendo a maioria de origem epididimal e aquele obtido por eletroejaculação apresenta 26 proteínas, sendo a maioria advinda

das glândulas sexuais anexas [39]. Outros autores relataram 46 proteínas no plasma seminal de touros *Bos indicus* colhidos por eletroejaculação [40]. Além disso, o plasma seminal se comporta de maneira distinta entre indivíduos da mesma espécie, pelo fato da sua composição variar individualmente [18].

Com relação a motilidade espermática que é rotineiramente avaliada na análise do potencial de fertilidade por ser uma expressão da viabilidade e integridade estrutural dos espermatozoides [41], já foi relatado o efeito deletério do PS sobre o espermatozoide bovino, pelo aumento da liberação de L-aminoácido oxidase e redução da motilidade espermática quando a criopreservação foi realizada na presença do PS [19]. No presente estudo a cinética espermática pós-descongelamento apresentou maiores valores de VAP e VSL nos grupos sem o PS (grupos C e F) e os parâmetros BCF, STR e LIN foram superiores com a retirada do PS pela filtragem (grupo F). A própria viscosidade do plasma seminal pode ter contribuído para reduzir os valores de VAP e VSL no grupo controle, visto que o parâmetro VAP representa a velocidade média da trajetória do espermatozoide, dependendo da movimentação lateral da cabeça do espermatozoide e o VSL representa a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto do trajeto do espermatozoide [42]. Em touros, a associação destes parâmetros (VAP, VSL, BCF, STR e LIN) tem alta correlação ($r^2 = 0,97$) com a fertilidade *in vivo* [43] e no presente estudo melhores taxas de desenvolvimento embrionário foram observadas no grupo que apresentou altos valores destes parâmetros (grupo F).

Ramires Neto et al. [27] realizaram estudo semelhante que avaliou o efeito da remoção do PS pelos métodos de filtragem e centrifugação sobre o sêmen refrigerado de garanhões. Semelhante ao presente estudo estes autores não encontraram diferença nas características MT, MP, VCL e RAP da cinética espermática quando foi retirado o PS e foi relatado que a filtragem do sêmen foi eficaz na manutenção da viabilidade do espermatozoide semelhantemente a centrifugação a 600 X g por 10 minutos. Em estudo com sêmen epididimário equino previamente incubado com BotuSêmen® (BotuPharma®, Botucatu, Brasil) ou PS e centrifugado a 600 X g por 10 minutos antes da criopreservação, não foi relatada

diferença nos parâmetros MT, MP e RAP entre os dois grupos na avaliação pós-descongelamento [44].

Diversos trabalhos afirmam que as membranas plasmática e acrossomal são fundamentais para a capacitação espermática e reação acrossomal, processos essenciais à fertilização [45-47] e diversas proteínas do plasma seminal exercem efeito sobre esses processos [7, 9-11]. Quando a colheita do sêmen é realizada por eletroejaculação, maior quantidade de proteínas BSPs (Binder of Sperm), responsáveis pelo efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana, são encontradas no PS [48]. Entretanto, quando o sêmen é diluído com extensor à base de gema de ovo, uma proteção é conferida ao espermatozoide através da associação da fração de lipoproteínas de baixa densidade do diluente com as proteínas BSPs presentes no plasma seminal. Esta associação impede a ligação destas proteínas ao espermatozoide que poderia causar danos à membrana espermática pelo estímulo contínuo do efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana [8]. Aliado a esses mecanismos, o fato do grupo N não ter sofrido qualquer tipo de processamento antes da criopreservação pode ter contribuído para que ele apresentasse menor porcentagem de células com as duas membranas lesionadas (MPAL) e maior porcentagem de células com as duas membranas íntegras (MPAI), sendo que a análise da correlação revela uma moderada correlação negativa entre elas ($r^2 = -0,49$).

Os grupos que passaram pelos métodos de remoção do plasma seminal (grupo C e F) apresentaram valores maiores da subpopulação MPAL (membrana plasmática e acrossomal lesionada), possivelmente pelo próprio processamento das amostras. Na análise da categoria MPLAI, onde indica somente lesão na membrana plasmática, o grupo F apresentou maior valor em relação ao grupo C. O manuseio do filtro para remoção do PS ou a ressuspensão dos espermatozoides neste processo pode ter provocado lesões na membrana plasmática, que é a membrana mais externa do espermatozoide, levando a alta porcentagem do grupo F na categoria MPLAI, e conseqüentemente maior porcentagem deste grupo na subpopulação MPAL também. O grupo C apresentou alta porcentagem de MPAL e menor porcentagem na categoria MPLAI, fato que também é demonstrado pela correlação negativa entre essas duas subpopulações ($r^2 = -0,69$). Possivelmente, o

processo da centrifugação gere danos que comprometem mais a integridade da membrana acrossomal [49], apesar do valor de P na categoria MPIAL não apresentar diferença entre o grupo C e F ($P = 0,091$). A centrifugação deve ser realizada com muito cuidado, pois diversos estudos científicos já relataram que esta técnica causa injúrias aos espermatozoides, reduzindo sua motilidade e fertilidade [50-53]. Além disso, já foi relatado que espermatozoides que não passam pelo processo de centrifugação apresentam maior número de espermatozoides móveis, viáveis e sem reação no acrossoma, em comparação com espermatozoides que são centrifugados [54].

As mitocôndrias são importantes nas células espermáticas pela função fisiológica de realização da fosforilação oxidativa para produção de ATP, que é uma fonte de energia metabólica indispensável para o batimento flagelar e, conseqüentemente, a motilidade dos espermatozoides [47]. Com relação ao potencial mitocondrial, como era esperado, não houve diferença entre os grupos, mostrando que a presença ou ausência do PS não altera este parâmetro. Pasquini et al. [44] também não encontraram diferença neste parâmetro quando o sêmen epidimário de garanhões foi incubado somente com PS ou diluidor BotuSêmen® por 15 minutos e depois centrifugado e criopreservado. Tanghe et al. [55] relataram que a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial avaliada por microscopia de fluorescência foi moderadamente correlacionada com o resultado da fertilização *in vitro* ($0,30 < r^2 < 0,50$).

Hu et al. [56] relataram que o processo de congelação e descongelação do sêmen por si só leva à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) que prejudicam a motilidade espermática, integridade de membrana e o potencial fertilizante. Os espermatozoides e o PS possuem um sistema antioxidante que compreende diferentes substâncias, como a taurina, glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) para prevenir o dano oxidativo. No entanto, esta capacidade antioxidante é limitada nas células espermáticas devido ao componente citoplasmático, que contém os antioxidantes, ser de tamanho reduzido [57]. Entretanto, é a relação entre a produção e a eliminação de ROS que determina o efeito do estresse oxidativo sobre o metabolismo das células espermáticas e a fertilidade e não apenas a presença ou

ausência de antioxidantes no sêmen [14,58]. Alguns trabalhos em bovinos chegam a mostrar a importância das ROS para a realização da capacitação e reação acrossomal [59, 60].

De forma interessante, no presente estudo, o grupo N que foi criopreservado na presença do PS apresentou maior geração de ROS em relação aos grupos que foram criopreservados sem o PS. Quando analisamos as células com ROS positivo de forma mais detalhada foi observado que a diferença entre as células totais com ROS positivo do grupo N em relação ao C e F (22,48 e 25,76 pontos percentuais, respectivamente) foi reduzida para 9,08 e 10,98 pontos percentuais, respectivamente, quando foi avaliado somente as células íntegras, apesar de continuar sendo significativa a 5% de probabilidade. Isso demonstra que a diferença apresentada entre o grupo N e os demais provavelmente ocorra de forma mais expressiva em virtude de maior número de células espermáticas anormais que produzem maior quantidade de ROS [58]. Possivelmente, o processo para remoção do PS nos grupos C e F tenha eliminado parte das células anormais, reduzindo a porcentagem de células com produção de ROS nestes grupos. Sieme et al. [61] sugerem que parte dos espermatozoides que são perdidos no processo de filtração, devido à sua ligação à membrana do filtro, apresentam uma qualidade inferior, permanecendo a dúvida se esses espermatozoides seriam capazes de fecundar se fossem recuperados. Os mesmos autores afirmam que a perda pela filtração, portanto, pode ser menos importante que a alta taxa de perda espermática resultante da centrifugação em que até mesmo células móveis e viáveis ficam no sobrenadante. E os espermatozoides que são capazes de passar através do filtro tem cabeças menores que 2 μ m, sendo, portanto, espermatozoides subdesenvolvidos morfológicamente [62]. Ademais, em bovinos, foi relatado recentemente que o fator touro é responsável por mais de 86% da variação da capacidade antioxidante total no PS, enquanto o fator ejaculado contribui com apenas 2% dessa variação [63], sendo possível a obtenção de um resultado diferente com a mesma análise em outros animais.

Com relação à PIVE, metodologia eleita para avaliação da capacidade fecundante do sêmen, já foi relatado que taxas de concepção estimadas com base em dados combinados de clivagem e formação de blastocistos são muito

semelhantes às verdadeiras taxas de concepção observadas para os mesmos touros após um programa de IA em tempo fixo, sendo possível estimar a fertilidade de touros com base em dados obtidos durante a PIVE [64]. Em estudo realizado para avaliar o efeito do PS na fertilidade *in vitro* em bovinos foi relatado que espermatozoides congelados sem a presença do PS geram mais oócitos fertilizados, maior taxa de clivagem e de embriões no estágio de blastocisto em relação ao sêmen congelado na presença do PS [65]. Da mesma forma, neste trabalho a retirada do PS pelo método de filtração produziu altas taxas de blastocistos e blastocistos eclodidos, entretanto, o grupo N que foi criopreservado com o PS também apresentou boas taxas de desenvolvimento embrionário. Em estudos recentes foi demonstrado que muitas proteínas presentes no PS bovino têm importância nos processos de maturação espermática, proteção, capacitação, reação acrossomal e fertilização [40, 66-68]. Entretanto, parece que os efeitos benéficos destas substâncias não são transferidos para o desenvolvimento embrionário *in vitro* [69].

Uma das hipóteses para as maiores taxas de desenvolvimento embrionário obtidas com o sêmen que passou pela filtração, apesar de ter apresentado maior porcentagem de espermatozoides com lesão de membrana é que o gradiente descontínuo de Percoll realizado antes da fertilização *in vitro* tenha selecionado uma população de células com maior motilidade, membranas plasmática e acrossomal íntegras [70-74] minimizando a diferença apresentada entre os grupos na avaliação pós-descongelamento deste parâmetro. Se um maior número de células anormais geraram maior quantidade de ROS no grupo controle, também é possível que essas células tenham sido reduzidas após passagem pelo gradiente descontínuo de Percoll, minimizando os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo sobre o desenvolvimento embrionário no grupo N.

Quanto ao grupo que passou pela centrifugação (grupo C) uma possível explicação para ele ter apresentado taxas inferiores de desenvolvimento embrionário, apesar dos bons resultados nos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento, porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e produção de ROS, seria uma possível deterioração espermática ao nível do DNA durante seu processamento para retirada do PS. O

DNA espermático não possui qualquer função na realização da fertilização desde que as membranas dos espermatozoides e suas organelas permaneçam funcionalmente intactas, mas é muito importante no desenvolvimento embrionário, quando ocorrem as primeiras divisões e início da expressão do DNA embrionário [75,76]. O DNA espermático danificado mostra características de ligação à zona pelúcida normais e até mesmo taxas de fertilização e clivagem normais, porém quando o embrião atinge fase embrionária a partir de oito células, é iniciada apoptose [77]. No grupo C os resultados indicam este acontecimento pelo fato da taxa de clivagem permanecer semelhante à dos demais grupos e o desenvolvimento embrionário ter sido comprometido, apesar de não ter sido realizada qualquer análise para verificar lesão de DNA.

4.1 Conclusão

A remoção do plasma seminal pelo método da centrifugação reduz a taxa de embriões produzidos. Entretanto, a filtragem do sêmen pré-congelação revelou-se como uma alternativa eficiente na congelabilidade e produção *in vitro* de embriões bovinos. Mais estudos com a remoção do plasma seminal pela filtragem com SpermFilter® devem ser realizados, especialmente para avaliar seu efeito sobre a fertilidade *in vivo* dos animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao auxílio financeiro da FAPESP nº 2012/05555-8 e 2014/02659-2, a CAPES pela bolsa de mestrado e a BotuPharma® pelos produtos.

Referências

- [1] Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sariözkan S, Taşdemir U, et al. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Anim Reprod Sci* 2014;150:77–83.

- [2] Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim* 2010;45:57–66.
- [3] Gürlér H, Calisici O, Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2015;155:99–105.
- [4] Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 2004;80:225–35.
- [5] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:481–92.
- [6] Burroughs CA, Graham JK, Lenz RW, Seidel Jr GE. Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm. *Theriogenology* 2013;79:551–7.
- [7] Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002;53:109–19.
- [8] Bergeron A, Crête M-H, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004;70:708–17.
- [9] Thérien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 1995;52:1372–9.
- [10] Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 1997;57:1080–8.
- [11] Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 2007;98:169–88.

- [12] Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006;75:501–7.
- [13] Souza CEA, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullaryoviductal fluid. *Anim Reprod Sci* 2008;105:72–89.
- [14] Rao TKS, Kumar N, Patel NB, Chauhan I, Chaurasia S. Sperm selection techniques and antioxidant fortification in low grade semen of bulls: Review. *Vet World* 2013;6:579–85.
- [15] Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:217-28.
- [16] Austin JW, Hupp EW, Murphree RL. Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J Dairy Sci* 1961;44:2292-2297.
- [17] Tibary A, Graham EF, Asri A, Boukhliq R, Deyo R. Effect of dialysis or centrifugation on post-thaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. *Theriogenology* 1990; 33:733-739.
- [18] Assumpção TI, Torres Júnior RAA, Sousa MV, Ricart CAO. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005;57:55-61.
- [19] Martinus RD, Molan PC, Shannon P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryo-preservation of bovine spermatozoa. *New Zeal J Agr Res* 1991;34:281-5.
- [20] Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 2004;61:255-66.
- [21] Leahy T, de Graaf SP. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod Domest Anim* 2012;47:207–13.
- [22] Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1999;61:590–8.

- [23] Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* 2000;63:1058–66.
- [24] D'Amours O, Frenette G, Fortier M, Leclerc P, Sullivan R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction* 2010;139:545–56.
- [25] Roncoletta M, Morani E da SC, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 2006;91:77–87.
- [26] Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *J Androl* 2006;27:201–11.
- [27] Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua Jr JA, Papa FO, et al. Effect of removing seminal plasma using a Sperm Filter on the viability of refrigerated stallion semen. *J Equine Vet Sci* 2013;33:40–3.
- [28] Dell'aqua Jr JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 2001;68:324–5.
- [29] Guimarães ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CIU, et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci* 2014;146:103–10.
- [30] Alvarenga MA, Melo CM, Magalhães LCO, Papa FO. A new method to concentrate equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;121:186–7.
- [31] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
- [32] Freitas-Dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2012; 9:941.
- [33] Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 2006; 84:2089-100.

- [34] Gaspar RC, Arnold DR, Corrêa CAP, da Rocha Jr CV, Penteadó JCT, delCollado M, et al. Oxygen tension affects histone remodeling of *in vitro*-produced embryos in a bovine model. *Theriogenology* 2015;83:1408–15.
- [35] Loomis PR. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin N Am-Equine* 2006; 22:663-676.
- [36] Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl* 2004;25:389–96.
- [37] Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, De Kruif A. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;57:1669–81.
- [38] León H, Porrás AA, Galina CS, Navarro-Fierro R. Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. *Theriogenology* 1991;36:349–55.
- [39] Rego JPA, Moura AA, Nouwens AS, McGowan MR, Boe-hansen GB. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Anim Reprod Sci* 2015;160:126–37.
- [40] Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2014;148:1–17.
- [41] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79.
- [42] Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras ReprodAnim* 2008;32:225-232.
- [43] Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998;49:871–9.
- [44] Pasquini DF, Melo CM, Papa FO, Fioratii EG, Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, et al. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions. *Anim Reprod Sci* 2008;107:337–8.
- [45] Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005;64:492–504.
- [46] Amann RP, Hammerstedt RH. *In vitro* evaluation of sperm quality: An opinion. *J Androl* 1993;14:397–06.

- [47] Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *BiochimBiophysActa - Rev Biomembr* 2000;1469:197–235.
- [48] Sarsaifi K, Vejayan J, Wahid Haron A, Yusoff R, Hani H, Rasoli M, et al. Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livest Sci* 2015;172:96–105.
- [49] Risopatrón J, Sánchez R, Sepúlveda N, Peña P, Villagran E, Miska W. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology* 1996;46:65-73.
- [50] Sharma RK, Vemulapalli S, Kohn S, Agarwal A. Effect of Centrifuge Speed, Refrigeration Medium, and Sperm Washing Medium on Cryopreserved Sperm Quality After Thawing. *Syst Biol Reprod Med* 1997;39:33–8.
- [51] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci* 2008;107:268–75.
- [52] Kareskoski AM, Reilas T, Andersson M, Katila T. Motility and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa in Fractionated Stallion Ejaculates after Storage 2006;38:33–8.
- [53] Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim* 2003;38:134–40.
- [54] Len JA, Jenkins JA, Eilts BE, Paccamonti DL, Lyle SK, Hosgood G. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. *Theriogenology* 2010;73:225–31.
- [55] Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V, Maes D, Kruif A de. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. *Reprod Domest Anim* 2002;37:127–32.
- [56] Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, et al. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *J Anim Sci* 2010;88:1657–62.
- [57] Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 2009;58:134–8.

- [58] Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim* 2009;33:183–93.
- [59] O’Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999;52:289–301.
- [60] Gonçalves FS, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingoti GZ. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim* 2010;45:129–35.
- [61] Sieme H, Martinsoon G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, et al. Application of techniques for sperm quality before and after cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2003;38:134-140.
- [62] Alvarenga MA, Papa FO, Carmo MT, Kievitsbosch T, Chaves MMBC, RamiresNeto C. Methods of Concentrating Stallion Semen. *J Equine Vet Sci* 2012;32:424-9.
- [63] Gürler H, Calisici O, Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2015;155:99–105.
- [64] Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Martins Junior A, Papa FO, Rodrigues J, et al. Use of Bayesian inference to correlate *in vitro* embryo production and *in vivo* fertility in zebu bulls. *Vet Med Int* 2011;2011:1-6.
- [65] Kańska L, Ryńska B, Smoraż Z. Effect of seminal plasma on the *in vitro* fertilizability of bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1996;44:23–31.
- [66] Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ. Proteomics of caudaepididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics* 2010;73:2006–20.
- [67] Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: What role do they play? *Am J Reprod Immunol* 2011;66:11–22.
- [68] Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *J Androl* 2012;33:536–51.
- [69] Stinshoff H, Krienke M, Ekhlasi-Hundrieser M, Wilkening S, Hanstedt A, Frese D, et al. Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 2012;78:132–9.

- [70] Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp ÁB, Iváncsics J, Baranyai B, et al. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2002;37:285–90.
- [71] Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, et al. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci* 2006;91:237–47.
- [72] Machado GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009;71:1289–97.
- [73] Zúccari CESN, Carrijo PR, Leite PA, Scaldelai PRR, Rodovalho NCM, Zanenga CA, et al. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Ver Bras Saúde E Produção Anim* 2008;9:358–66.
- [74] Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MAN. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 2010;74:1521–30.
- [75] Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006;65:958–78.
- [76] Bordignon V, Smith LC. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol Reprod* 1999;61:1513–20.
- [77] Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;27:176–88.

Tabelas

Tabela 1 Settings for the Hamilton Thorne (version 14.0) used to assess bull sperm kinematics.

Parameter	Setting
Number of frames (Hz)	30
Minimum contrast (pixels)	60
Minimum cell size (pixels)	6
Straightness (%)	70
Average path velocity cutoff ($\mu\text{m/s}$)	30
Minimum average path velocity ($\mu\text{m/s}$)	40
Straight-line velocity cutoff ($\mu\text{m/s}$)	20
Non-motile head intensity	90
Non-motile head size (pixels)	5
Magnification	1.95 x
Temperature	38 °C

Tabela 2 Média (\pm EPM) das características da cinética espermática avaliadas pelo CASA pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtragem.

	Controle (N)	Centrifugação (C)	Filtragem (F)	Valor de P
MT (%)	54,02 \pm 1,77	53,51 \pm 1,77	50,72 \pm 1,77	0,3716
MP (%)	41,29 \pm 1,40	42,18 \pm 1,40	41,56 \pm 1,40	0,9003
VAP ($\mu\text{m/s}$)	79,65 \pm 1,13 ^b	84,35 \pm 1,13 ^a	86,00 \pm 1,13 ^a	0,0005
VSL ($\mu\text{m/s}$)	66,97 \pm 0,92 ^b	71,06 \pm 0,92 ^a	74,15 \pm 0,92 ^a	<0,0001
VCL ($\mu\text{m/s}$)	133,61 \pm 2,12	139,59 \pm 2,12	138,46 \pm 2,12	0,1135
ALH (μm)	5,70 \pm 0,08	5,79 \pm 0,08	5,56 \pm 0,08	0,1877
BCF (Hz)	32,20 \pm 0,35 ^b	31,96 \pm 0,35 ^b	33,80 \pm 0,35 ^a	0,0008
STR (%)	84,32 \pm 0,47 ^b	84,48 \pm 0,47 ^b	86,16 \pm 0,47 ^a	0,0133
LIN (%)	52,70 \pm 0,50 ^b	53,40 \pm 0,50 ^b	55,54 \pm 0,50 ^a	0,0005
RAP (%)	49,32 \pm 1,80	51,32 \pm 1,80	48,70 \pm 1,80	0,5646

^{a,b} Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$).

Abreviações: MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade do trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimento; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: espermatozoides com velocidade rápida; EPM: erro padrão da média.

Tabela 3 Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtragem.

	Controle (N)	Centrifugação (C)	Filtragem (F)	Valor de P
MPAI (%)	23,88 \pm 0,70 ^a	22,45 \pm 0,70 ^a	18,04 \pm 0,70 ^b	<0,0001
MPAL (%)	30,61 \pm 0,98 ^b	38,46 \pm 0,98 ^a	39,34 \pm 0,98 ^a	<0,0001
MPLAI (%)	45,19 \pm 0,99 ^a	38,49 \pm 0,99 ^b	42,20 \pm 0,99 ^a	<0,0001
MPIAL (%)	0,31 \pm 0,06 ^b	0,59 \pm 0,06 ^a	0,40 \pm 0,06 ^{ab}	0,0099

^{a,b} Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$).

Abreviação: MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegras; MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesionadas; MPLAI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada; EPM: erro padrão da média.

Tabela 4 Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise do potencial mitocondrial pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtragem.

	Controle (N)	Centrifugação (C)	Filtragem (F)	Valor de P
APM (%)	24,28 \pm 1,68	28,22 \pm 1,68	27,38 \pm 1,68	0,2337
MPM (%)	42,39 \pm 1,85	37,73 \pm 1,85	38,91 \pm 1,85	0,1960
BPM (%)	33,32 \pm 2,06	34,03 \pm 2,06	33,70 \pm 2,06	0,9710

Ausência de letras indica ausência de diferença ($P > 0,05$).

Abreviação: APM: alto potencial mitocondrial; MPM: médio potencial mitocondrial; BPM: baixo potencial mitocondrial; EPM: erro padrão da média.

Tabela 5 Média (\pm EPM) das subpopulações encontradas na análise do estresse oxidativo pós-descongelamento do sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtragem.

	Controle (N)	Centrifugação (C)	Filtragem (F)	Valor de P
CT ROS+ (%)	57,39 \pm 2,95 ^a	34,91 \pm 2,95 ^b	31,63 \pm 2,95 ^b	<0,0001
CI ROS+ (%)	81,62 \pm 2,00 ^a	72,54 \pm 2,00 ^b	70,64 \pm 2,00 ^b	0,0005

^{a,b} Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$).

Abreviação: CT ROS+: células totais com ROS positivo; CI ROS+: células íntegras com ROS positivo; EPM: erro padrão da média.

Tabela 6 Taxas de desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões utilizando o sêmen bovino dos grupos controle, centrifugação e filtragem.

Grupos	Oócitos totais	Taxas de desenvolvimento (%; Média \pm EPM)		
		Clivagem*	Blastocisto (D7)*	Blastocisto eclodido (D9)*
Controle (N)	4570	82,11 \pm 0,83	31,30 \pm 1,07 ^a	21,22 \pm 1,05 ^{ab}
Centrifugação (C)	4535	82,05 \pm 0,83	26,55 \pm 1,07 ^b	18,83 \pm 1,05 ^b
Filtragem (F)	4507	84,01 \pm 0,83	32,30 \pm 1,07 ^a	24,00 \pm 1,05 ^a
Valor de P		0,1753	0,0008	0,0042

^{a,b} Letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$).

Abreviação: EPM: erro padrão da média.

* Porcentagem baseada no número de oócitos totais.

Tabela 7 Correlação dos parâmetros avaliados pós-descongelamento no sêmen bovino que apresentaram pelo menos uma diferença entre os grupos controle, centrifugação e filtragem.

	VSL	BCF	STR	LIN	MPLAI	MPAL	MPAI	MPIAL	CTROS	CIROS	D7	D9
VAP	0,90***	-0,01 ns	-0,18 ns	-0,23*	0,01 ns	0,01 ns	-0,02 ns	-0,08 ns	-0,08 ns	-0,02 ns	0,04 ns	0,04 ns
VSL		0,25*	0,25*	0,14 ns	0,16 ns	0,006 ns	-0,20*	-0,15 ns	-0,10 ns	0,03 ns	-0,02 ns	0,08 ns
BCF			0,56***	0,78***	0,20*	-0,12 ns	-0,08 ns	-0,04 ns	-0,02 ns	0,05 ns	-0,04 ns	0,02 ns
STR				0,84***	0,33**	-0,006 ns	-0,38*	-0,17 ns	-0,06 ns	0,10 ns	-0,15 ns	0,05 ns
LIN					0,27**	-0,07 ns	-0,23*	-0,02 ns	-0,19 ns	0,02 ns	-0,01 ns	0,09 ns
MPLAI						-0,69***	-0,28**	-0,17 ns	0,08 ns	0,24*	-0,15 ns	-0,03 ns
MPAL							-0,49***	-0,06 ns	-0,11 ns	-0,17 ns	-0,008 ns	-0,08 ns
MPAI								0,25*	0,05 ns	-0,06 ns	0,18 ns	0,15 ns
MPIAL									-0,07 ns	-0,09 ns	0,22*	0,17 ns
CTROS										0,82***	-0,02 ns	0,03 ns
CIROS											-0,08 ns	0,07 ns
D7												0,75***

Abreviações: VAP: velocidade do trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; BCF: frequência de batimento; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; MPLAI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesionadas; MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegras; MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada; CT ROS: células totais com ROS positivo; CI ROS: células íntegras com ROS positivo; D7: blastocistos no 7º dia pós-fertilização; D9: blastocistos eclodidos no 9º dia pós-fertilização.

(ns) $P \geq 0,05$

* $P < 0,05$

** P < 0,01

*** P < 0,0001