

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO DO SÊMEN BOVINO EM
GRADIENTE EQUIPURE™

CRISTIAN JOSE OCAMPO ORTIZ

Botucatu, SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO DO SÊMEN BOVINO EM
GRADIENTE EQUIPURE™

CRISTIAN JOSE OCAMPO ORTIZ

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana
Ferreira de Souza

Botucatu, SP
– 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ocampo Ortiz, Cristian Jose.

Efeitos da centrifugação do sêmen bovino em gradiente
equipure™ / Cristian Jose Ocampo Ortiz. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Coloides. 2. Criopreservação. 3. Espermatozóides. 4.
Análise do sêmen.

Palavras-chave: Coloide; Criopreservação; Espermatozoides;
Qualidade espermática.

Nome do autor (a): Cristian José Ocampo Ortiz

Título: EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO DO SÊMEN BOVINO EM GRADIENTE EQUIPURE™

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dra. Caroline Scott

Empresa: Autônoma

CPF: 22996313801

E-mail: loraclol@yahoo.com.br

Prof. Dra. Laiza Sartori de Camargo

CPF 34142322869

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

E-mail: laiza.camargo@unesp.br

Profa. Dra. Eunice Oba

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

E-mail: eunice.oba@unesp.br

Dra. Viviana Vallejo Aristizabal

Empresa: Genetics VGA – Professora Universidad de Pamplona

E-mail: Viviana.vallejo@unipamplona.edu.co.

Data da dissertação: 22 de dezembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me abençoado na realização de mais um sonho da minha vida, pois ele é quem faz tudo para o cumprimento das coisas.

Aos meus pais, Martha e Pedro, por acreditar em mim e permanecerem ao meu lado em todo momento, por fazer muitos esforços para eu cumprir esta meta. Aos meus irmãos por serem o objetivo a seguir. Também gostaria de agradecer toda minha família, especialmente minha tia Isabel que é o apoio incondicional para fazer destes sonhos uma realidade.

Também agradecer enormemente a minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pela aceitação no programa para a realização deste sonho, pelo exemplo profissional e ensinamentos.

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

*“Quem já passou por essa vida e não viveu, pode ser
mais, mas sabe menos do que eu...”*

Vinicius de Moraes

RESUMO

OCAMPO, C.J. EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO DO SÊMEN BOVINO EM GRADIENTE EQUIPURE™. Botucatu – SP. 43 p. 2022. Dissertação (MCs), Biotecnologia Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Atualmente o uso de biotécnicas relacionadas ao sêmen bovino tem crescido exponencialmente com o objetivo de suprir a demanda de produtos de origem animal. Com isto, é possível minimizar as perdas econômicas identificando ejaculados de baixa qualidade seminal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do gradiente Equipure™ enquanto a viabilidade e congelabilidade do sêmen de touros para seleção espermática. Para isso, 35 touros foram coletados e o sêmen foi avaliado quanto a cinética espermática, morfologia e integridade de membrana. A seguir, a amostra foi diluída e separada em 2 alíquotas, contendo 1×10^6 espermatozoides cada uma. Uma amostra foi depositada em Equipure™ e a outra mantida *in natura*. As alíquotas foram centrifugadas e posteriormente o pellet dos tubos foram recuperados e reavaliados. Após a análise das variáveis, os 10 touros com maior motilidade foram novamente coletados para congelamento dos espermatozoides. A congelamento foi conduzida após a avaliação e diluição (30×10^6 espermatozoides/mL) em meio comercial. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e reavaliadas. Os resultados mostram que o uso de Equipure diminui a quantidade de células defeituosas após a centrifugação de sêmen fresco e após descongelamento. Com isto podemos inferir que o uso de Equipure™ em amostras de sêmen de touros com pobre qualidade espermática pode aumentar a taxa de células espermáticas morfologicamente normais até valores de referência, porém considerando que a taxa de recuperação espermática descende até valores mínimos quando comparados com sêmen fresco. Estudos que avaliem as características subjetivas da qualidade seminal, o tempo e força da centrifugação, tempo transcorrido entre os procedimentos e o uso de diluentes devem ser reavaliados.

Palavras-chaves: coloide, criopreservação, qualidade espermática, espermatozoides.

ABSTRACT

OCAMPO, C.J. EFFECTS OF CENTRIFUGATION OF BOVINE SEMEN IN EQUIPURE™ GRADIENT. Botucatu – SP. 2022. 43 p. Dissertation (MSc) – Animal Biotechnology – School of the Veterinary Medicine and Animal Science. São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”.

Nowadays, the use of bio-techniques related to bovine semen has grown exponentially in order to meet the demand for products of animal origin. With this, it is possible to minimize economic losses by identifying ejaculates of low seminal quality. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of the Equipure™ gradient on the viability and freezability of bovine semen for sperm selection. For this, 35 bulls were collected and their semen was evaluated for sperm kinetics, morphology and membrane integrity. Next, the sample was diluted and separated into 2 aliquots, each containing 1×10^6 spermatozoa. One sample was deposited in Equipure™ and the other kept in natura. The aliquots were centrifuged and later the pellets from the tubes were recovered and reassessed. After analyzing the variables, the 10 bulls with the highest motility were again collected for sperm freezing. Freezing was carried out after evaluation and dilution (30×10^6 spermatozoa/mL) in commercial medium. Subsequently, the samples were thawed and reassessed. The results show that the use of Equipure decreases the amount of defective cells after centrifugation of fresh semen and after thawing. With this, we can infer that the use of Equipure™ in semen samples from bulls with poor sperm quality can increase the rate of morphologically normal sperm cells to reference values, but considering that the sperm recovery rate drops to minimum values when compared to semen fresh. Studies that assess the subjective characteristics of seminal quality, time and force of centrifugation, time elapsed between procedures and use of diluents should be reassessed.

Keywords: colloid, cryopreservation, sperm quality, spermatozoa.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. HIPÓTESE	11
3. OBJETIVO	11
4. REVISÃO DE LITERATURA	12
4.1. Seleção de touros reprodutores.....	12
4.2. Características espermáticas.....	13
4.3. Avaliação dos espermatozoides e do ejaculado	14
4.4. Refrigeração e criopreservação de sêmen de touros	15
4.5. Seleção de espermatozoides.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2	30
Resumo	32
1. Introdução	33
2. Material e métodos.....	33
2.1. Aspectos éticos.....	33
2.2. Desenho experimental	34
2.3. Avaliação da cinética e concentração espermática	34
2.4. Avaliação da integridade de membrana	35
2.5. Avaliação da morfologia espermática	35
2.6. Gradiente Equipure TM	35
2.7. Análise estatística.....	36
3. Resultados	36
*Teste t; **Teste Mann-Whitney	38
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	40
6. AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Na espécie bovina a seleção de um reprodutor é baseada nas características reprodutivas, no entanto muitos touros não contam com boa qualidade do sêmen (> 30% células anormais com defeitos primários e secundários, vigor diminuído e pobre motilidade em massa e progressiva), embora tenham ótimo genótipo e fenótipo, tornando necessário o uso de ferramentas para aumentar a qualidade do sêmen e a fertilidade destes animais. Para isso, há no mercado algumas tecnologias que aumentam a qualidade do ejaculado mediante a eliminação de bactérias, vírus e espermatozoides anormais, os quais são fontes de espécies reativas de oxigênio que afetam negativamente as amostras seminais (OLIVEIRA, 2020).

Diferentes produtos comerciais foram desenvolvidos, na maioria compostos de partículas de sílica coloidal revestidas com silano, entre os quais destacam-se o EquiPure™ (Nidacon Laboratories AB, Gothenborg, Suécia) (equinos), BoviPure™ (Nidacon Laboratories AB, Gothenborg, Suécia) (bovinos), CapriPure™ (caprinos), Ovipure™ (ovinos) e PureSperm® (Nidacon Laboratories AB, Gothenborg, Suécia) (humanos). A aplicação destes produtos é baseada na seleção espermática por centrifugação no gradiente de densidade (HERNANDEZ et al., 2015). Normalmente os gradientes são usados para separar o meio diluente dos espermatozoides após a descongelação. Isso para aplicá-los em procedimentos de fertilização *in vitro*. Embora sejam amplamente usados para este fim, há poucos estudos sobre sua utilização com o propósito de aumentar a qualidade do ejaculado pré-congelação. Atualmente, o BoviPure™ não é comercializado no Brasil. Então, este estudo tem como objetivo avaliar o gradiente EquiPure™, no aumento da qualidade do ejaculado pré-congelação e pos-descongelação de sêmen bovino.

2. HIPÓTESE

A qualidade de amostras seminais de touros aumenta significativamente após centrifugação com coloide Equipure™.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito da centrifugação com o coloide Equipure™, sobre a qualidade de amostras seminais de touros pré e pós-congelação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Seleção de touros reprodutores

Diferentes variáveis podem determinar a classificação de um touro para indicá-lo como um reprodutor. O primeiro parâmetro observado é o início da puberdade até a plena fertilidade quando adulto. Uma vez púbere, o touro é submetido a avaliações clínicas morfoanatômicas e fisiológicas que possam prever seu potencial de fertilidade (VIANA, 2015). A partir disso, o reprodutor pode ser mantido a campo para a cobertura natural ou então, quando suas características fenotípicas são aquelas consideradas pelo mercado, pode haver o interesse do criador em mantê-lo numa Central para permitir a comercialização do sêmen.

Para definir um bovino macho como púbere, em termos gerais, o ejaculado deve alcançar 50×10^6 de espermatozoides totais, com pelo menos 10% de motilidade (WOLF et al., 1965). Contudo, há diferenças entre indivíduos, uma vez que, touros Nelore, da mesma idade e tamanho testicular, apresentam diferentes parâmetros de motilidade espermática (SILVA et al., 2002).

A ultrassonografia é outra ferramenta que pode auxiliar na identificação de animais sexualmente precoces, já que a avaliação ultrassonográfica dos testículos está relacionada com os níveis de hormônios da reprodução, o que permite reconhecer touros mais precoces (ARAVINDAKSHAN et al., 2000). Esta ferramenta também permite mensurar os testículos de forma direta para o cálculo do volume testicular, o qual está relacionado a produção espermática (CARTEE et al., 1986 e 1989).

O hormônio anti-mülleriano (AMH), fator essencial na diferenciação sexual embrionária, tem como função inibir o crescimento dos ductos de Müller nos embriões XY, impedindo a formação do sistema de túbulos do trato reprodutor feminino (REY et al., 1993; OKAY, 2003). Em humanos, o AMH é um marcador funcional das células Sertoli e níveis indetectáveis deste hormônio e da testosterona sérica indicam ausência de tecido testicular funcional. Já níveis normais de testosterona sérica e AMH indetectável são sugestivos de síndrome do ducto de Müller persistente. Outros distúrbios também alteram os níveis de AMH em homens e podem ser utilizados para identificar alterações relacionadas com a fertilidade (XU et al., 2019). Já em touros, o AMH foi indicado como

marcador da puberdade precoce. O princípio desta avaliação é que este hormônio é secretado até a puberdade, diminuindo seus níveis vagarosamente após esta idade (OKAY, 2003).

Uma vez púbere, é importante que o produtor saiba que avaliação sistematizada do ganho de peso, características associadas à qualidade de carcaça e precocidade sexual, não refletem fielmente um padrão de fertilidade. Para isto, é necessário conduzir um exame andrológico e avaliação sanitária que diagnosticam as principais afecções que afetam a saúde reprodutiva e por tanto a fertilidade (FRENEAU et al., 2000).

O exame andrológico inclui a avaliação do comportamento e características fenotípicas focadas na atitude reprodutiva, como temperamento, libido, visão, capacidade respiratória, peso, aprumos, entre outros. A avaliação reprodutiva termina com o exame do ejaculado, o qual evidencia características relacionadas com fertilidade como motilidade e morfologia espermática. Baseado nos achados do exame andrológico se define o destino a ser dado ao touro. Após o exame andrológico um touro pode ser classificado como fértil, subfértil ou infértil, os quais envolvem a possibilidade das alterações serem herdáveis ou não para a progênie, comprometendo a qualidade do rebanho (FRENEAU et al., 2000; HOLROYD et al., 2002). Outra classificação é a descrita por CBRA (2013) que define os touros como aptos, questionáveis e inaptos segundo a capacidade de reversão das alterações apresentadas durante a avaliação.

Geralmente os critérios de seleção dos programas de melhoramento genético são mensuráveis, possuem alta repetibilidade e herdabilidade a fim de identificar indivíduos com potencial de herdar da progênie características reprodutivas tais como precocidade sexual, habilidade materna, facilidade de parto entre outras (VIANNA et al., 2015).

4.2. Características espermáticas

Os espermatozoides são células haploides, desprovidas de capacidade reparadora e classificadas como células terminais (PURDY, 2006), cuja estrutura tem a função de garantir a liberação do material genético condensado no núcleo para o interior do oócito, onde posterior, à fusão dos pró-núcleos masculino e

feminino, forma-se o zigoto (AURCHI, 2005; SUTOVSKY e MANANDHAR, 2006).

Morfológicamente, o espermatozoide é dividido em duas regiões, cabeça e cauda ou flagelo. Na cabeça encontra-se o núcleo, o acrossomo, pequena quantidade de citoplasma e estruturas citoesqueléticas (TOSHIMORI, 2009). No núcleo se encontra o DNA recoberto por membrana nuclear que o protege para garantir a integridade. O acrossomo é repleto de enzimas hidrolíticas que ajudam na reação acrossomal, que permite a penetração do espermatozoide no ovócito (PESCH e BERGMANN., 2006). Na região da peça intermediária encontra-se as mitocôndrias e o citoesqueleto, estas porções são formadas pelo axonema que são extensos microtúbulos responsáveis pela movimentação espermática. A cauda, região responsável pela cinética da célula, é a porção mais longa do espermatozoide, e é dividida em 4 regiões, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. (EDDY, 2006; SINGH, 2006; MACIAS, 2010).

Uma membrana plasmática flexível recobre os espermatozoides, e garante uma troca estável entre os meios extra e intracelulares, mantendo um gradiente químico entre íons e outros elementos. Além disso, a membrana protege o espermatozoide durante sua permanência no trato reprodutor feminino (BRANDÃO, 2008; AMANN e GRAHAM, 2010).

A membrana plasmática é composta por lipídios, encarregados da integridade estrutural, proteínas integrais, periféricas, glicoproteínas de superfície, responsáveis por processos dinâmicos, e carboidratos; responsáveis pelo caráter hidrofóbico da membrana (ALMEIDA, 2006). O teor de colesterol, principal molécula encarregada de estabilizar a membrana, tem uma relação direta com a resistência ao choque frio, uma vez que a mobilização do colesterol da membrana leva a desestabilização da sua integridade (GONZALES, 2004; POULOS et al., 1973; WALES e WHITE., 1959). Desta maneira, o sucesso da fecundação depende de vários fatores, incluindo membranas íntegras, organelas funcionais e genoma haploide intacto (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

4.3. Avaliação dos espermatozoides e do ejaculado

O potencial fertilizante das células espermáticas pode ser avaliado *in vivo* ou *in vitro*, contudo a avaliação *in vivo* inclui testes onerosos, com um elevado número de fêmeas para um teste de progênie. A avaliação *in vitro*, embora não

possa substituir totalmente a *in vivo*, é possível inferir o potencial fertilizante de uma amostra, baseado em algumas características das células espermáticas. Contudo, não há uma avaliação *in vitro* precisa e que possa assegurar a capacidade fertilizante das células espermáticas (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Desta maneira, o exame andrológico básico não pode prever as variações nas taxas de fertilidade de touros com amostras seminais aparentemente normais, desde que isso requer uma avaliação molecular, celular e do animal como um todo (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008).

A cinética espermática é uma das características usadas para refletir a habilidade fertilizante de uma amostra seminal, e para verificar esta característica é usado um sistema computacional conectado a um microscópio (*computer-assisted sperm analysis* - CASA). Os parâmetros cinéticos incluem motilidade total, motilidade progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos flagelares (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) (KATHIRAVAN et al., 2011).

A motilidade espermática é um dos parâmetros seminais mais influentes na decisão final da avaliação reprodutiva do touro e definirá o grau de fertilidade junto com a morfologia, já que uma alta percentagem de células móveis será capaz de atravessar o trato reprodutivo todo, incluindo o local de fertilização -o oviduto- onde os espermatozoides precisaram de uma motilidade hiperativada para fecundar o ovócito (HO et al., 2002).

A morfologia espermática é um procedimento que pode ser feito em campo com ajuda de um microscópio, no entanto, o uso do CASA tem substituído sua utilização, devido à objetividade e rapidez. Os resultados da avaliação da morfologia espermática podem ser divididos em defeitos primários e secundários segundo a origem anatômica da malformação; esta classificação também pode ser utilizada para considerar uma amostra com aptidão para reproduzir-se ou não (HAFEZ, 2003).

4.4. Refrigeração e criopreservação de sêmen de touros

Para preservar uma amostra seminal, esta pode ser feita mediante refrigeração e criopreservação (BARBAS e MASCARENHAS, 2009). No processo de criopreservação, o êxito depende da qualidade do sêmen, diluente,

crioprotetor, protocolo de congelamento, armazenamento, protocolo de descongelamento e interação de todos os componentes mencionados anteriormente (DIAZ e CASTAÑO, 2018), porém o dano causado no processo de congelamento celular ainda é prejudicial para a viabilidade espermática. No entanto, mesmo sendo o método de preservação mais utilizado, a integridade e funcionalidade das células espermáticas são drasticamente afetadas e, portanto, sua viabilidade. Devido a isto, a preservação de sêmen em um estado líquido vem se estudando cada vez mais. Esta refrigeração evita que a célula espermática seja danificada, melhorando a viabilidade e otimizando o processo de IA e seus resultados (CRESPILO et al., 2014).

4.5. Seleção de espermatozoides

Na pesquisa, medicina ou indústria, o isolamento ou purificação de populações celulares são necessárias como uma fase de preparação ou como objetivo final dos procedimentos (ORFAO e RUIZ-ARGUELLES, 1996), sendo necessário em muitos laboratórios. A densidade é uma propriedade física com menos variação célula a célula em um mesmo tipo celular (NOROUZI et al., 2017) e pode ser usada para a seleção de células.

Na andrologia, a densidade celular é utilizada para sexagem de espermatozoides, separando as células que contêm os cromossomos XX dos XY. Quando se busca aumentar a qualidade espermática a morfologia é uma das propriedades físicas mais utilizadas, a qual está relacionada à função celular (BEECH et al., 2012). Porém, existe uma variação dos meios utilizados de acordo com o tipo celular.

A seleção de amostras pode envolver métodos de isolamento, classificação e separação, utilizando micropartículas ou *beads* magnéticas, contudo, alguns procedimentos podem ser onerosos, demorados e requererem grandes volumes de amostra e reagentes (DALILI et al., 2019). Já a separação por gradiente de centrifugação, é uma das técnicas mais simples, menos onerosas, pode ser feita com um volume menor de amostra e classifica as células por tamanho e/ou densidade celular (HARWOOD, 1974).

Os gradientes de densidade utilizados para selecionar células espermática são utilizados para eliminar células imaturas, senescentes, morfologicamente anormais e portadoras de DNA danificado, selecionando

espermatozoides viáveis (MORRELL et al., 2008; JAYARAMAN et al., 2012). Também podem ser utilizados para separar as células do meio, seja o plasma seminal ou meio diluente (MORRELL et al., 2008; D'AMOURS et al., 2018).

Métodos de seleção espermática são usados nas diferentes biotécnicas da reprodução animal (GARCIA-HERREROS e LEAL, 2014), principalmente nas espécies de interesse zootécnico, visando selecionar e concentrar o maior número de espermatozoides normais e móveis para aplicação da fertilização *in vitro*. Contudo, podem ser aplicados para a separação de células de maior qualidade oriundas de ejaculados com características espermáticas parcialmente comprometidas, como baixa motilidade e células com defeitos.

Métodos de separação espermática devem incluir como características a rapidez na separação, facilidade, melhor custo-benefício, isolar o maior número de espermatozoides móveis, não causar danos às células espermáticas, eliminar espermatozoides mortos e outras células (leucócitos e bactérias), eliminar substâncias tóxicas e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculado (HENKEL e SCHILL, 2003).

Diferentes métodos já foram estudados para a seleção de espermatozoides, entre os quais destacam-se *swim-up*, Percoll® e OptiPrep® referenciar. Atualmente alguns gradientes em camada única foram elaborados para diferentes espécies, como EquiPure™ (equinos), BoviPure™ (bovinos), CapriPure® (caprinos), Ovipure® (ovinos) e PureSperm® (humanos), Ficoll®, os quais são compostos de coloide composto por partículas de sílica recobertas com silane.

O *swim up* é um método simples e econômico, porém menos eficaz baseado na movimentação dos espermatozoides em um determinado meio (ARIAS et al, 2017). Na espécie bovina é utilizado como método alternativo para isolar espermatozoides íntegros, permitindo que os espermatozoides móveis migrem até a parte superior do tubo (HOPPER, 2014). Este método diminui significativamente a porcentagem de espermatozoides com cromatina descondensada e a quantidade de espermatozoides mortos, resíduos celulares e leucócitos, os quais são importantes fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS), prejudiciais aos espermatozoides de qualidade (HENKEL et al., 1994; FORD, 1990).

O gradiente de Percoll® é considerado o método de separação de espermatozoides mais utilizado. Consiste em depositar o sêmen sobre um gradiente descontínuo (duas camadas de diferentes densidades, geralmente 45% e 90%) e posterior centrifugação. A separação usando o gradiente de densidade de Percoll® possibilita a recuperação dos espermatozoides com maior porcentagem de integridade de membrana (GARCIA-HERREROS e LEAL, 2014). Apesar disso, o Percoll® é considerado tóxico para as células e, por décadas, seu uso não foi permitido para separação de espermatozoides em técnicas de reprodução assistida em humanos (CHEN e BONGSO, 1999). Ademais, há diferenças na composição dos lotes de Percoll®, de forma que essa variação pode afetar as taxas de desenvolvimento embrionário (Mendes et al., 2003).

O gradiente Ficoll é um polissacarídeo usado em centrifugação zonal para a separação de biopartículas (LAVRENKO et al., 1987). Em células espermáticas de mamíferos tem se utilizado com resultados satisfatórios no momento de obter amostras seminais de ótima qualidade (MOTHE et al., 2018).

O gradiente iodixanol, comercialmente conhecido como OptiPrep é considerado um meio de gradiente com densidade superior em comparação com outros gradientes como o Percoll (HARRISSON, 1997). Também tem sido utilizado como crioprotetor do sêmen bovino com resultados positivos relacionados com a alteração da formação dos cristais de gelo (SARAGUSTY et al., 2009). Este meio tem sido utilizado para separar espermatozoides sem alterações de viabilidade e integridade do acrosoma com resultados similares aos do Percoll (RESENDE et al., 2009).

A seleção espermática por centrifugação em camada única surgiu como um método alternativo a outras preparações com compostos coloidais, já que são observados diferentes benefícios, como as formulações específicas para cada espécie; homogeneidade entre os lotes e capacidade de processamento completo dos ejaculados, facilitando o uso na preparação do sêmen comercial (SJUNNESSON et al., 2013).

O Equipure™ foi criado para a seleção espermática em equinos, embora não seja observada diferença em sua composição, quando comparada aos diferentes produtos da mesma empresa, com o mesmo objetivo e indicado para outras espécies (BERGSTEIN et al., 2016). Na espécie equina o Equipure™

aumenta a motilidade total, motilidade progressiva e reduz os defeitos espermáticos de amostras de sêmen fresco (VELEZ et al., 2017) e no descongelado aumenta as características cinéticas espermáticas (ORTIZ et al., 2012).

Nos bovinos, o Equipure™ apresenta resultados contraditórios. Em um estudo foi associado com a redução da motilidade, viabilidade e taxa de fertilização espermática, quando comparado ao Percoll®, para aplicação das células na fertilização *in vitro* em bovinos (ROMO et al., 2005). Apesar disso, a separação dos espermatozoides bovinos com Percoll® reduziu a recuperação de espermatozoides após a centrifugação, mas resultou em maior motilidade, quando comparados ao Equipure™ (60 *versus* 39%), respectivamente. Neste estudo, não houve diferença estatística para a viabilidade celular nos dois métodos avaliados (PRYOR et al., 2005).

O BoviPure™ e o Percoll® foram considerados protocolos de separação de espermatozoides adequados para fornecer células viáveis para fertilização *in vitro*. O processamento dos espermatozoides com BoviPure™ e Percoll® mantiveram a motilidade espermática (66,7 *versus* 64,2%), concentração ($25,5 \times 10^6$ *versus* $27,7 \times 10^6$ espermatozoides/mL), integridade de membrana (70,9 *versus* 68,8%) e do acrossomo (74,2 *versus* 67,5%), respectivamente (SAMARDZIJA et al., 2005).

5. REFERÊNCIAS¹

ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

AMANN, R.; GRAHAM, J. **Spermatozoa function**. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine reproduction. Oklahoma: John Wiley & Sons, 2010.

ARAVINDAKSHAN J. P.; HONARAMOOZ A.; BARTLEWSKI P. M.; BEARD A. P.; PIERSON R. A.; RAWLIIS N. C. Pattern of gonadotropin secretion and

¹ Referencias organizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.

ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 339-354, 2000.

ARIAS, M. E.; ANDARA, K.; BRIONES, E.; FELMER, R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll® and BoviPure®): Effect on sperm quality, function and gene expression. **Reproductive biology**, v.17, n.2, p.126-132, 2017.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.

BATISTA, A. M. **Influência das técnicas de seleção Swim-up e gradiente de densidade (Percoll® e CapriPure®) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino**. Tese (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, p.53. 2009.

BEECH, J.; HOLM, S.; ADOLFSSON, K.; TEGENFELDT, J. Sorting cells by size, shape and deformability. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 6, p. 1048-105, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2lc21083e>.

BERGSTEIN, T. G.; BICUDO, L. C.; RODELLO, L.; WEISS, R. R.; BICUDO, S.D. Kinematic and spermatocytic recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, p.1539-1547, 2016.

BHAGAT, A. A. S.; BOW, H.; HOU, H. W.; TAN, S. J.; HAN, J.; LIM, C. T. Microfluidics for cell separation. **Medical & biological engineering & computing**, v. 48, n. 10, p. 999-1014, 2010.

BRADECAMP, E. A. Centrifugation of Semen. **Equine Reproductive Procedures**, p. 561–562, 2021. doi:10.1002/9781119556015.ch15

CARTEE R. E.; GRAY B. W.; POWE T. A.; HUDSON R. S.; WHITESIDES J. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. **Theriogenology**, v. 31, p. 1149-1158, 1989.

CARTEE R. E.; POWE T. A.; GRAY B. W.; HUDSON R. S., KUHLEERS D. L. Ultrasonographic evaluation of normal boar testicles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 2543-2548, 1986.

CASTANO, F. A.; GUIMARAES, J. D.; DA COSTA, E. P.; CARDONA, J. A.; GOMEZ, V. H.; RAMIREZ, C. J. **Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración**. Revista de Medicina Veterinária, v. 1, n. 36, p. 121-133, 2018. Doi: <https://doi.org/10.19052/mv.5178>

CHEN, M. J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, v.14, p.759–764, 1999.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA. p. 104, 2013.

CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; SÁ FILHO, M. F.; MAZIERO, R. R.; PAPA, F. O. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal reproduction science**, v. 146, n. 3-4, p. 126-133, 2014.

D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; BOURASSA, S.; CALVO, E.; BLONDIN, P.; SULLIVAN, R. Proteomic markers of functional sperm population in bovines:

comparison of low-and high-density spermatozoa following cryopreservation. **Journal of proteome research**, v. 17, p. 1, p. 177-188, 2018.

DA FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; DE ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, p. 79, 1992.

DALILI, A.; SAMIEI, E.; HOORFAR, M. A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: Microfluidic approaches. **Analyst**, v. 144, n. 1, p. 87-113, 2019.

DE JONGE, CHRISTOPHER J.; BARRATT, CHRISTOPHER (Ed.). **The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration**. Cambridge University Press, 2006.

DIAZ DUQUE, N. A.; LÓPEZ, P. A. **Protocolos de crio preservación de semen bovino**, 2018.

DÍAZ, H.; ESPINOZA, J.; HUANCA, W.; LOPEZ-TORRES, B.; RODRÍGUEZ, J. Características bioquímicas del plasma seminal fresco y congelado/descongelado de alpaca (Vicugna pacos). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 26, p. 1, p. 43-48, 2015.

EDDY, E. M. The spermatozoon. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**, v. 1, p. 3-54, 2006.

FONSECA V. O.; CRUDELI G. A.; COSTA.; SILVA E. V. Aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore. Efeito das diferentes estações do ano sobre as características seminais circunferência escrotal e fertilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 7-15, 1992.

FORD, W. The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: implications of IVF. In: **Clinical IVF forum: current views in assisted reproduction**. UK: Manchester University Press. p. 123–39, 1990.

FRENEAU G. E.; PUOLI J. R.; BORJA A. L. R. Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 37, 2000.

GARCÍA-HERREROS M.; LEAL C. L. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 60, n. 6, p. 338-347, 2014. Doi: 10.3109/19396368.2014.938279.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide bovino**. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproductive cycles. **Reproduction in farm animals**, John Wiley & Sons, p.55-67, 2013.

HARRISON, K. Iodixanol as a density gradient medium for the isolation of motile spermatozoa. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 14, n. 7, p. 385-387, 1997.

HARWOOD, R. Cell separation by gradient centrifugation. **International review of cytology**, v. 38, p. 369-403, 1974.

HENKEL R. R.; FRANKEN D. R.; LOMBARD C. J.; SCHILL W. B. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 11, n. 8, p. 395-400, 1994.

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

HERNÁNDEZ PICHARDO, J. E.; RODRÍGUEZ SUÁSTEGUI, J. L.; SÁNCHEZ MARTÍNEZ, C., RAMÍREZ FRANCO, R. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. **Revista de Salud Animal**, v. 37, n. 1, p. 15-20, 2015.

HO, H. C.; GRANISH, K. A. SUAREZ, S. S. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP. **Developmental biology**, v. 250, n. 1, p. 208-217, 2002.

HOLROYD R. G.; DOOGAN V. J.; DE FAVERI J. D.; FORDYCE G.; MCGOWAN M. R.; BERTRAM J. D.; VANKAN D. M.; FITZPATRICK L. A.; JAYAWARDHANA G. A.; MILLER R. G. Bull selection and use in northern Australia 4: calf output and predictors of fertility of bulls in multiple sire herds. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 67-79, 2002.

HOPPER, R. M. Breeding soundness examination in the bull: concepts and historical perspective. **Bovine reproduction**, p. 58-63, 2014.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between Sperm Response to Glycosaminoglycans in vitro and Non-return Rates of Swedish Dairy AI Bulls. **Reproduction in domestic animals**, v. 35, n. 5, p. 207-212, 2000.

JAYARAMAN, V.; UPADHYA, D.; NARAYAN, P.K.; ADIGA, S.K. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 29, n. 6, p. 557-563, 2012.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 368-373, 2008.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system—a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165-172, 2011.

LAVRENKO, P. N.; MIKRIUKOVA, O. I.; OKATOVA, O. V. On the separation ability of various Ficoll gradient solutions in zonal centrifugation. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 287-297, 1987.

MENDES, J. O. B.; BURNS, P. D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL, G. E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, p. 331–340, 2003.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.

MORRELL, J. M.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: A preliminary study. **Animal Reproduction**, v. 5, n. 3-4, p. 121-126, 2008.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. **Veterinary medicine international**. v. 2011, 2011.

MORTIMER, D. **Practical Laboratory Andrology**. Oxford: Oxford University Press. 393p, 1994.

MOTHE, G. B.; SCOTT, C.; SICHERLE, C. C.; DE FREITAS GUAITOLINI, C. R.; DELL'AQUA, C. D. P. F.; MALOSSI, C. D.; ... & DE SOUZA, F. F. Sperm sexing with density gradient centrifugation in dogs. **Animal reproduction science**, v. 199, p. 84-92, 2018.

OKAY, T. S. Hormônio anti-mülleriano: importância na prática pediátrica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 1-23, 2003.

OLIVEIRA, T. M. D. A. Fotoimunoinativação do alfaherpesvírus bovino 1 em sêmen. **Repositório da Universidade Federal de Goiás**, 2020.

OMS. **Manual de laboratório da OMS para a análise de sêmen humano e interação espermatozoide - muco cervical**, 4^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.

ORFAO, A.; RUIZ-ARGÜELLES, A. General concepts about cell sorting techniques. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 5–9. doi:10.1016/0009-9120(95)02017-,1996.

ORTIZ, I.; DORADO, J.; ACHA, D.; RAMIREZ, L.; URBANO, M.; GALVEZ, M. J.; & HIDALGO, M. 72 Effect of single-layer centrifugation with Equipure™ on motility kinematics of frozen–thawed donkey sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 183-183, 2012.

PAPA, P. M.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; DELLAQUA, J. A.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PAPA, F. O. Effect of density gradient on sperm parameters on stallion frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 505, 2012.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597-612, 2006.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S.l.] v. 46, p. 541-549, 1973.

POULOS, H. G. Analysis of piles in soil undergoing lateral movement. **Journal of the soil mechanics and foundations division**, v. 99, n. 5, p. 391-406, 1973.

PRYOR J., ROMO S.; VARNER D.D.; HINRICHS K.; LOONEY C.R. 252 comparison of two sperm separation products for use in bovine IVF. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p. 276-276, 2005.

<https://doi.org/10.1071/RDv17n2Ab252>

RESENDE, M. V.; BEZERRA, M. B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A. O.; LUCIO, A. C.; DE LIMA, V. F. Separation of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 581-587, 2009.

REY, R. A.; LORDEREAU-RICHARD, L.; CAREL, J. C.; BARBET, P.; CATE, R. L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J. L.; JOSSO, N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, p. 1220-1226, 1993.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL p. 138-146.

ROMO, S.; PRYOR, J.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K.; LOONEY, C. R. 253 Comparison of three different IVF protocols for bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 277-277, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1071/RDv17n2Ab253>

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; ... & KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal reproduction science**, v. 91 n. 3-4, p. 237-247, 2006.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1425-1432, 2009.

SILVA, A. E. D. F.; UNANIAN, M. M.; CORDEIRO, C. M. T.; FREITAS, A. R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade de sêmen em

touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1157-1165, 2002.

SJUNNESSON, Y.C.B.; MORRELL, J.M.; GONZÁLEZ, R. Single layer centrifugation-selected boar spermatozoa are capable of fertilization in vitro. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-20>

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. **The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration**, p. 1-30. 2006.

TOSHIMORI, K. Post-testicular modifications and maturation events occurring in the sperm. In **Dynamics of the Mammalian Sperm Head** Springer, Berlin, Heidelberg. p. 27-29, 2009.

TRENTALANCE, G. M.; BEORLEGUI, N. B. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. **Andrologia**, v. 34, n. 6, p. 397-403, 2002.

VELÁSQUEZ PENAGOS, J. G. Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*): Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida, 2004.

VELEZ, A. Comparación del efecto de la centrifugación con coloide equipure® y del protocolo de refrigeración sobre la viabilidad de la célula espermática en caballo criollo colombiano utilizando dos medios diluyentes Kenney®, Botuspecial®, 2017.

WALES, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. **Journal of Endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 211-220, 1959.

WOLF, F.R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. **Journal of Animal Science**, v. 224, p. 761-765, 1965.

XU, H. Y.; ZHANG, H. X.; XIAO; Z.; QIAO, J.; LI, R. Regulation of anti-Müllerian hormone (AMH) in males and the associations of serum AMH with the disorders of male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 109-114, 2019. doi: 10.4103/aja.aja_83_18. PMID: 30381580; PMCID: PMC6413543.

YANAGIMACH, R. Mammalian fertilization. In: **Knobil E, Neill JD, Eds. The Physiology of Reproduction**, 2nd Ed., New York, Raven Press, p.189-317. 1994.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO DO SÊMEN BOVINO EM GRADIENTE EQUIPURE

Effects of centrifugation of bovine semen in Equipure™ gradient

Ocampo, C.J.^a, Carneiro, G.^a, Codognoto, V.^a, Carvalho, M.G.^a, Cardoso, L.^a,
Crespilho, A.^a, Hayek, Y.E.^a, Ocampo, P.E.^b, de Souza, F.F.^{a*}.

^a Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ,
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

^b Departamento de medicina veterinária, Facultad de ciencias agrarias,
Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.

*Corresponding author: Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n. Bairro:
Unesp Campus de Botucatu – Departamento de Cirurgia e Anestesiologia
Veterinária- FMVZ - UNESP - Botucatu, SP, Brasil. Tel: +55 14 99754-1447.

E-mail address: fabiana.f.souza@unesp.br (de Souza, F.F.)

Resumo

Atualmente o uso de biotécnicas relacionadas ao sêmen bovino tem crescido exponencialmente com o objetivo de suprir a demanda de produtos de origem animal. Com isto, é possível minimizar as perdas econômicas identificando ejaculados de baixa qualidade seminal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do gradiente Equipure™ enquanto a viabilidade e congelabilidade do sêmen de touros para seleção espermática. Para isso, 35 touros foram coletados e o sêmen foi avaliado quanto a cinética espermática, morfologia e integridade de membrana. A seguir, a amostra foi diluída e separada em 2 alíquotas, contendo 1×10^6 espermatozoides cada uma. Uma amostra foi depositada em Equipure™ e a outra mantida *in natura*. As alíquotas foram centrifugadas e posteriormente o pellet dos tubos foram recuperados e reavaliados. Após a análise das variáveis, os 10 touros com maior motilidade foram novamente coletados para congelação dos espermatozoides. A congelação foi conduzida após a avaliação e diluição (30×10^6 espermatozoides/mL) em meio comercial. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e reavaliadas. Os resultados mostram que o uso de Equipure diminui a quantidade de células defeituosas após a centrifugação de sêmen fresco e após descongelação. Com isto podemos inferir que o uso de Equipure™ em amostras de sêmen de touros com pobre qualidade espermática pode aumentar a taxa de células espermáticas morfologicamente normais até valores de referência, porém considerando que a taxa de recuperação espermática descende até valores mínimos quando comparados com sêmen fresco. Estudos que avaliem as características subjetivas da qualidade seminal, o tempo e força da centrifugação, tempo transcorrido entre os procedimentos e o uso de diluentes devem ser reavaliados.

Palavras-chave: coloide, criopreservação, qualidade espermática, espermatozoides

1. Introdução

Na espécie bovina a seleção de um reprodutor é baseada nas características reprodutivas, no entanto vários são os touros que não contam com boa qualidade do sêmen (motilidade diminuída, >30% defeitos e pobre vigor da amostra seminal), embora tenham ótimo fenotípico, tornando necessário o uso de ferramentas para aumentar a qualidade do sêmen e a fertilidade destes animais. Para isso, há no mercado algumas tecnologias que aumentam a qualidade do ejaculado mediante a eliminação de bactérias, vírus e espermatozoides anormais, os quais são fontes de espécies reativas de oxigênio que afetam negativamente as amostras seminais [1].

Diferentes produtos comerciais foram desenvolvidos, na maioria compostos de partículas de sílica coloidal revestidas com silano, entre os quais destacam-se o EquiPure™ (equinos), BoviPure™ (bovinos), CapriPure™ (caprinos), Ovipure™ (ovinos) e PureSperm® (humanos). A aplicação destes produtos é baseada na separação dos espermatozoides por centrifugação no gradiente de densidade [2]. Normalmente os gradientes são usados para retirada do meio diluente de amostras de espermatozoides após a descongelação, para aplicação na fertilização *in vitro*. Embora sejam amplamente usados para este fim, há poucos estudos sobre sua utilização com o propósito de aumentar a qualidade do ejaculado pré-congelamento. Atualmente, o BoviPure™ não é comercializado no Brasil. Então, este estudo objetivou avaliar o gradiente EquiPure™, que possui a mesma composição que BoviPure™ no aumento da qualidade das células espermáticas pré-congelamento do sêmen bovino mediante avaliação morfológica, características cinemáticas e integridade de membrana.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos

Para o estudo foram seguidas as recomendações do Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 0243/2021.

2.2. Desenho experimental

Para este estudo foram utilizados ejaculados de 35 touros da Central Bela Vista, do grupo CVR, localizada no município de Botucatu, São Paulo, Brasil. Os bovinos selecionados pertenciam à área de quarentena e foram escolhidos aleatoriamente. Os ejaculados foram colhidos por vagina artificial utilizando uma vaca como manequim. Após a colheita, as amostras foram mantidas em banho seco a 37 °C. A avaliação espermática de cada amostra para cada procedimento do experimento foi feita em: 1. Sêmen fresco 2. Sêmen após gradiente Equipure e 3. Sêmen após descongelação. A avaliação da qualidade espermática foi baseada na cinética espermática e concentração em sistema computadorizado (iSperm™, Aidmics Biotechnology Co., Genepro, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), morfologia e integridade de membrana mediante microscopia ótica e coloração eosina-nigrosina. Após a avaliação do sêmen fresco, as amostras foram diluídas em meio comercial (BotuBOV®, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) e divididas em 2 alíquotas. A seguir, uma das alíquotas foi depositada sobre o gradiente Equipure™ (Nidacon Laboratories AB, Gothenborg, Suécia) e a outra apenas diluída (controle). As alíquotas foram centrifugadas a 700g por 15 minutos e os peletes ressuspensos em meio comercial e reavaliado para as mesmas características. As variáveis pré e pós-centrifugação foram comparadas.

Para congelamento do sêmen foram selecionados 10 touros, que após a seleção espermática no Equipure™ apresentasse motilidade espermática > 50%. Após a seleção espermática uma alíquota do pelete foi recolhida e diluída em meio comercial contendo crioprotetor, numa concentração de 30×10^6 espermatozoides. As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL, refrigeradas a 4 °C durante 4 horas para posterior congelamento. A congelamento foi efetuada em caixas de transporte de sêmen (Botuflex®, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil). Após a congelamento as amostras foram armazenadas em botijão criogênico a -196 °C. As amostras foram descongeladas a 46 °C durante 30 segundos e reavaliadas para as mesmas características espermáticas anteriormente citadas para o sêmen fresco.

2.3. Avaliação da cinética e concentração espermática

Esta avaliação foi realizada mediante método computadorizado (iSperm™ ,

117 Aidmics Biotechnology Co., Ltda, Genepro, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil)
118 foram consideradas as seguintes características: concentração, motilidade total,
119 motilidade progressiva, velocidade progressiva e curvilínea (VCL), velocidade
120 média (VAP), velocidade retilínea (VSL), retidão (STR) e linearidade (LIN). Para
121 esta avaliação, uma alíquota da amostra seminal foi diluída 1: 50 em diluente
122 comercial sem crioprotetor (BotuBOV. Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil).
123 Então, da diluição, uma alíquota de 7,5 µL foi depositada no equipamento para
124 leitura das características espermáticas.

125 **2.4. Avaliação da integridade de membrana**

126 Para avaliação da integridade da membrana uma alíquota de amostra foi
127 diluída em corante contendo eosina-nigrosina (BotuVital®, Botupharma®,
128 Botucatu, São Paulo, Brasil) e depositada sobre uma lâmina, foi feito um
129 esfregaço e deixada secar sobre uma placa aquecedora. Mediante microscopia
130 optica em 1000X, 200 células foram avaliadas e classificadas com membrana
131 íntegra quando não coradas e com membrana lesada, quando coradas em
132 vermelho.

133 **2.5. Avaliação da morfologia espermática**

134 Para avaliação da morfologia espermática foi feito outro esfregaço das
135 amostras e coradas com a técnica de tinção de panótico rápido (Laborclin®
136 Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, Paraná, Brasil). A avaliação foi feita
137 em um microscópio óptico com aumento 1000X. 200 células espermáticas foram
138 contadas e classificadas em normais, com defeitos maiores e menores [3],
139 segundo a presença ou ausência de alterações morfológicas.

140 **2.6. Gradiente Equipure™**

141 Após a avaliação da cinética e concentração espermática, uma alíquota
142 das amostras contendo 1×10^6 espermatozoides foi usada para a preparação do
143 gradiente Equipure™ a temperatura ambiente. Em tubo tipo Falcon de 15 mL foi
144 adicionado 1 mL de Equipure™. O tubo foi inclinado em um ângulo de 45° para
145 depositar cuidadosamente a amostra de sêmen fresco diluída em meio comercial
146 sem crioprotetor (BotuBOV®) sobre o gradiente, formando-se 2 fases. A mesma
147 concentração de espermatozoides, diluída no mesmo meio, foi preparada para
148 centrifugação sem o uso do gradiente (controle). As amostras foram

centrifugadas a 700g por 10 minutos. Concluída a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspensionado em 1 mL de meio comercial sem crioprotetor. As características espermáticas das amostras submetidas ao gradiente e controle foram novamente avaliadas.

2.7. Análise estatística

As variáveis foram avaliadas quanto a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk com correção de Lilliefors e de homogeneidade da variância pelo teste de Levene. Para a primeira parte do estudo comparou-se as amostras pré-centrifugação (sêmen fresco), controle (centrifugado sem o gradiente) e gradiente Equipure™ usando ANOVA *one way*, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A comparação dos resultados da viabilidade espermática após a congelação foram efetuadas pelo teste t (integridade de membrana, porcentagem de defeitos maiores e porcentagem de espermatozoides normais) e Man-Whitney (defeitos menores).

Para determinação do número amostral foi usado o software Sigma-Plot versão 4.0 (2011), com $\alpha < 0,05$ e considerou o número ideal quando o poder do teste foi $> 0,80$.

3. Resultados

Os resultados referentes a avaliação da separação no gradiente Equipure™ estão demonstrados na Tabela 1. Após a centrifugação das amostras em meio diluente (controle) e no gradiente (Equipure™) foi observado redução da motilidade espermática, quando comparado ao ejaculado fresco. Similares resultados foram também encontrados para os parâmetros de cinética espermática. Já os defeitos maiores e menores foram inferiores nas amostras centrifugadas no Equipure™. Os resultados do grupo controle foram similares ao Equipure™. A recuperação da concentração inicial adicionada sobre o gradiente Equipure™ variou entre 5,9 e 100%.

TABELA 1. Características de amostras de espermatozoides bovinos centrifugadas *in natura* (fresco) e diluídas em BotuBOV (controle) e Equipure™.

CARACTERÍSTICA	FRESCO Mediana	CONTROLE Mediana	EQUIPURE™ Mediana
----------------	-------------------	---------------------	----------------------

	(Q25; Q75)	(Q25; Q75)	(Q25; Q75)
Motilidade total (%)	57,0 (43,0; 73,0) ^a	42,0 (19,0; 56,0) ^b	40,0 (28,0; 60,0) ^b
Motilidade progressiva (%)	41,0 (26,50; 50,5)	35,0 (7,0; 47,3)	29,0 (22,5; 52,0)
VCL (μ /s)	105,0 (97,3; 111,3) ^a	103,0 (69,8; 119,8) ^b	103,0 (83,3; 117,8) ^c
VAP (μ /s)	76,0 (70,8; 79,3) ^a	75,0 (45,5; 86,3) ^b	73,0 (58,8; 86,5) ^c
VSL (μ /s)	68,0 (58,8; 72,3) ^a	67,0 (42,5; 78,8) ^a	67,0 (54,0; 82,3) ^b
STR (%)	89,0 (85,8; 90,00) ^a	87,0 (64,0; 93,3) ^b	91,0 (89,0; 94,0) ^a
LIN (%)	64,0 (53,0; 70,0) ^a	62,0 (42,8; 70,3) ^b	66,0 (62,5; 73,3) ^c
Defeitos maiores (%)	14,0 (10,0; 21,0) ^a	15,0 (10,0; 20,3) ^a	7,0 (6,0; 11,3) ^b
Defeitos menores (%)	10,0 (8,0; 16,5) ^a	9,0 (5,0; 11,0) ^a	2,0 (2,0; 3,0) ^b

180 ^{abc}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

181 ANOVA *one way* seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls

182

183 Os resultados referentes a avaliação das amostras pos-descongelacao
 184 tratadas com o gradiente Equipure e o grupo controle, estão demonstrados nas
 185 Tabelas 2 e 3. Após a descongelação das amostras tratadas com meio diluente
 186 (controle) e no gradiente (Equipure), foi observado que a motilidade total (%) no
 187 teve diferença estatística, mesmo assim a motilidade progressiva, os demais
 188 parâmetros da cinética espermática não tiveram diferença. Respeito a os
 189 resultados obtidos da morfologia espermática e integridade de membrana houve
 190 diferença respeito à as porcentagens de amostras espermáticas tratadas com o
 191 BotuBOV e amostras tratadas com o Equipure, obtendo amostras tratadas com
 192 Equipure mais integras, e com menor número de defeitos espermáticos, assim
 193 como maior número de espermatozoides normais.

194

195 **TABELA 2.** Resultados da mediana (mínimos e máximos) da cinética
 196 espermática de amostras de sêmen submetidas a centrifugação com BotuBOV®
 197 e Equipure™ e, posteriormente, congelados em BotuBOV®

	Equipure™ Mediana	Controle (BotuBOV®) Mediana
Motilidade total (%)	26,0 (6,0; 89,0)	27,0 (8,0; 67,0)
Motilidade progressiva (%)	2,0 (0,0; 16,0)	2,0 (0,0; 32,0)
VCL	45,0 (28,0; 62,0)	46,0 (29,0; 84,0)
VAP	24,0 (11,0; 36,0)	22,0 (13,0; 51,0)
VSL	18,0 (8,0; 30,0)	18,0 (10,0; 46,0)
STR	69,0 (54,0; 82,0)	74,0 (22,0; 81,0)
LIN	33,0 (22,0; 47,0)	41,0 (29,0; 49,0)

198

199 **TABELA 3.** Resultados da mediana (mínimos e máximos) da integridade de
 200 membrana e morfologia espermática das amostras de sêmen submetidas a
 201 centrifugação com BotuBOV® e Equipure™ e, posteriormente, congelados em
 202 BotuBOV®

Característica	BotuBOV®	Equipure™	Valor de P
Integridade de membrana (%)	56,0 (40,0 – 79,0)	65,0 (50,0 – 78,0)	> 0,05*
Defeitos maiores (%)	21,0 (15,0 – 29,5)	12,5 (5,5 – 15,0)	< 0,01*
Defeitos menores (%)	35,0 (26,0 – 47,0)	18,0 (11,0 – 43,5)	0,04**
Espermatozoides normais (%)	45,0 (30,0 – 59,0)	71,5 (41,5 – 78,5)	< 0,01*

203 *Teste t; **Teste Mann-Whitney

204 4. DISCUSSÃO

205 A fertilização é um processo dependente da capacidade espermática,
 206 entre elas a quantidade de células vivas, moveis e morfológicamente normais
 207 quando depositadas no trato reprodutor da fêmea. No entanto, o sucesso deste
 208 acontecimento biológico é amplamente dependente da competência funcional
 209 das células espermáticas [4]. Atualmente existem numerosos estudos que
 210 avaliam diferentes métodos para seleção espermática nas diferentes espécies
 211 de animais domésticos, porém discrepâncias têm sido reportadas enquanto aos
 212 parâmetros específicos avaliados que definem a efetividade da separação [5, 6,
 213 7, 8]. Nosso trabalho avaliou parâmetros específicos da cinética espermática de
 214 uma população de touros reprodutores mediante análise computadorizado e
 215 microscopia ótica para avaliação morfológica e viabilidade de amostras seminais
 216 submetidas a separação mediante um gradiente de concentração (Equipure™).
 217 Este produto é similar em composição ao utilizado comercialmente na espécie
 218 bovina Bovipure® (Nidacon, International, Mölndal, Sweden), porém sua
 219 disponibilidade no mercado as vezes é reduzida devido à demanda atual no
 220 Brasil. O coloide Equipure™, uma solução a base de sílica [7], é amplamente
 221 utilizado pelos baixos níveis de endotoxicidade [9] e é utilizado para a seleção
 222 de espermatozoides com características fertilizante de garanhões [10] e
 223 posteriormente usados para criopreservação ou inseminação artificial com
 224 sêmen fresco [11].

225 Touros com qualidade seminal normal devem apresentar como mínimo
 226 uma motilidade progressiva e morfologia normal $\geq 70\%$ [12]. Pelos nossos

227 resultados iniciais, todos os animais foram classificados com qualidade seminal
228 pobre.

229 Um dos parâmetros que definem um sêmen com boa capacidade
230 fertilizante é a motilidade progressiva [13]. No entanto, nosso estudo teve uma
231 queda neste parâmetro após a centrifugação nos grupos controle e Equipure,
232 atribuindo isto aos possíveis danos intracelulares ou vazamento de componentes
233 de membrana gerados pela alta força de centrifugação, onde 300g é a força
234 máxima para não gerar danos no espermatozoide, porém com uma baixa
235 efetividade na separação [14]. Goodla et al., [15] não reportou diferenças na
236 motilidade entre amostras seminais de touros submetidas a separação mediante
237 centrifugação em camada única quando comparados com amostras sem
238 centrifugar; no entanto, o dano na estrutura da cromatina foi mais baixo no grupo
239 submetido à centrifugação.

240 Outros parâmetros cinéticos foram avaliados, a LIN e STR tiveram
241 melhores porcentagens para o grupo Equipure quando comparados com sêmen
242 fresco; porém existem reportes afirmando a falta de correlação com a
243 capacidade fertilizante em touros [16]. Contraditoriamente, dados cinéticos de
244 velocidade e movimento não lineal tem maior relevância em espermatozoides
245 frescos para prever a qualidade espermática e fertilidade do touro; agora,
246 movimentos lineares são mais representativos em amostras descongeladas [17].

247 Os nossos resultados demonstram que os parâmetros cinemáticos de
248 amostras seminais pre-congelação y após-congelação são bastante similares
249 quando comparados os grupos controle e Equipure™, definindo que o produto
250 testado pode ser usado como uma alternativa de uso interespecie de parâmetros
251 cinemáticos de células espermáticas. No entanto os valores de MT das amostras
252 nos grupos controle e Equipure (pre e pos congelação) foram moderadamente
253 baixos quando comparados com sêmen fresco. Para o caso da MP, está teve o
254 mesmo comportamento que a MT em análises pre congelação, porém foi
255 extremadamente baixa nas análises posteriores ao descongelamento nos dois
256 grupos. Estes dados são totalmente diferentes aos diferentes estudos onde
257 usaram algum gradiente de concentração em sêmen fresco, diluído e após
258 congelação na espécie de uso recomendada [18] ou interespecie [19].

259 Para as características morfológicas, o uso de Equipure™ teve um efeito
260 positivo nas amostras espermáticas após descongelação, obtendo uma

261 porcentagem (70%) de células normais, ótima para considerar um touro como
262 apto para reproduzir-se [20,21] e classificar a amostra com qualidade seminal
263 normal [12]. Para confirmar estes dados, a integridade de membrana teve
264 valores similares á quantidade de células normais avaliadas no exame
265 morfológico, sendo estes dos parâmetros diretamente proporcionais.

266 5. CONCLUSÃO

267 Para concluir, podemos inferir que o uso de Equipure em amostras de
268 sêmen de touros com pobre qualidade espermática pode aumentar a taxa de
269 células espermáticas morfolologicamente normais até valores de referência,
270 entretanto, é importante deixar claro que a taxa de recuperação espermática
271 obtida descende até valores mínimos quando comparados com amostras de
272 sêmen fresco. Estudos onde se avaliem as características subjetivas da
273 qualidade seminal, o tempo e força da centrifugação, tempo transcorrido entre
274 os procedimentos e o uso de diluentes devem ser reavaliados.

275 6. AGRADECIMENTOS

276 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
277 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de
278 Financiamento 001.

279 Agradecemos também à **Botupharma®**, que nos apoiou na execução do
280 projeto fornecendo os meios a serem utilizados.

281 Agradecer à equipe de trabalho, ao André Crespilho pelo apoio no projeto
282 e ao Hector Garcia pelo compromisso na parte final do projeto.

283 Por último, gostaria de agradecer à **Central Belavista do grupo CVR**, por
284 nos permitir realizar o experimento nas suas instalações.

286 7. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

287 The authors declare that they have no conflict of interest.

288

289

290

291

292

REFERÊNCIAS

- [1] Henkel R, SCHILL W. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003, v. 1, p. 108.
- [2] Hernandez Pichardo J.E, Rodriguez Suastegui J.L, Sanchez Martinez C, Ramirez Franco R. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de Salud Animal*, 2015, v. 37, n. 1, p. 15-20.
- [3] Hansen G.B, Fortes M. S, Satake N. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. *Andrology*, 2018; 6(4), 627-633. <https://doi.org/10.1111/andr.12486>
- [4] Petrunkina A. M, Waberski D, Gunzel-Apel A. R, Topfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007;134:3-17.
- [5] Galarza D. A, Jara D. I, Paredes E. B, Samaniego J. X, Méndez M. S, Soria M. E, Santiago-Moreno J. (2022). BoviPure® density-gradient centrifugation procedure enhances the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science* 2022;242. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107003>
- [6] Hegedus R. M. Comparison of Canine Spermatozoa Motility, Morphology, and RNA Integrity Using Three Different Cell Purification Solutions. 2014.
- [7] Vasconcelos J.G, de SOUZA M. E. M Saraiva, A. A, FILHO A. C. D. A. T. Estratégia de seleção espermática para congelação de sêmen utilizando EquiPureTM. *Ci. Anim*; 2018;28-30.
- [8] Tiwari S, Srivastava R, Kulkarni N. A, Raval K, Patidar P, Fernandes A, Mohanty T.K. Filtration techniques are advantageous over colloidal centrifugation in improving freezability of low-quality buffalo bull (*Bubalus bubalis*) ejaculates. *Animal Biotechnology*, 2022;1-11. DOI: [10.1080/10495398.2022.2121715](https://doi.org/10.1080/10495398.2022.2121715)

- 327 [9] Söderlund B. Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density
328 gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 2000; 15(4),
329 857-860. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.857>
330
- 331 [10] Sanciler-Silva Y. F. R., Monteiro G. A. Tecnologias para criopreservação de
332 sêmen em equinos. *Anais da*; 2019; 85.
333
- 334 [11] Rodríguez A. M. V., Suárez A. Ú, Cañón A. P, Betancur G. R, Murcia L. B,
335 Camacho C, Osorio J. P. Efecto de la centrifugación con coloide (EquiPure [R])
336 en las características espermáticas pos refrigeración, empleando sondas
337 fluorescentes. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2018; 13(2), 283-
338 284.
339
- 340 [12] Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befacchia G, Contri A. Single-
341 and double-layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine
342 sperm from poor quality ejaculates. *Journal of animal science and biotechnology*,
343 2016, 7(1), 1-9.
344
- 345 [13] Gillan L, Kroetsch T, Maxwell W.C, Evans G. Assessment of in vitro sperm
346 characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*,
347 2008; 103(3-4), 201-214.
348
- 349 [14] Makler A, Jakobi P. Effects of shaking and centrifugation on human sperm
350 motility. *Archives of andrology*, 1981; 7(1), 21-26.
351
- 352 [15] Goodla L, Morrell J. M, Yusnizar Y, Stålhammar H, Johannisson A. Quality
353 of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *Journal of*
354 *dairy Science*, 2014; 97(4), 2204-2212.
355
- 356 [16] Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti
357 W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the
358 fertilization rate in vitro after intra-cytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;
359 69, 564–568.
360

- 361 [17] Ibanescu, I., Siuda, M., & Bollwein, H. (2020). Motile sperm subpopulations
362 in bull semen using different clustering approaches—Associations with flow
363 cytometric sperm characteristics and fertility. *Animal Reproduction Science*, 215,
364 106329.
- 365
- 366 [18] Papa P.M, Maziero R.R.D, Hartwig F.P, Lisboa F.P, Dellaqua J.A, Alvarenga
367 M.A, Guasti P.N, Landim-Alvarenga F.C, Papa F.O. Effect of density gradient on
368 sperm parameters os stallion frozen semen. *Journal of Equine Veterinary*
369 *Science*, 2012;32;505. DOI 10.1016/j.jevs.2012.06.078
- 370
- 371 [19] Galarza D.A, Jara D.I, Paredes E. B, Samaniego J.X, Méndez M.S, Soria
372 M.E, Santiago-Moreno J. BoviPure® density-gradient centrifugation procedure
373 enhances the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal spermatozoa.
374 *Animal reproduction science*, 2022; 242.
375 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107003>
- 376
- 377 [20] Fordyce G, Entwistle K, Norman S, Perry V, Gardiner B, Fordyce P.M.
378 Standardizing bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia.
379 *Theriogenology*, 2006;66(5), 1140-1148.
380 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.009>
- 381
- 382 [21] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para exame
383 andrológico e avaliação de sêmen animal. Terceira edição. Belo Horizonte; 2013.