

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**GRADIENTE DE DENSIDADE COLOIDAL EQUIPURE™
UTILIZADO PRÉ E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
EQUINO**

RAIZA ROCHA PEREIRA

BOTUCATU - SÃO PAULO

Junho/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**GRADIENTE DE DENSIDADE COLOIDAL EQUIPURE™
UTILIZADO PRÉ E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
EQUINO**

RAIZA ROCHA PEREIRA

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior

BOTUCATU- SÃO PAULO

Junho/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Pereira, Raiza Rocha.

Gradiente de densidade coloidal EquiPure utilizado pré e pós criopreservação de sêmen equino / Raiza Rocha Pereira. - Botucatu, 2023

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

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior
Capes: 50504002

1. Preservação do sêmen. 2. Criopreservação. 3. Equino. 4. Reprodução animal. 5. Sêmen.

Palavras-chave: Congelamento; EquiPure; Garanhão; Reprodução animal; Sêmen.

Nome do autor (a): Raiza Rocha Pereira

Título: GRADIENTE DE DENSIDADE COLOIDAL EQUIPURE™ UTILIZADO PRÉ
E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior
Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Igor Frederico Canisso

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Julio Cezar Ferraz Jacob

Membro

Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (IZ/UFRRJ)

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

Data da Qualificação: 26 de Junho de 2023.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus por me guiar e iluminar os meus passos.

Aos meus pais, Cladir Alzeman Rocha e Jair Oliveira Pereira, por todo amor incondicional e apoio durante toda a minha trajetória. Por todos os ensinamentos e por não me deixar desistir dos meus sonhos.

Meu irmão Otavio Rocha Pereira, por sempre me apoiar e me amparar.

Aos meus avôs paternos, os amores da minha vida, Isonia de Oliveira Pereira e Luiz Carlos Pereira que me deram todo o amor e afeição.

Aos meus avôs maternos, Maria Dilma Alzeman Rocha e Clemente Rocha, por sempre me apoiarem, me ajudarem. Por sempre me ensinar o valor do trabalho, esforço e dedicação, vocês são os meus exemplos de vida.

A minha tia Cleide, mulher forte, batalhadora, justa e de princípios que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos bons ou ruins. Nunca mediu esforços para me ajudar, obrigada tia. Ao meu tio Dione por sempre ter os conselhos mais sábios e por ser o melhor marido para minha tia.

Ao meu orientador, Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior, pela amizade, ensinamentos profissionais e pessoais.

À Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua, pela amizade, obrigada por toda ajuda durante o mestrado e o doutorado, por todos os ensinamentos. Saiba que tenho muita admiração pelo seu trabalho.

Ao professor Dr. Frederico Ozanam Papa pela honra em poder acompanhá-lo.

À banca examinadora composta por profissionais que tenho profunda admiração pelo trabalho incrível que realizam na reprodução equina: Dr. Fernanda Saules Ignácio, Prof. Dr. Igor Frederico Canisso, Prof. Dr. Julio Cezar Ferraz Jacob, Dr. Marcio Teoro do Carmo.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade em estar convivendo com grandes profissionais.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu, Edvaldo, Felipe e Andreia pela ajuda e pelos bons momentos de convívio.

À Botupharma, pela doação de materiais para a execução do trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, Lucas Canuto, Thaís Cavallero, Giovana Camargo, Camila trinke, Mariana Frasson, Luan Sitó, Beatriz Lippe e Estevam, por dividir comigo a jornada da pós-graduação, tornando-a mais divertida.

A todos meus amigos e parentes que não foram citados por nome, mas estão sempre em meu pensamento e minhas orações.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

E por fim, a todos as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento desse trabalho

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Configuração para análise do sêmen da espécie equina.....	45
Tabela 2.	Média $\pm$ erro padrão médio das avaliações no momento 0 (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático e estabilidade da membrana plasmática, geração de O_2^- mitocondrial, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica por citometria de fluxo dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure TM), EG (centrifugação com Equipure TM antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure TM após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure TM antes e depois do sêmen ser congelado) de 26 ejaculados de 15 garanhões	47
Tabela 3.	Média $\pm$ erro padrão médio das avaliações no momento 60 minutos pós-incubação à 37°C (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático e estabilidade da membrana plasmática, geração de O_2^- mitocondrial, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica por citometria de fluxo dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure TM), EG (centrifugação com Equipure TM antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure TM após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure TM antes e depois do sêmen ser congelado) de 26 ejaculados de 15 garanhões.....	48
Tabela 4.	Média $\pm$ erro padrão médio da taxa de recuperação (TXR, %) pós-centrifugação com o gradiente de densidade coloidal Equipure TM	49
Tabela 5.	Média $\pm$ erro padrão das avaliações das partidas utilizadas na inseminação no momento 0 (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure TM), EG (centrifugação com Equipure TM antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure TM após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure TM antes e depois do sêmen ser congelado) de garanhão “Bad freezing” utilizado na inseminação.....	49
Tabela 6.	Taxa de recuperação espermática pós-descongelamento e após a centrifugação com Equipure TM considerando a concentração de 800×10^6 de cavalo “Bad freezing” dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure TM), EG (centrifugação com Equipure TM antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure TM após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure TM antes e depois do sêmen ser congelado). Média da dose de inseminação móveis (valor calculado de acordo com a motilidade total). Média da dose de inseminação progressivo (valor calculado de acordo com a motilidade progressiva).....	50
Tabela 7.	Taxa de concepção por ciclo (TF, %) do sêmen congelado de um garanhão submetido aos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure TM); EG (centrifugação com Equipure TM antes do congelamento); CT + EG (centrifugação com Equipure TM após o sêmen ser descongelado); EG + EG (centrifugação com Equipure TM antes e depois do sêmen ser congelado).....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Espermatozoide equino.....	11
2.2 Criopreservação do sêmen equino.....	12
2.3 Metabolismo energético.....	15
2.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	17
2.5 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	17
2.6 Centrifugação em gradiente de densidade.....	19
3. OBJETIVOS.....	24
4. Referências.....	26

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1. GRADIENTE DE DENSIDADE COLOIDAL EQUIPURE™ UTILIZADO PRÉ E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

1. Introdução.....	36
2. Materiais e Métodos	38
3. Resultados	44
4. Discussão	47
5. Conclusão	52

PEREIRA, R.R. GRADIENTE DE DENSIDADE COLOIDAL EQUIPURE™ UTILIZADO PRÉ E PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO. Botucatu – SP. 2023. 60p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi verificar a qualidade espermática após utilização de um protocolo modificado de EquiPure™ antes e depois da criopreservação do sêmen equino. Experimento 1, foram utilizadas coletas de 15 garanhões ($n=26$). Quatro grupos experimentais foram formados: Controle (centrifugação convencional); EG (centrifugação com EquiPure™ antes do congelamento); CT+EG (centrifugação com EquiPure™ após o sêmen ser descongelado); EG+EG (centrifugação com EquiPure™ antes e depois do sêmen ser congelado). No experimento 2 foram realizados testes de fertilidade com os grupos experimentais: controle (centrifugação convencional); EG (centrifugação com EquiPure™ antes do congelamento); CT+EG (centrifugação com EquiPure™ após o sêmen ser descongelado); EG+EG (centrifugação com EquiPure™ antes e depois do sêmen ser congelado) utilizando quatro ciclos de 8 éguas ($n=32$) e um garanhão considerado “Bad freezing”. As inseminações foram feitas após a ovulação, mediante deposição profunda do sêmen no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação. Para as inseminações oito palhetas foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos com uma concentração de 100 milhões de espermatozoides por palhetas. Os grupos CT e EG tiveram uma dose fixa de 800 milhões de espermatozoides. A dose inseminante dos grupos CT+EG e EG+EG foram dependentes da recuperação espermática pós-centrifugação (v:v) pós descongelamento com EquiPure™. Os parâmetros espermáticos analisados foram a cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático e estabilidade da membrana plasmática, geração de O_2^- mitocondrial, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica por citometria de fluxo. As análises espermáticas dos grupos Controle e EG foram analisadas imediatamente após descongelação 37°C por 30 segundos (M0). Os grupos CT+EG e EG+EG foram analisados logo após o procedimento de centrifugação (M0). Todos os grupos foram analisados pós-incubação a 37°C por 60 minutos (M60). No M0 ($P<0,05$) o grupo EG+EG aumentou a motilidade total, motilidade progressiva, rápidos, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática comparada com os outros grupos avaliados; O grupo CT+EG aumentou os parâmetros de rápidos, estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e diminuiu a produção de ânion superóxido, em relação aos grupos controle e EG. Pós-incubação a 37°C por 60 minutos (M60) o grupo EG+EG aumentou os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, rápidos, alto potencial de membrana mitocondrial, e diminui a produção de O_2^- comparado com outros grupos. O grupo EG teve diferença do grupo controle na motilidade progressiva e espermatozoides rápidos. O grupo CT+EG diferiu do controle na motilidade total e progressiva, rápidos e peroxidação lipídica. O grupo CT+EG diferiu

do EG na motilidade progressiva e espermatozoides rápidos. Controle, EG e CT+EG não diferiram com relação ao alto potencial de membrana mitocondrial e produção de O_2^- . Os grupos não diferiram na estabilidade da membrana plasmática. As taxas de recuperação dos espermatozoides foram menores nos grupos CT+EG e EG+EG ($34,9 \pm 2,2$; $30,1 \pm 1,5$, respectivamente). A taxa de fertilidade por ciclo foi maior no grupo EG+EG (62,5%, 5/8) quando comparada aos demais grupos CT, EG, CT+EG (25% 2/8; 25% 2/8; 25% 2/8, respectivamente) os outros grupos testados não tiveram diferença. Concluiu-se, que a utilização de EquiPure™ aumenta a cinética espermática pós-descongelamento do sêmen equino, e que selecionar os espermatozoides antes da criopreservação e pós-descongelamento pode aumentar a taxa de prenhez de garanhão considerado “bad freezing”.

Palavras-chave: congelamento, EquiPure™, garanhão, sêmen.

PEREIRA, R.R. EQUIPURE™ COLLOIDAL DENSITY GRADIENT USED PRE AND POST CRYOPRESERVATION OF EQUINE SEMEN. Botucatu – SP. 2023. 60p. Tese (Doutorado) – São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify sperm quality after using a modified EquiPure™ protocol before and after cryopreservation of equine semen. In Experiment 1, samples from 15 stallions (n=26) were used. Four experimental groups were formed: control (conventional centrifugation); EG (centrifugation with EquiPure™ before freezing); CT+EG (centrifugation with EquiPure™ after semen is thawed); and EG+EG (centrifugation with EquiPure™ before and after semen is frozen). In experiment 2, fertility tests were performed with the following experimental groups: control (conventional centrifugation); EG (centrifugation with EquiPure™ before freezing); CT+EG (centrifugation with EquiPure™ after semen is thawed); EG+EG (centrifugation with EquiPure™ before and after the semen is frozen) using four cycles of 8 mares (n=32) and one stallion considered “Bad freezing”. The inseminations were performed after ovulation through deep deposition of semen in the ipsilateral uterine horn next to ovulation. For the inseminations, eight straws were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds with a concentration of 100 million spermatozoa per straw. The CT and EG groups had a fixed dose of 800 million sperm. The insemination doses of the CT+EG and EG+EG groups were dependent on post-centrifugation sperm recovery (v:v) after thawing with EquiPure™. The sperm parameters analyzed were sperm kinetics (total, progressive, and fast motility) by computerized analysis of sperm movement and plasma membrane stability, mitochondrial O₂⁻ generation, mitochondrial potential, and lipid peroxidation by flow cytometry. Sperm from the control and EG groups were analyzed immediately after thawing at 37°C for 30 seconds (M0). The CT+EG and EG+EG groups were analyzed right after the centrifugation procedure (M0). All groups were analyzed after incubation at 37°C for 60 minutes (M60). At M0 (P<0.05) the EG+EG group increased total motility, progressive motility, rapids, mitochondrial membrane potential, and plasma membrane stability compared to the other evaluated groups. The CT+EG group increased the parameters of rapids, plasma membrane stability, mitochondrial membrane potential, and decreased superoxide anion production in relation to the control and EG groups. Post-incubation at 37°C for 60 minutes (M60) the EG+EG group increased the parameters of total motility and progressive motility, had rapid, high mitochondrial membrane potential, and decreased O₂⁻ production compared to other groups. The EG group differed from the control group in terms of progressive motility and fast spermatozoa. The CT+EG group differed from the control in total and progressive motility, rapids, and lipid peroxidation. The CT+EG group differed from the EG in progressive motility and fast spermatozoa. Control, EG, and CT+EG did not differ with respect to high mitochondrial membrane potential and O₂⁻ production. The groups did not differ in plasma membrane stability. Sperm retrieval rates were lower in the CT+EG and EG+EG groups (34.9±2.2; 30.1±1.5, respectively). The fertility rate per cycle was higher in the EG+EG group (62.5%, 5/8) when compared to the other CT, EG, CT+EG groups (25% 2/8; 25% 2/8; 25% 2/8, respectively); the other groups tested showed no difference. It was concluded that the use of EquiPure™ increases the post-thawing sperm

quality parameters of equine semen and that selecting spermatozoa before cryopreservation and post-thawing can increase the pregnancy rate of stallions considered “bad freezing”.

Keywords: EquiPureTM, freezing, semen, stallion.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A criopreservação do sêmen equino permite a conservação do material genético por tempo indeterminado, a utilização deste em situações de infertilidade adquirida, óbito do garanhão e facilita o comércio nacional e internacional do mesmo. Contudo, durante o processo de congelação/descongelação as células espermáticas são expostas a condições extremamente desfavoráveis, afetando a motilidade, potencial de membrana mitocondrial, o status da membrana celular e a integridade do DNA, reduzindo a qualidade espermática, inibindo o transporte no sistema genital feminino, alterando o momento da fertilização e, finalmente, afetando o desenvolvimento embrionário (BAUMBER *et al.*, 2003; NEILD *et al.*, 2005; BATTUT *et al.*, 2017).

Outro ponto crítico decorrente do processo de criopreservação do sêmen está relacionado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a mitocôndria a principal fonte geradora destas substâncias, através da cadeia de transporte de elétrons (PEÑA *et al.*, 2015). As mitocôndrias são extremamente sensíveis ao processo de congelamento/descongelamento, com seu comprometimento funcional resultante do aumento na geração de ROS (ORTEGA FERRUSOLA *et al.*, 2009; PEÑA *et al.*, 2015). Tal fato seria a principal causa do estresse oxidativo nas membranas espermáticas, associado ao esgotamento do sistema de defesa antioxidante, pela remoção do plasma seminal, o que leva a uma redução na fertilidade (AITKEN *et al.*, 2014).

Para a maximização da performance reprodutiva em garanhões, busca-se, cada vez mais, a melhoria da qualidade dos processos de criopreservação. Estudos já adicionaram antioxidantes no sêmen equino para melhorar a defesa antioxidante (NOGUEIRA *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2022). Agentes crioprotetores foram testados para melhorar a proteção contra o choque osmótico e preservação das organelas celulares (ALVARENGA *et al.*, 2005; SIEME *et al.*, 2016). Há também a utilização de gradientes de densidade coloidal antes do congelamento ou pós descongelamento selecionando os espermatozoides morfolologicamente normais e com motilidade, melhorando assim a qualidade espermática (PAPA *et al.*, 2012; ALVARENGA *et al.*, 2016; FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2018).

O EquiPure™ é uma solução coloidal de partículas de sílica revestidas com silano um gradiente de densidade de camada única espécie-específico para equinos (MACPHERSON *et al.*, 2002), quando utilizado antes do processo de criopreservação e pós-descongelamento aumentou a motilidade progressiva e total, integridade de membrana plasmática, diminui a produção de O_2^- e elevou o potencial de membrana mitocondrial (FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2018; CERNY *et al.*, 2012). A utilização deste gradiente de densidade apresentou melhores resultados quando foi utilizado após o descongelamento (MANCILL *et al.*, 2010) no entanto não interferiu na fertilidade (CERNY *et al.*, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatozoide equino

Os espermatozoides são células altamente especializadas, desempenhando um papel fundamental para a fertilização e carregando o DNA paterno. Ocorre um intenso deslocamento do espermatozoide desde a sua deposição no útero até o local de fertilização no oviduto, esta célula deve ser capaz de se movimentar e passar pelo processo de capacitação espermática a fim de fertilizar o oócito (FLESCH e GADELLA, 2000).

O processo de espermatogênese requer remodelação extensiva de uma célula esférica convencional para se tornar uma célula morfológicamente distinta. Durante essa transformação, a cromatina no interior do núcleo do espermatozoide é altamente condensada, com volume cerca de 10% menor do que o de uma célula somática (FLESCH e GADELLA, 2000). Para adquirir esse nível de compactação, as histonas são substituídas por protaminas e o complexo DNA-protamina é enrolado numa forma helicoidal. Esse modelo fornece proteção adicional contra os efeitos de fatores genotóxicos (fragmentação de DNA) e confere conformação ideal à célula para executar sua função, facilitando a motilidade e penetração na zona pelúcida (BRAUN, 2001; MILLER *et al.*, 2010).

O acrossoma espermático recobre dois terços do núcleo em sua porção apical, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi, rica em enzimas hidrolíticas, proteases e receptores para executar a interação com o oócito, possibilitando a fertilização (FLESCH e GADELLA, 2000; HERMO *et al.*, 2010). A vulnerabilidade dos

espermatozoides ao estresse oxidativo é, em grande parte, consequência de sua estrutura anatômica e composição bioquímica altamente especializadas. Além disso, ao contrário da maioria das células somáticas que tem um espaço citoplasmático abundante para abrigar suas enzimas antioxidantes, o citoplasma da célula espermática é limitado, sendo sua porção mais abundante na peça intermediária (AITKEN *et al.*, 2014).

Em relação aos constituintes das membranas celulares, estas células contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídios, 13% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Parks e Lynch (1992) verificaram que a relação colesterol:fosfolipídeos é de 0,36 em espermatozoides de garanhão. Esta relação é mais alta em espermatozoides de bovinos (0,45). Quanto maior a proporção colesterol:fosfolipídeos mais resistente é a membrana plasmática às mudanças de temperatura (AMANN e PICKETT, 1987). O colesterol, dentre os lipídios neutros, é o que apresenta o teor de maior variabilidade entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, podendo variar de 13 a 37% do total de lipídeos. Sua função é estabilizar os fosfolipídios, mantendo a membrana em um estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula espermática (KOMAREK *et al.*, 1965; GADELLA *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2017).

Os espermatozoides de equinos apresentam quantidades elevadas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) nas membranas. Os ácidos graxos insaturados em concentração mais elevada são ácidos araquidônicos (18%), ácido docosapentanóico (17%), ácido oleico (5%) e ácido docosahexaenóico (8%). A alta proporção de ácidos graxos insaturados gera uma vulnerabilidade dos espermatozoides aos efeitos de ROS. As PUFAS tornam os espermatozoides mais sensíveis ao estresse oxidativo, pois as ligações carbono hidrogênio adjacentes às ligações duplas são mais instáveis e susceptíveis ao sequestro de hidrogênio pelas ROS (AITKEN *et al.*, 2014). Resultados de estudos com garanhões indicam que existem associações funcionais entre o conteúdo de PUFA ácido docosahexaenóico e a qualidade espermática (BRINSKO *et al.*, 2005, SCHMID-LAUSIGK e AURICH, 2014)

Mudanças sazonais na composição de ácidos graxos dos espermatozoides foram relatadas em garanhões. O conteúdo de PUFA no espermatozoide aumentou da estação não reprodutiva para a estação reprodutiva e isso foi associado a uma menor relação ácido docosahexaenóico / ácido docosapentanóico (AURICH *et al.*, 2018). Tais mudanças na

composição lipídica da membrana plasmática podem explicar as diferenças sazonais na resistência ao resfriamento e congelamento (GAUTIER e AURICH, 2022)

A qualidade espermática do sêmen equino é afetada pelo tipo de coleta realizada, equinos coletados com éguas no cio demonstram um maior volume e motilidade e redução da degeneração oxidativa das membranas celulares do que quando coletados com éguas no diestro (JEANNERAT *et al.*, 2017).

2.2 Metabolismo energético

Como nas células somáticas, as vias metabólicas comumente utilizadas pelos espermatozoides para produzir ATP são a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). As enzimas necessárias para a glicólise estão, principalmente, associadas à bainha fibrosa localizada na parte principal da cauda. Por outro lado, OXPHOS ocorre nas cristas mitocondriais, sendo um método significativamente mais eficiente de produção de ATP do que a glicólise (FERRUSOLA *et al.*, 2010). Apesar disso, os espermatozoides de espécies como humanos e roedores dependem, predominantemente, da glicólise para a produção de ATP (STOREY, 2008). Apesar da presença bem caracterizada de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) no espermatozoide equino, tornou-se evidente que os espermatozoides de garanhão diferem das outras espécies, pois suas principais demandas de energia são atendidas não pelas vias glicolíticas, mas pela OXPHOS e, na presença de inibidores mitocondriais, eles sofrem um rápido declínio no conteúdo de ATP. Essa dependência resulta em uma relação inversamente proporcional entre a produção de ROS e a fertilidade no garanhão (GIBB *et al.*, 2014).

Grandes moléculas polares, como a glicose, não podem se difundir através das membranas, e seu transporte é facilitado pelas proteínas transportadoras de glicose (GLUTs), as quais são classificadas de acordo com sua capacidade relativa de transportar hexoses (como glicose, manitol e frutose), amino-açúcares ou vitaminas. Desde a descoberta do transportador de glicose GLUT1, muitas GLUTs adicionais foram caracterizadas. Nos espermatozoides da maioria das espécies, a distribuição de GLUTs muda junto com o status de capacitação da célula (ou seja, entre estados não capacitados e capacitados), para fornecer energia nos locais que requerem modificações na membrana ou hiperativação da motilidade (BUCCI *et al.*, 2010; BUCCI *et al.*, 2011). Por outro lado, a distribuição de GLUTs nos espermatozoides do garanhão não muda com o status de

capacitação da célula, indicando que, em espécies que dependem prioritariamente de OXPHOS, a glicólise não é necessária para apoiar a produção de ATP para capacitação e reação do acrossoma (BUCCI *et al.*, 2010).

Os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão localizados na membrana interna das mitocôndrias. A OXPHOS é a via comum pela qual os elétrons de diferentes combustíveis do organismo fluem para o oxigênio (CHAMPE *et al.*, 2006). A cadeia respiratória é organizada em cinco complexos supramoleculares, sendo que, ao final, o oxigênio (O₂) é reduzido, gerando água (H₂O). O complexo I catalisa a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, complexo I) e flavinaadenina dinucleotídeo (FADH₂), os quais são oriundos do ciclo de Krebs e da glicólise (FERRAMOSCA E ZARA, 2014). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, e o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o O₂ (ARAÚJO *et al.*, 2017). Neste processo, prótons (H⁺) bombeados para o espaço entre as membranas geram um gradiente químico e elétrico que possibilita o fluxo inverso dos prótons pela ATP sintetase (complexo V), com a resultante formação de ATP (NELSON e COX, 2014).

A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre, principalmente, em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons, no complexo I (NADH: coenzima Q redutase) e no complexo III (ubiquinol: citocromo c redutase). No entanto, dentre os dois pontos, o complexo III é o principal local de produção de ROS. Elétrons dos complexos desidrogenases I ou II são transferidos à coenzima Q (ubiquinona). A forma reduzida resultante (QH₂), sofre duas reduções sequenciais de um elétron (o ciclo Q) usando formas de citocromo b oxidada e reduzida e citocromo c. O intermediário instável no ciclo Q pode conduzir à formação de superóxido por transferência direta de elétrons para o oxigênio molecular. A geração de ânion superóxido é não enzimática e, portanto, quanto maior a taxa de metabolismo, maior será a produção de ROS (ARAÚJO *et al.*, 2017; FINKEL e HOLBROOK, 2000).

A alta produção de ROS pelo espermatozoide equino é um cenário fisiologicamente normal causado por vazamento de superóxido da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais durante a OXPHOS, levando ao aumento das taxas de peroxidação lipídica e, após armazenamento prolongado, perda da cinética espermática e

danos morfofuncionais da estrutura espermática (GIBB *et al.*, 2014). Esse fenômeno introduz uma série de implicações para o armazenamento dos espermatozoides de garanhões, uma vez que a geração prolongada de ROS na ausência de radicais extracelulares e sequestradores de aldeídos lipídicos leva a danos oxidativos irreversíveis, prejudicando a integridade do DNA e a funcionalidade dos espermatozoides (AITKEN *et al.*, 2014). As mitocôndrias foram identificadas como uma das estruturas dos espermatozoides mais sensíveis para criopreservação (ORTEGA FERRUSOLA *et al.*, 2009; PEÑA *et al.*, 2015).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As ROS são produzidas por meio de reações metabólicas normais e desempenham papéis em múltiplos processos, como apoptose e sinalização celular. Algumas das ROS se enquadram na categoria de radicais livres, definidos por átomos ou moléculas que tem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada (NORDBERG e ARNÉR, 2001). As ROS reagem com qualquer componente bioquímico da célula, particularmente lipídios nas membranas celulares. Os espermatozoides, como as células somáticas, têm a capacidade de gerar e degradar ROS que, em equilíbrio com antioxidantes, são importantes para que a célula realize suas funções fisiológicas. Desempenham, também, um papel importante na função normal dos espermatozoides, incluindo a hiperativação da motilidade, a quimiotaxia, a capacitação e a reação acrossômica (GIBB *et al.*, 2014).

A principal ROS produzida é o ânion superóxido (O_2^-), formado após o oxigênio ser reduzido na presença de um elétron livre (e^-). O ânion superóxido está presente, principalmente, em ambientes aeróbicos ricos em elétrons, na membrana mitocondrial e através da cadeia respiratória (MAIA e BICUDO, 2009). Na presença de superóxido dismutase (SOD) ou pela desmutação espontânea forma-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BALL, 2011). O H_2O_2 penetra facilmente em membranas biológicas, desempenhando um papel formador de radical como um intermediário na produção de moléculas de ROS mais reativas como o radical hidroxila ($OH^\cdot$), por meio de oxidação de metais de transição (BALL, 2008). O radical hidroxila ($OH^\cdot$) é o radical livre com maior capacidade de danos à célula espermática, formado a partir da reação de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio sofre uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+): $H_2O_2 + Cu^+ / Fe^+ \rightarrow OH^- + OH^\cdot + Cu^{2+} / Fe^{3+}$ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Este radical é considerado o mais deletério para a célula espermática, pois reage rapidamente com metais ou outros radicais no sítio onde foi produzido, promovendo danos ao DNA e oxidação de ácidos graxos de membranas celulares (SIKKA, 2001)

2.4 Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes das células. Este desequilíbrio na produção ou degradação das ROS pode ter efeitos adversos nos espermatozoides (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Durante o armazenamento pela criopreservação o estresse oxidativo é ainda maior, pois grande parte do plasma seminal é removido do sêmen, onde está a maioria das enzimas antioxidantes (BALL, 2008; LOOMIS, 2006). No decorrer do procedimento de refrigeração, há um aumento na concentração de cálcio intracelular e uma geração aumentada de ROS. Há também uma elevação nos níveis de osmolaridade, estimulando um aumento dependente de ROS na fosforilação da tirosina, podendo levar à capacitação prematura dos espermatozoides (NORDBERG e ARNÉR, 2001)

Nas cristas mitocondriais ocorre o metabolismo oxidativo que resulta na doação de elétrons para a molécula de oxigênio, gerando ânion superóxido, que rapidamente se desloca para o H_2O_2 sob a ação da superóxido dismutase (SOD). Qualquer impedimento ao fluxo de elétrons ao longo da membrana mitocondrial interna, desencadeará geração de ânion superóxido por essas organelas da célula espermática (PEÑA *et al.*, 2009). Embora os espermatozoides defeituosos tenham, frequentemente, perdido seu potencial de membrana mitocondrial, a despolarização nessas organelas não desencadeia, por si só, uma explosão de geração de ROS mitocondriais. Contudo, a perda de potencial mitocondrial, em casos de função espermática defeituosa, pode ser uma consequência e não uma causa de estresse oxidativo dentro dessas células. A redução da motilidade espermática associada às ROS ocorre na ausência de qualquer diminuição detectável na integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal ou potencial de membrana mitocondrial. Portanto, a motilidade dos espermatozoides é um indicador sensível do estresse oxidativo e pode ser um dos primeiros parâmetros afetados durante o estresse oxidativo (PEÑA *et al.*, 2015).

O processo das reações em cadeia de peroxidação lipídica é facilitado pelas duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados. Os espermatozoides são

particularmente susceptíveis ao ataque oxidativo, porque sua membrana plasmática é rica em PUFAS, para fornecer a fluidez de membrana necessária para os eventos de fusão associados à fertilização, especialmente a reação do acrossoma e a fusão de espermatozoides-oócitos (AITKEN *et al.*, 2014). O impacto da peroxidação lipídica na função espermática é claramente refletido pela perda de motilidade. De fato, a relação entre peroxidação lipídica e motilidade é evidente quando ocorre um aumento na motilidade espermática depois de serem expostos aos antioxidantes como melatonina, carnitina e α -tocoferol (NOGUEIRA *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2022).

Proteínas do DNA funcionalmente importantes também estão sujeitas à modificação por aldeídos, como o 4-hidroxinonenal (4HNE), gerado em consequência do processo peroxidativo. As proteínas adicionadas pelo 4HNE incluem elementos da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, como a desidrogenase do ácido succínico (AITKEN *et al.*, 1995). O resultado desse ataque eletrolítico é estimular a produção de ROS nas mitocôndrias em um ciclo de peroxidação lipídica autoperpetuante que, em última instância, desencadeia a via apoptótica intrínseca, levando a uma rápida perda de motilidade e apoptose celular. Um dos principais pontos de diferença entre a apoptose em espermatozoides e células somáticas é que, na célula espermática, o DNA nuclear está localizado na cabeça, separado da mitocôndria e da maior parte do citoplasma. Como resultado, as nucleases ativadas e liberadas na peça intermediária durante a apoptose não acessam o DNA na cabeça do espermatozoide para clivá-lo. No entanto, as ROS geradas durante a apoptose podem facilmente obter acesso ao núcleo do espermatozoide e gerar uma base oxidativa, tipicamente 8-hidroxi, 2'-desoxiguanosina (8OHdG), que são convertidos em locais básicos por 8-oxoguanina glicosilase (OGG1), a única enzima da via de reparo de excisão de base existente nos espermatozoides (AITKEN *et al.*, 2014).

Uma vez iniciado o estresse oxidativo, aldeídos como o 4- hidroxinonenal ou a acroleína, gerados como consequência da peroxidação lipídica, desencadeiam uma geração adicional de ROS pelas mitocôndrias do espermatozoide e aceleram o início de um processo apoptótico intrínseco, que inevitavelmente, leva à morte celular (MOAZAMIAN *et al.*, 2015). A peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática do espermatozoide interrompe todas as funções dependentes da membrana nessas células, incluindo motilidade e fusão de espermatozoides-oócito. Além

disso, o estresse oxidativo pode danificar a integridade do DNA no núcleo espermático e nas mitocôndrias. Esse dano pode ser aumentado por erros de espermiogênese, levando à remodelação da cromatina prejudicada durante os estágios finais da diferenciação espermática e à fraca protaminação da cromatina. A presença de dano ao DNA nos espermatozoides também está associada às falhas na fertilização e desenvolvimento embrionário anormal (AITKEN e CURRY, 2011).

2.5 Criopreservação do sêmen equino

Histórica e culturalmente, cavalos são selecionados para reprodução com base no pedigree e desempenho atlético, e não por características reprodutivas (GIBB e AITKEN, 2016), o que pode resultar em animais com baixa qualidade seminal e/ou pouca tolerância criopreservação. De fato, a criopreservação do sêmen causa diferentes tipos de danos aos espermatozoides, e são decorrentes do choque térmico ao frio, choque osmótico e estresse oxidativo (BAUMBER *et al.*, 2003; BURNAUGH *et al.*, 2010). Tais lesões resultam em lipoperoxidação, pela produção excessiva de ROS, disfunção mitocondrial, depleção do sistema de reserva intracelular de ATP, lesões irreversíveis nas membranas plasmática e acrossomal e queda acentuada da motilidade espermática (DARR *et al.*, 2016, PEÑA *et al.*, 2009)

O espermatozoide do garanhão tem alto grau de variabilidade individual com relação a sua qualidade após congelamento/descongelamento e taxas de prenhez (VIDAMENT *et al.* 1997; LOOMIS e GRAHAM, 2008). Diferenças na estabilidade do espermatozoide em relação ao processamento de criopreservação podem estar relacionadas à variação nas propriedades da membrana espermática, incluindo composição de fosfolipídios, teor de colesterol, bem como permeabilidade da membrana e limites de tolerância osmótica (HAMMERSTEDT *et al.* 1990; PARKS E LYNCH 1992; SIEME *et al.* 2008).

Os diluentes de congelamento contêm sais, tampão, açúcares, proteínas, gema de ovo e normalmente, e agentes crioprotetores como glicerol, amidas, etilenoglicol, DMSO, que por serem permeáveis proporcionam a proteção intracelular (AMANN E PICKETT, 1987; SIEME *et al.*, 2016). Agentes crioprotetores podem ser classificados como permeáveis ou intracelulares e impermeáveis ou extracelulares. Os permeáveis atuam através de sua capacidade de se ligar à água ou às suas propriedades coligativas, e

atravessam a membrana plasmática (MP), modulando a taxa e o conteúdo da desidratação celular, durante a transição de fase da membrana plasmática induzida pela congelamento (ALVARENGA *et al.*, 2005). Os crioprotetores não permeáveis são caracterizados por pequenas moléculas osmoticamente ativas e macromoléculas osmoticamente inativas (SIEME *et al.*, 2016), e protegem os espermatozoides, através da criação de um ambiente extracelular hipertônico, que induz o movimento da água para fora das células, desidratando-as e reduzindo as chances de formação de cristais de gelo no meio intracelular (ALVARENGA *et al.*, 2016).

A refrigeração, etapa do processo de criopreservação, altera estruturas e conformação de biomoléculas da MP e, quando não realizada adequadamente, resulta em lesões na membrana, com consequente queda de motilidade e fertilidade (SQUIRES *et al.*, 1999). Em relação à taxa de refrigeração, Kayser *et al.* (1992) relataram que o sêmen equino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20°C, mas, entre 20 a 5°C, deve-se obedecer a uma curva lenta de refrigeração, menor que -0,1°C/min. De fato, nesta faixa de temperatura, ocorre a transição de fase dos lipídeos da MP, que passam do estado líquido cristalino para gel (SQUIRES *et al.*, 1999), e uma curva de refrigeração lenta neste período pode reduzir os danos causados à MP, relacionados ao choque térmico pelo frio. Squires *et al.* (1999) indicam que esta fase crítica ocorre entre 19 e 8°C, momento em que a taxa de refrigeração deve ser de -0,05°C/min, desta forma favorecendo a reorganização dos lipídeos da MP.

Durante a congelamento, o espermatozoide é exposto a temperaturas abaixo de 0°C, quando se inicia a formação extracelular de cristais de gelo, gerando um aumento na concentração de sais neste ambiente (AMANN E PICKETT, 1987), o que resulta em ambiente hipertônico para a célula espermática. Tal fato, leva à desidratação espermática, na tentativa de manter o equilíbrio na concentração de solutos entre os meios intra e extracelulares (SIEME *et al.*, 2015). A taxa de desidratação varia conforme a velocidade da refrigeração, sendo a lenta considerada a ideal, evitando que se formem, em excesso, cristais de gelo no meio intracelular, o que levaria à morte celular. Já na descongelamento, ocorre o processo inverso, o espermatozoide é exposto a condições hipotônicas, resultando em absorção de água e edema da célula (AMANN E PICKETT, 1987; SIEME *et al.*, 2015; SIEME *et al.*, 2016).

Segundo PEÑA *et al.* (2015), a mitocôndria é mais sensível ao choque osmótico do que a MP. Ao longo do processo de criopreservação do sêmen, ocorre aumento na produção de ROS, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora destas substâncias, através da cadeia de transporte de elétrons (PEÑA *et al.*, 2009). O espermatozoide criopreservado apresenta uma apoptose celular prematura, e estudos apontam que as mitocôndrias são extremamente sensíveis ao processo, e seu comprometimento funcional resulta em aumento na geração de ROS (ORTEGA FERRUSOLA *et al.*, 2009; PEÑA *et al.*, 2015). Tal fato seria a principal causa do estresse oxidativo nas membranas espermáticas, associado ao esgotamento do sistema antioxidante de defesa, pela remoção de grande parte do plasma seminal, o que leva a uma redução na fertilidade (BAUMBER *et al.*, 2003).

Outro ponto crítico da utilização do sêmen congelado é definir a dose inseminante. As características desejáveis de acordo com o Colégio Brasileiro de reprodução animal (CBRA, 2013) para a dose inseminante de sêmen congelado é de uma motilidade espermática maior ou igual a 30% com vigor maior ou igual a 3 e que tenha uma concentração de 400 milhões de espermatozoides móveis.

Alguns garanhões conseguem obter taxas de prenhez satisfatórias com doses baixas de sêmen congelado, enquanto que garanhões considerados subférteis precisam de uma concentração maior de espermatozoides (PICKETT e SQUIRES, 1987; BRINSKO, 2006). Isso pode ser devido a um conjunto de fatores como: o tipo de égua utilizada, a qualidade do sêmen utilizado (GOVAERE *et al.*, 2014), e as características individuais do sêmen do garanhão (BARBACINI *et al.*, 2005; METCALF, 2005; VIDAMENT, 2005).

Trabalho realizado utilizando vários parâmetros que poderiam afetar a fertilidade demonstraram que a dose espermática não teve efeito na fertilidade. Porém, a qualidade espermática e a interação entre a técnica de inseminação, parâmetros do sêmen e o efeito da égua tiveram efeitos significativos na fertilidade (SIEME *et al.*, 2004). Outro estudo retrospectivo de teses que utilizaram o sêmen congelado considerou os parâmetros de dose, motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides com movimentos rápidos e ao verificar a relação entre os dados o único parâmetro que foi correlacionado com a

fertilidade foi o movimento rápido, ou seja, a dose não influenciou na fertilidade e sim a qualidade espermática (dados não publicados).

Outro efeito importante ao considerar a dose inseminante é o tipo de égua que será utilizada. Os espermatozoides de equinos induzem a cascata do complemento levando a um aumento de C3b e C5a, leucotrienos e prostaglandinas (PG), resultando na quimiotaxia de PMNs no útero (KATILA *et al.*, 2022). Quanto maior a dose de inseminação do sêmen congelado, maior é o processo inflamatório com uma resposta mais intensa e em éguas saudáveis uma resolução mais rápida (CALAZES *et al.*, 2020). No entanto, se a égua for susceptível a endometrite persistente pós-cobertura, recomenda-se a realização com volume menor diminuindo o processo inflamatório (GUVENC *et al.*, 2005). Éguas consideradas susceptíveis têm um período uterino prolongado de resposta inflamatória com acúmulo excessivo de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e líquido intrauterino no útero até 96 horas ou mais após inseminação, prejudicando a sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação (ZENT *et al.*, 1998; CANISSO *et al.*, 2020). A Neutrofilia persistente, acúmulo excessivo de líquido intraluminal e produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias são todas embriotóxicas e levam à diminuição da fertilidade potencial dessas éguas em monta natural ou inseminação artificial (ROBERTSON *et al.*, 2018). As éguas inseminadas no corno uterino com doses menores de sêmen congelado menores acumularam menos líquido intrauterino (GUVENC *et al.*, 2005). A presença de fluido intrauterino reduziu as taxas de prenhez com sêmen congelado (WATSON *et al.*, 2001).

Para aumentar a qualidade espermática e diminuir a dose inseminante, alguns trabalhos têm utilizado gradientes de densidade coloidal pré e pós criopreservação com resultados positivos (SABATINI *et al.*, 2014). Há também a utilização desta técnica com ganhões considerados subférteis melhorando a qualidade espermática do sêmen congelado (GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2023).

2.6. Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação por meio de coloide não é uma técnica nova, ela está sendo utilizada por aproximadamente 27 anos nos procedimentos com o sêmen equino (MEYERS *et al.*, 1995). Os coloides utilizados são a base de partículas de Sílica revestidas. As partículas de sílica não penetram nas membranas celulares. Além disso, a

sílica coloidal não estressa osmoticamente o espermatozoide; e tem baixa viscosidade para não impedir a sedimentação espermática (PERTOFT, 2000). O Percoll é composto de sílica revestida com polyvinyl-pyrrolidone (PVP). Anteriormente o Percoll foi utilizado misturando soluções salinas como o tirodes com lactato, albumina, e piruvato para alcançar diferentes densidades (HOOGHEWIJS *et al.*, 2011). No entanto, algumas soluções de percoll apresentaram endotoxinas nocivas à célula espermática, limitando o uso da centrifugação em gradiente de densidade (MORTIMER, 2000). Em 1990, os coloides de sílica revestidos com silano tornaram-se disponíveis com níveis de endotoxina mais baixos do que sílica revestida com PVP. Esta substância é estável por longos períodos em soluções salinas e podia ser autoclavado se tornando estéril e pronto para uso, dando credibilidade ao produto e o tornando comercial (MORTIMER, 2000; MORREL, 2006).

A centrifugação em gradiente de densidade coloidal baseia-se no princípio de que as células se movem para o local onde corresponde à sua própria densidade, chamada de ponto isopícnico (MORTIMER, 2000). O espermatozoide tem densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, e, portanto, podem ser separados de outros componentes do ejaculado. Além disso, os espermatozoides morfológicamente normais também têm uma densidade ligeiramente maior 1,1g/mL, enquanto um espermatozoide imaturo com problemas de morfologia tem uma densidade menor entre 1,06 e 1,09 g/mL. No final da centrifugação, cada espermatozoide está situado no nível de gradiente que corresponde a sua densidade (MALVEZZI *et al.*, 2014). O plasma seminal permanece na região superior do gradiente. Os espermatozoides móveis se deslocam em direção da força centrífuga e formam um pellet (MORREL, 2006).

Durante a centrifugação o plasma seminal é retido no topo do coloide, enquanto os espermatozoides morfológicamente normais e com motilidade movem-se para baixo através do coloide e formam um pellet (MORREL *et al.*, 2012). Importante adicionar o sêmen em cima do coloide em vez de injetar o coloide abaixo do sêmen por duas razões: primeiro, colocar o sêmen no fundo do tubo permite que espermatozoides não selecionados, bactérias e sujidades revistam o fundo do tubo o que pode contaminar a amostra de espermatozoides que foram selecionadas. Segundo a seleção somente será eficiente se houver uma nítida interface entre o coloide e o sêmen antes da centrifugação. Injetar coloide abaixo do sêmen causa perda de integridade da interface (MORREL *et al.*,

2016). Existem no mercado alguns tipos de gradiente de densidade coloidal como o Equipure™, Androcoll® e Redigrad™ mais utilizados na pesquisa científica com sêmen equino, no entanto, quando se comparou estes gradientes eles não diferiram entre si na qualidade espermática (SABATINI *et al.*, 2014). Nesta revisão, o foco será o gradiente de densidade coloidal Equipure™.

EquiPure™ é uma solução coloidal de partículas de sílica revestidas com silano um gradiente de densidade de camada única espécie-específico para equinos (MACPHERSON *et al.*, 2002). Anteriormente era utilizado em duas camadas top layer (camada superior) e bottom layer (camada inferior), os dois componentes de um gradiente de densidade construíam duas interfaces de densidade contínua. O bottom layer (camada inferior) do EquiPure™ podia também ser usado sem a camada superior para formar uma única camada de filtração de densidade. Edmond *et al.*, (2012) compararam a centrifugação de duas camadas top layer (camada superior) + bottom Layer (camada inferior) gradiente contínuo com a centrifugação de camada única bottom layer gradiente descontínuo este apresentou melhores resultados de motilidade total e progressiva, diminuiu espermatozoides com defeitos de morfologia e aumentou a taxa de recuperação. Estudos realizados anteriormente, relataram valores semelhantes para a taxa de recuperação espermática entre os dois métodos de centrifugação, e também valores semelhantes para motilidade (MORREL *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2011; FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2018). O que levou a utilização da preparação que está disponível no mercado uma solução estéril pronta para uso que consiste em única camada de gradiente de densidade coloidal.

O protocolo padrão recomendado pelo fabricante é que todos os materiais devem estar em temperatura ambiente; diluir o ejaculado 1:1; usar uma pipeta estéril para transferir EquiPure™ para um tubo de centrifugação baseado no v:v; colocar de forma estratificada o sêmen diluído em cima do EquiPure™; centrifugar a 300 xG por 30 minutos em temperatura ambiente; remover cuidadosamente o pellet formado no fundo do tubo; transferir e ressuspender o pellet em 1 mL de diluidor; diluir na concentração espermática desejada. Em sua composição o EquiPure™ utiliza sílica revestida de silano, cloreto de sódio, glicose, piruvato de sódio, EDTA, Cloreto de potássio, lactato, HEPES e H₂O. O HEPES é utilizado para manter o pH da solução. O pH e a osmolaridade das

soluções espermáticas devem ser ajustadas para evitar o choque osmótico. Além disso, HEPES tem um efeito antioxidante (NIDACON, 2012).

Há variação na literatura das forças de centrifugação, estudos anteriores que utilizaram o EquiPure™ para a centrifugação do sêmen antes do congelamento utilizaram 300 xG por 20 min (TEAGUE *et al.*, 2012), 400 xG por 20 min (PAPA *et al.*, 2012). Trabalhos realizados com a centrifugação pós-descongelamento utilizaram 200 xG por 35 min, 300 xG por 30 min, 400xG por 30 minutos com diferentes taxas de recuperação (14%, 22% e 40%, respectivamente) (STOLL *et al.*, 2008; CERNY *et al.*, 2012; PODICO *et al.*, 2020). O manual do fabricante recomenda 300g por 30 minutos (NIDACON, 2012). Um estudo comparou as forças de centrifugação de 200 g por 30 minutos e 300g por 20 minutos do EquiPure™ e verificou que a centrifugação de 200g por 30 minutos com 500×10^6 espermatozoide/mL melhorou a qualidade espermática e a taxa de recuperação dos espermatozoides (TEAGUE *et al.*, 2012). A taxa de recuperação dos espermatozoides após a centrifugação com o coloide de camada única é dependente da qualidade do ejaculado original e está negativamente correlacionada com a concentração espermática (MORREL *et al.*, 2010).

Os tamanhos de tubo já foram comparados em estudos anteriores com gradientes de densidade de camada única. Trabalhos utilizaram tubos 10, 50 e 200 mL, com diferentes concentrações. O tubo de 200 mL foi o que teve maior taxa de recuperação (MORREL *et al.*, 2009). No entanto, muitas das centrífugas utilizadas na prática clínica não acomodam este tipo de tubo. Maiores taxas de recuperação foram detectadas ao centrifugar 1 mL de sêmen (contendo $250-500 \times 10^6$ espermatozoides) em tubos de 15 mL, e a menor taxa de recuperação foi obtida ao centrifugar 4mL de sêmen (contendo $1-2 \times 10^9$ espermatozoides) em tubos de 15 mL. No entanto, quando utilizaram os tubos de 50mL com volume maior que 4 mL ele obteve uma maior taxa de recuperação (60%) do que o tubo de 15 mL (50%). Indicando que valores menores que 4 mL tem maiores taxas de recuperação espermática quando centrifugados em tubos de 15mL, e volumes maiores que 4 mL em tubos de 50mL (EDMOND *et al.*, 2012). Estes estudos basearam-se principalmente no manual do fabricante ou na proporção v:v. Equinos que ejaculam por exemplo 45 mL precisariam de 90 mL de EquiPure™ o que torna a utilização da técnica economicamente restritiva.

A qualidade espermática foi aumentada após o sêmen fresco e refrigerado ser submetido a centrifugação em gradiente de densidade EquiPure™ (MACPHERSON *et al.*, 2002; EDMOND *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2011; EDMOND *et al.*, 2012; MAZIERO *et al.*, 2012; RAMIRES-NETO *et al.*, 2012). Foi utilizado também em sêmen fresco e refrigerado de garanhões sensíveis a este procedimento e obteve aumento na fertilidade (VARNER *et al.*, 2008; MORREL *et al.*, 2011). Porém, outro estudo não demonstrou benefícios na fertilidade pela utilização do EquiPure™ no sêmen fresco e refrigerado de garanhão subfértil (MILES *et al.*, 2013). O EquiPure™ aumentou a taxa de recuperação de embrião do sêmen fresco e refrigerado (PAPA *et al.*, 2013).

O EquiPure™ foi utilizado antes do processo de criopreservação e aumentou a motilidade progressiva e total, integridade de membrana plasmática, alto potencial de membrana mitocondrial e integridade de cromatina (MANCILL *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2012; PAPA *et al.*, 2012). Garanhões considerados subférteis foram submetidos ao processamento com o EquiPure™ antes da criopreservação e conseguiram um aumento da qualidade espermática pós-descongelamento (GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2023).

Trabalhos utilizaram o EquiPure™ pós-descongelamento, e os resultados demonstraram que pode ser usado para melhorar a motilidade total e progressiva, potencial de membrana mitocondrial, estabilidade da membrana, diminuir defeitos de morfologia, diminuir a produção de O₂-• e aumentou a integridade da cromatina (STOLL *et al.*, 2013; CERNY *et al.*, 2012; MANCILL *et al.*, 2011; STOLL *et al.*, 2010; FREITAS-DELL'AQUA *et al.*, 2018). MANCILL *et al.*, (2011) compararam a utilização do EquiPure™ antes ou depois do processo de criopreservação e verificaram melhores resultados com a utilização do EquiPure™ após o descongelamento. MORATÓ *et al.*, 2013 demonstraram um aumento na capacidade de fertilização quando utilizou o EquiPure™ pós-descongelamento. No entanto, outros estudos que também utilizaram o EquiPure™ pós-descongelamento não tiveram aumento na fertilidade (CERNY *et al.*, 2011; CERNY *et al.*, 2012). A centrifugação com gradiente de densidade de camada única pode ser usada também para processar e melhorar a qualidade do sêmen descongelado com baixo teor de contaminação com urina (PODICO *et al.*, 2020).

O ejaculado contém diferentes tipos de células: espermatozoides com morfologia normal e motilidade, espermatozoides com problemas de morfologia, espermatozoides mortos, debris celulares, bactérias e pode conter até mesmo vírus (ORTEGA FERRUSOLA *et al.*, 2009; PONTHER *et al.*, 2013; MORREL *et al.*, 2014). Ortega-Ferrusola *et al.*, (2009) isolaram microrganismos como *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus*, *Corynebacterium spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Klebsiella spp.* no sêmen de equinos antes e depois do congelamento. Após o descongelamento, o crescimento bacteriano foi menor, mas ainda foi detectado. *Klebsiella spp.* foi detectado em garanhão que demonstrou os piores resultados pós-descongelamento. *Klebsiella spp.* e foi correlacionada positivamente com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Microbiana do ejaculado equino pode ser responsável por alguns dos danos subletais após procedimento de congelamento. Estudos utilizando a centrifugação de densidade coloidal no sêmen equino removeu em 90% as bactérias presentes no ejaculado (MORREL *et al.*, 2014). Outros estudos demonstraram que a centrifugação de densidade coloidal removeu o vírus da arterite equina (MORREL *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- 1) Avaliação da utilização modificada do gradiente de densidade EquiPure™ antes e depois da criopreservação do sêmen de garanhão.
- 2) Verificar a taxa de recuperação dos espermatozoides após a centrifugação com EquiPure™.
- 3) Comparar a fertilidade dos tratamentos utilizados em garanhão “bad freezing”

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito da centrifugação em gradiente de densidade EquiPure™ sobre a cinética do sêmen criopreservado de garanhões no momento pós-descongelamento (M0) e depois de ser submetido a estresse térmico a 37°C por 60 minutos (M60).
- 2) Verificar o potencial de membrana mitocondrial (PMM⁺), mudanças na permeabilidade de membrana plasmática, diminuição da formação de ânion superóxido e

peroxidação lipídica no momento pós-descongelamento (M0) e depois de ser submetido a estresse térmico a 37°C por 60 minutos (M60).

REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

AITKEN, R.J.; CURRY, B.J. Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, p. 367–381, 2011.

AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology-Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.17–27, 2014.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105–113, 2005.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O; NETO, C.R. Advances in stallion semen cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.32, p.521-530, 2016.

AMANN, RP, PICKETT, B.W. Principal of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, v.7, p.145–173, 1987.

ARAÚJO, E.A.B.; SILVA, L.F.M.C.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI FM, ANDRADE JUNIOR LRP, SOUZA FF et al. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. **Vet e Zootec**, v.24, n.1, p.70-83, 2017.

AURICH, C., ORTEGA FERRUSOLA, C., PEÑA VEGA, F.J., SCHRAMMEL, N., MORCUENDE, D., AURICH, J. Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions. **Theriogenology**, v.107, p.149-153, 2018.

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2.ed. West Sussex: WileyBlackwell, cap.98, v.1. p.991-995, 2011.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.257-267, 2008.

BATTUT, I. B.; KEMPFER, A.; LEMASSON, N.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 97, p. 186–200, 2017.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.24, p.621-628, 2003.

BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.203–5, 2005.

BRAUN, R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*, v.28, p.10-12, 2001.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., LOVE, C.C., BLANCHARD, T.L., DAY, B.C., WILSON, M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*. v.15, n.63(5), p.1519-27, 2005.

BRINSKO, S.P. Insemination doses: how low can we go? *Theriogenology*, n.66(3), p.543-50, 2006.

BUCC, I. D.; ISANI, G.; SPINACI, M. Comparative immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p.315–322, 2010.

BUCCI, D.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; VALLORANI, C; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. GLUTs and mammalian sperm metabolism. *J Androl*, p.32, n.4, p.348-55, 2011.

BURNAUGH, L.; BALL, B. A.; SABEUR, K.; THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, v.117, n. 3–4, p. 249–260, 2010.

BUSTAMANTE FILHO, I.C. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino. 2006. 77p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CANISSO, I.F.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; FEDORKA, C.E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *Int J Mol Sci*, v.20, p.21(4):1432, 2020.

CARNEIRO, J.A.M.; CANISSO, I.F.; BANDEIRA, R.S.; SCHEEREN, V.F.C.; DELL'AQUA, C.P.F.; ALAVRENHA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR. J.A. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*, v.192, p.107-118, 2018.

CAZALES, N.; ESTRADÉ, M.J.; PEREYRA, F.; FIALA-RECHSTEINER, S.M.; MATTOS, R.C. Sperm transport and endometrial inflammatory response in mares after artificial insemination with cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, v.158, p.180-187, 2020.

CERNY, K.L.; HUGHES, S.; CAMPO, J.R.; TROEDSSON, M.H.T.; SQUIRES, E.L. Fertility of mares inseminated with frozen/thawed semen centrifuged through a single layer density gradient. **J Equine Vet Sci**, n. 31, p.316-317, 2011.

CERNY, K.L.; HUGHES, S.; CAMPOS, J.R.; COLEMAN, R.J.; TROEDSSON, M.H.T.; SQUIRES, E.L. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. **J Equine Vet Sci**, v.32, p.289-91, 2012.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p.534, 2006.

CRESPO, F.; GOSALVEZ, J.; GUTIE´RREZ-CEPEDA, L.; SERRES, C.; JOHNSTON, S.D. Colloidal Centrifugation of Stallion Semen Results in a Reduced Rate of Sperm DNA Fragmentation. **Reprod Dom Anim**. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02140.x

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO - Cbra. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª.ed., Belo Horizonte: CBRA, 104p, 2013.

DARR, C. R.; CORTOPASSI, G. A.; DATTA, S.; VARNER, D. D.; MEYERS, S. A. Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. **Theriogenology**, v.86, n.5, p.1382–1392, 2016.

EDMOND, A.J.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; TEAGUE, S.R.; VARNER, D.D. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. **Theriogenology**, v.77, n.5, p.959-966, 2012.

FERRAMOSCA, A., ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.

FERRUSOLA, C.O.; FERNÁNDEZ, L.G.; SANDOVAL, C.S.; GARCÍA, B.M.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.458–465, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, 2000.

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

FREITAS-DELL’AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O.; CANISSO, I.F.; DELL’AQUA JUNIOR, J.A. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. International Equine Reproduction Symposium, Cambridge UK. **J. Equi. Vet. Scie**. 66, 57, 2018.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M; STOUT, T.A.E; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.249-65, 2001.

GAUTIER, C., AURICH, J., KAPS, M., OKADA, C. T., WAGNER, L. H., MELCHERT, M., AURICH, C. Re-stimulation of testicular function in GnRHvaccinated stallions by daily GnRH agonist treatment. *Theriogenology*, v. 194, p. 27-34, 2022.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Recent Developments in Stallion Semen Preservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.43, p.29–36, 2016.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445–457, 2005.

GOVAERE, J.L.; HOOGEWIJS, M.K.; DE SCHAUWER, C.; DE VliegHER, S.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; DE KRUIF, A. Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. **Reprod Domest Anim**, v.49(3), p.487-91, 2014 doi: 10.1111/rda.12316. Epub 2014 Apr 19. PMID: 24750451.

GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P; MONTEIRO, G. A; LISBOA, F. P; PAPA, F. O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 4., 2012, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: ISABR, 2012. p. 17-20.

GÜVENC, K.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. **Theriogenology**, v.63(9), p.2504-12, 2005.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; FERNÁNDEZ, S.; CRESPO, F.; GÓSSALVEZ, J.; SERRES, C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure. **Anim Reprod Sci**, v.124, p.85–89, 2011.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; FERNÁNDEZ, A.; CRESPO, F.; RAMÍREZ, M.Á.; GOSÁLVEZ, J.; SERRES, C. The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. **Acta Vet Scand**, v.5, p.54-72, 2012.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; CRESPO, F.; BLAZQUEZ, J.C.; SERRES, C. Optimization of the Equine-Sperm Freeze Test in Purebred Spanish Horses by Incorporating Colloidal Centrifugation. **Animals**, v.13, p.382, 2023.

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

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. E. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 2: Changes

in Spermatid Organelles Associated with Development of Spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p.279-319, 2010.

HOOGEWIJS, M., MORRELL, J.M., VAN SOOM, A., GOVAERE, J., JOHANNISSON, A., PIEPERS, P., DE SCHAUWER, C., DE KRUIF, A., DE VliegHER, S. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase post thaw sperm quality in stallions. **Equine Vet J**, v.43(suppl. 40), p.35-41, 2011.

HOOGEWIJS, M.; MORRELL, J.M.; VAN SOOM, A.; GOVAERE, J.; JOHANNISSON, A.; PIEPERS, P. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase post thaw sperm quality in stallions. **Equine Vet J**, v.4(Suppl 40), p.35-41, 2014.

JEANNERAT, E.; JANETT, F.; SIEME, H.; WEDEKIND, C.; BURGER, D. Quality of seminal fluids varies with type of stimulus at ejaculation. **Sci Rep**, v. 13, n. 7, p. 44339, 2017.

KATILA, T.; FERREIRA-DIAS, G. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. **Animals** (Basel). v.19, n.12(6), p.779, 2022 doi: 10.3390/ani12060779.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601- 614, 1992.

KOMAREK, R.J.; PICKETT, B.W.; GIBSON, E.W.; LANZ, R.N. Composition of lipids in stallion semen. **J Reprod Fertil.**, v.10, p.337-42, 1965.

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

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Anim Reprod Sci**, v.105, n.1-2, p. 119-128, 2008.

MACPHERSON, M.L.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. **Theriogenology**. v.58, p.317–20, 2002.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, 2009.

MALVEZZI, H.; SHARMA, R.; AGARWAL, A.; ABUZENADAH, A.M.; ABU-ELMAGD, M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. **Reprod Biol Endocrinol**, v.12, p.121, 2014.

MANCILL, S.S.; LOVE, C.; BRINSKO, S.; EDMOND, A.J.; FOSTER, M.L.; TEAGUE, S.; WAITE, J.A.; VARNER, D. Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.121, p.208-209, 2010.

MAZIERO, R.R.D.; PAPA, P.M.; HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; DELLÁQUA, JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Effects of single layer density gradient centrifugation on cooled-stored stallion semen. **J Equine Vet Sci**, v.32, n. 8, p.496, 2012.

MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.W.; LUI, I.K.; DROBNIS, E.Z. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. **J Androl**, v.16, p.47-54, 1995.

METCALF, E.S. Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.297–9, 2005.

MILES, J.L.; AMSTALDEN, M.; GOLDING, M.C.; VOGELSANG, M.M. Use of Equipure™ with semen from a subfertile stallion. **J Equine Vet Sci**, v.33, p. 321-399, 2013.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, n.2, p.287-301, 2010.

MOAZAMIAN, R.; POLHEMUS, A.; CONNAUGHTON, H.; FRASER, B.; WHITING, S.; GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R.J. Oxidative stress and human sperm: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. **Molecular Human Reproduction**, v.21, p.502 - 515, 2015.

MORATÓ, R.; SOARES, J.M.S.; ORERO, G.; MOGAS, T.; MIRÓ, J. Pre-selection by double layer density gradient centrifugation improves the fertilising capacity of frozen–thawed, capacitated stallion sperm. **Anim Reprod Sci**, v.139, p.62-68, 2013.

MORRELL JM. Update on semen technologies. **Reprod Domest Anim**, v.41, p.63-7, 2006.

MORRELL, J.M.; GERAGHTY, R.M. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. **Equine Vet J**, v.38, n.3, p.224-9, 2006.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**. v.72, p.879 – 84, 2009.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. **Equine vet. J**, v.42, n.7, p.579-585, 2010.

MORRELL, J.M.; VAN WIENEN, M.; WALLGREN, M. Single Layer Centrifugation Can Be Scaled-Up Further to Process up to 150 mL Semen. **ISRN Vet Sci**,183412, 2012.

MORREL, J. M.; KLEIN, C.; LUNDEHEIM, N.; EROL, E.; TROEDSSON, M. H. T. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.47-53, 2014.

MORRELL, J.M.; NUNES, M.M. Practical guide to single layer centrifugation of stallion semen. **Equine Veterinary Education**, v.30, 2016.

MORTIMER D. Sperm preparation methods. **J Androl**, v.21, p.357-66, 2000.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger princípios da bioquímica. 6a ed. Porto Alegre: Artmed;2014.

NOGUEIRA, B.G.; SAMPAIO, B.F.B.; SOUZA, M.I.L.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Coenzyme Q10 and α -Tocopherol prevent the lipid peroxidation of cooled equine semen. **Reprod Dom Anim**, v.50, p.1003-1010, 2015.

NOGUEIRA, B.G.; PEREIRA, R.R.; BITENCOURT, J.L.; MILAN, B.; REIS, W.V.A.; JUNIOR, M.V.; ACÁCIO, B.R.; SAMPAIO, B.F.B.; SOUZA, M.I.L. Coenzyme Q10 and melatonin protect cryopreserved equine sperm against lipoperoxidation. **Anim Reprod Sci**, v.243, p.107027, 2022.

NORDBERG, J; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1106- 1111, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MURIEL, A.; MACIASGARCIA, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; ALONSO, J. M.; PENA, F. J. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.518–522, 2009.

PAPA, P.M.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; DELLÁQUA, JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N.; PAPA, F.O. Effect of density gradient on sperm parameters of stallion frozen semen. **J Equine Vet Sci**, v.32, p.505, 2012.

PAPA, F.; CARMO, M.; PAPA, P.; DELL'AQUA, J.; ALVARENGA, M. Effect of density gradient selection on embryo recovery rates of fresh and cooled stallion semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, n.1, p. 227, 2013.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, n.2, p. 255-266, 1992.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MURIEL, A.; MACÍAS-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ALONSO, J.M.; PEÑA, F.J. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? **Reprod Domest Anim**, v.44, n.3, p. 518-22, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The Impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.529–537, 2015.

PEÑA, F.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

PEÑA, F.; PLAZA DAVILA, M.; BALL, B.; SQUIRES, E.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The Impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.529–537, 2015

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **J Biochem Biophys Methods**, v.44, p.1–30, 2000.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Procedures for Collection, Evaluation and Utilization of Stallion Semen for Artificial Insemination, Colorado State Univ. **Anim Reprod Lab Bull** No 3, Fort Collins; 1987. p. 51–9.

PODICO, G.; ELLERBROCK, R.E; CURCIO, B.R.; CHEONG, S.H.; LIMA, F.S.; CANISSO, I.F. Single-Layer Colloid Centrifugation as a Method to Process Urine-Contaminated Stallion Semen After Freezing-Thawing. **J Equine Vet Sci**. v.87, p.102910, 2020.

PONTHIER, J.; TEAGUE, S.R.; FRANCK, T.Y.; LA REBIÈRE, G.; SERTEYN, D.D.; BRINSKO, S.P. LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D. D.; DELEUZE, S.C. Effect of non-sperm cells removal with single-layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. **Theriogenology**, v.80, n.9, p.1082-1087, 2013.

RAMIRES-NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; DELFIOL, D.J.Z.; FARRAS. M.C.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWING, F.P.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of different methods for sperm selection on cooled stallion semen. **J Equine Vet Sci**, v.32, p. 509, 2012.

ROBERTSON, S.A.; CHIN, P.Y.; FEMIA, J.G.; BROWN H.M. Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. **J. Reprod. Immunol**, v.125, p.80–88, 2018.

SABATINI, C.; PERRIN, A.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.; ROTA, A.; LOVE, C.C. Effect of density gradient centrifugation with three different media on stallion semen quality. **J Equine Vet Sci**, v.32, n.8, p.516, 2014.

SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**,. v.62(5). p.915-28, 2004.

SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Anim Reprod Sci**, v.107, n.3-4, p.276-292, 2008.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.20–26, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.2-5, 2016.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. **Theriogenology**. v.15 n.81(7), p. 966-73, 2014.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medical Chemistry*, v.8, p.851-862, 2001.

SIKKA, S.C. Andrology Lab corner: role of oxidative Stress and Antioxidants in Andrology an assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, n.1, p. 5-18, 2010.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. **Fort Collins, Bulletin**, n.9, p.01- 38, 1999.

STOLL, A.; LOVE, C.C.; BALL, B.A. Use of a single layer density centrifugation to reduce the number of DNA-damaged sperm and enhance sperm quality in cryopreserved-thawed stallion semen. **Anim Reprod Sci**, v.121S, p. S163–S164, 2010.

STOLL, A.; LOVE, C.C.; BALL, B.A. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved–Thawed Equine. **J Equine Vet Sci**, v.33, n.7, p.547-551, 2013.

STOLL, A.; STEWART, B.; BRUM, A.; LIU, I.; BALL, B. Evaluation of cryopreserved-thawed stallion sperm before and after density gradient centrifugation with silane-coated silica particles (EquiPure™). **Theriogenology**, v.70, p.590-591, 2008.

STOREY, B. T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52(5-6), p. 427–437, 2008.

TEAGUE, S.R.; KORTHANKE, C.M.; HURYCH, D.W.; MCPHEE, A.R.; WILLIAMS, R.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Procedural comparisons for centrifugal fractionation of stallion sperm. **J Equine Vet Sci**, v.32, 516, 2012.

VARNER, D.D.; MS, LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.B.; CARROLL, B.S.; ESLICK, M.C. Semen Processing for the Subfertile Stallion. **J Equine Vet Sci**, v.28, n.11, 2008.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n.6, p.907-917, 1997.

VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Anim Reprod Sci**, p.89, 2005.

ZENT, W.W.; TROEDSSON, M.H.T.; XUE, J.-L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study; **Proceedings of the 40th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**; Baltimore, MD, USA, p. 64–65, 1998.

WATSON, E.D.; BARBACINI, S.; BERROCAL, B.; SHEERIN, O.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G.; NECCHI, D. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. **Theriogenology**, v.1;56(1), p.123-31, 2001. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00548-9. PMID: 11467508.

CAPÍTULO 01

Artigo redigido segundo as normas da Animal reproduction science, ISSN: 1873-2232,
ranqueada como A2 pelo QUALIS-CAPES de 2017

<https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>

O gradiente de densidade coloidal Equipure™ utilizado pré e pós criopreservação de sêmen equino

Pereira, R. R^A, Dell'Aqua Junior, J.A^A...

^A Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

^A São Paulo State university (Unesp), School of veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

Autor correspondente Tel.: +55 67 9868-6471

E-mail: raiza.rocha@unesp.br

RESUMO

O objetivo do trabalho foi verificar a qualidade espermática após utilização de um protocolo modificado de EquiPure™ antes e depois da criopreservação do sêmen equino. Foram utilizados um total de 26 ejaculados de 15 garanhões ($n=26$). Experimento 1, Quatro tratamentos experimentais foram formados: Controle (centrifugação convencional); EG (centrifugação com EquiPure™ antes do congelamento); CT+EG (centrifugação com EquiPure™ após o sêmen ser descongelado); EG+EG (centrifugação com EquiPure™ antes e depois do sêmen ser congelado). No experimento 2 foi realizado o teste de fertilidade utilizando 8 éguas em cross-over inseminadas com garanhão considerado “Bad freezing” congelado seguindo os quatro protocolos de cada tratamento experimental. Para as inseminações oito palhetas de cada tratamento experimental foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos com uma concentração de 100×10^6 espermatozoides por palhetas. Os grupos CT e EG tiveram uma dose fixa de 800×10^6 de espermatozoides. Inseminações foram feitas após a ovulação, mediante deposição profunda do sêmen no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação. A dose inseminante dos grupos CT+EG e EG+EG foram dependentes da recuperação espermática pós-centrifugação (v:v) com EquiPure™ pós-descongelamento ($24,7\% \pm$

0,3, μ :197,6; 44,3 % $\pm$ 0,6, μ :354,4, respectivamente). As análises dos grupos foram realizadas imediatamente após descongelação 37°C por 30 segundos (M0). Todos os grupos foram analisados pós-incubação a 37°C por 60 minutos (M60). No M0 ($P<0,05$) o grupo que utilizou EquiPure™ antes da criopreservação e pós-descongelamento aumentou a motilidade total, motilidade progressiva, rápidos, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática comparada com os outros grupos avaliados. A taxa de concepção por ciclo deste grupo foi aumentada (62,5%, 5/8) quando comparada aos demais grupos (25% 2/8; 25% 2/8; 25% 2/8). Concluiu-se, que a utilização de EquiPure™ antes e depois da criopreservação aumenta a cinética espermática pós-descongelamento do sêmen equino, e que selecionar os espermatozoides antes da criopreservação e pós-descongelamento pode aumentar a taxa de prenhez de garanhão considerado “bad freezing”.

Palavras-chave: Garanhão, EquiPure™, sêmen, congelamento

ABSTRACT

The aim of this study was to verify sperm quality after using a modified EquiPure™ protocol before and after cryopreservation of equine semen. A total of 26 ejaculates from 15 stallions (n=26) were used. Experiment 1, Four experimental treatments were formed: control (conventional centrifugation); EG (centrifugation with EquiPure™ before freezing); CT+EG (centrifugation with EquiPure™ after semen is thawed); and EG+EG (centrifugation with EquiPure™ before and after semen is frozen). In experiment 2, the fertility test was performed using 8 mares in cross-over inseminated with stallion considered “Bad freezing” frozen following the four protocols of each experimental treatment. For the insemination, eight straws from each experimental treatment were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds at a concentration of 100x10⁶ spermatozoa

per straw. The CT and EG groups had a fixed dose of 800×10^6 sperm. Inseminations were performed after ovulation by deep deposition of semen in the ipsilateral uterine horn next to ovulation. The insemination doses of the CT+EG and EG+EG groups were dependent on post-centrifugation sperm recovery (v:v) with EquiPure™ post-thawing ($24.7\% \pm 0.3$, μ :197.6; $44.3\% \pm 0.6$, μ :354.4, respectively). Group analyses were performed immediately after thawing at 37°C for 30 seconds (M0). All groups were analyzed after incubation at 37°C for 60 minutes (M60). At M0 ($P < 0.05$) the group that used EquiPure™ before cryopreservation and post-thawing increased total motility, progressive motility, rapids, mitochondrial membrane potential, and plasma membrane stability compared to the other evaluated groups. The conception rate per cycle of this group was increased (62.5% , $5/8$) when compared to the other groups (25% $2/8$; 25% $2/8$; 25% $2/8$). It was concluded that the use of EquiPure™ before and after cryopreservation increases the post-thawing sperm kinetics of equine semen and that selecting spermatozoa before cryopreservation and post-thawing can increase the pregnancy rate of stallions considered “bad freezing”.

Keywords: EquiPure™, freezing, semen, stallion

1. Introdução

A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia que proporciona grandes vantagens, dentre elas o armazenamento do material genético por tempo indeterminado e a utilização deste em situações como a infertilidade adquirida (enfermidades ou fraturas) e óbito do garanhão (Amann and Pickett. 1987). Durante a criopreservação as células espermáticas são expostas a estresse osmótico e oxidativo o que pode resultar em dano celular, diminuição dos parâmetros de qualidade espermática como a motilidade, a atividade mitocondrial, a estabilidade da membrana celular e a integridade do DNA e

aumento das espécies reativas de oxigênio e apoptose (Oldenhof et al. 2010; Sieme et al. 2015).

A centrifugação com gradientes de densidade coloidal vem sendo utilizada antes da criopreservação ou pós descongelamento para melhorar a qualidade espermática do sêmen equino. Este método separa os espermatozoides com diferentes densidades com base no ponto isopícnico (Mortimer, 2000), selecionando células espermáticas que exibem integridade celular, sem defeitos morfológicos e com motilidade progressiva que migram através do meio coloidal (Alvarenga et al. 2016).

O EquiPure™ é um gradiente de densidade de camada única uma solução coloidal de partículas de sílica revestidas com silano espécie-específico para equinos (Macpherson et al. 2002). As partículas de sílica coloidal não estressam osmoticamente o espermatozoide e tem uma baixa viscosidade para não impedir a migração dos espermatozoides (Pertoft, 2000).

Estudos anteriores demonstram uma melhora na cinética espermática utilizando o EquiPure™ antes ou depois da criopreservação do sêmen equino (Cerny et al. 2012; Gutiérrez-Cepeda et al. 2023). Elimina uma alta proporção de espermatozoides com problemas de morfologia, aumento do potencial de membrana mitocondrial, maior estabilidade da membrana plasmática (Papa et al. 2012; Mancill et al. 2010), diminuiu a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Freitas-Dell'Aqua et al. 2018), bactérias (Morrell et al. 2014), vírus da arterite equina (Morrell et al. 2006) e pode ser utilizado em garanhões com urospermia (Podico et al. 2020). Além disso, aumenta o potencial de fertilidade do sêmen equino, especialmente em garanhões subfértéis (Varner et al. 2008).

O objetivo do trabalho foi verificar a qualidade espermática após utilização de um protocolo modificado de EquiPure™ antes e depois da criopreservação do sêmen equino.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e local de pesquisa

O estudo foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional, sob protocolo nº 0232/2022. Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Foram utilizados um total de 26 ejaculados de 15 garanhões ($n=26$) da raça Mangalarga Marchador, Crioulo, Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês, Paint Horse, Brasileiro de Hipismo e oito éguas mestiças, com idades entre 5 e 20 anos, localizados no município de Botucatu, Estado de São Paulo – Brasil (22°53'09" S; 48°26'42" O). Para o teste de fertilidade realizados 4 ciclos de 8 éguas em um sistema de cross-over.

O processamento e análises do sêmen conduzidos no Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN), pertencente ao Departamento de Cirurgia Animal e Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

2.2 Delineamento experimental

O sêmen foi coletado utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C. As colheitas ocorreram com o auxílio de uma fêmea em cio. As amostras de sêmen mantidas em banho-maria a 37°C foram submetidas à análise das variáveis macroscópicas (volume, aspecto e cor) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração), diluídas em meio a base

de leite desnatado e antibióticos, Botusemen® (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) na concentração de (1:1).

2.2.1 *Experimento 1*

O grupo EquiPure (EG) foi submetido a centrifugação com o gradiente de densidade EquiPure™ (Nidacon, Internacional AB, Mölndal, Sweden) brevemente, foram pipetados 5 mL do gradiente de maior densidade EquiPure™ (camada inferior) dentro de um tubo de ensaio de 50mL e cuidadosamente estratificando o volume de menor densidade (camada superior) à alíquota de (30 mL) de sêmen diluído (Botusemen®) na concentração de 2×10^9 espermatozoides. Os tubos foram centrifugados a $400 \times g$ por 25 min, o sobrenadante descartado e o pellet de sêmen ressuspensionado em diluidor com crioprotetor Botucurio® (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) até obter 100×10^6 espermatozoides/mL.

Grupo controle foi centrifugado por $600 \times g$ em 10 min (Fanem Baby, Guarulhos, São Paulo, Brasil). O sobrenadante descartado e os pellets ressuspensionados em diluidor com crioprotetor Botucurio® (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) até obter 100×10^6 espermatozoides/mL.

Então, 700 milhões de espermatozoides de cada grupo foram preenchidos em 14 palhetas 0,5 mL na concentração de 50×10^6 de espermatozoides (Hoogewijs et al. 2009). Subsequentemente, as palhetas foram refrigeradas 5°C por 20 min em refrigerador com temperatura controlada (Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil), transferidas para uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido mantidas no vapor por 20 min, 6 cm acima do nível de nitrogênio. Após este período, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e armazenadas em raques em um cilindro criogênico a -196°C .

Após o descongelamento a 37°C por 30 segundos, 10 palhetas de cada grupo (5 mL), ou seja, a concentração de 500×10^6 de espermatozoides foram pipetadas em 2mL de

Equipure™ em tubos de 15 mL e centrifugadas a 400 x *g* for 25 min e ressuspensas na concentração de 50 milhões de espermatozoides/mL. Assim, quatro grupos experimentais foram formados: 1. Controle (centrifugação convencional); 2. EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento); 3. CT + EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado); 4. EG + EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser congelado).

2.2.2 Taxa de recuperação

Para verificar a taxa de recuperação após cada procedimento de centrifugação com Equipure™ foi realizada a concentração espermática utilizando uma câmara de Neubauer espelhada sob um microscópio de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss, CarlZeiss®, Munique, Alemanha) com ampliação de 200x. A taxa de recuperação (%) foi calculada baseada nos valores iniciais das concentrações. O grupo EG+EG levou em consideração as duas perdas ocasionadas pela centrifugação com Equipure™ antes da criopreservação e pós-descongelamento.

2.2.4 Experimento 2

Sêmen congelado de um garanhão classificado pós-descongelamento como ‘bad freezing’ (BF) foi usado, de acordo com os critérios de classificação de Hoffman et al. 2011 (Motilidade progressiva < 35%). As avaliações espermática pós-descongelamento de cada grupo estão descritas na tabela 1. Quatro ciclos de 8 éguas (*n*=32) foram usados para comparar a fertilidade entre os grupos. As éguas foram monitoradas diariamente através de ultrassonografia (Pie Medical Falco 100, Nutricell, Campinas, SP, Brasil) até o folículo de 35 mm ser detectado em um dos ovários e um aumento do edema uterino (edema 3) (Mateu-Sánchez et al. 2016). Quando essas condições foram atendidas foi realizado a indução da ovulação com 250 µg (im) de Acetato de Acetato de

Histrelina (Strelin®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). As inseminações foram feitas após a ovulação, inseminação profunda no corno uterino. Para as inseminações oito palhetas foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos com uma concentração de 100×10^6 espermatozoides por palhetas. Os grupos CT e EG tiveram uma dose fixa de 800×10^6 de espermatozoides. A dose inseminante dos grupos controle+equipure e equipure+equipure foram dependentes da recuperação espermática pós-descongelamento e após centrifugação (v:v) com EquiPure™ ($24,7\% \pm 0,3$, μ :197,6; $44,3\% \pm 0,6$, μ :354,4, respectivamente). Diagnóstico de prenhez foi realizado pelo exame ultrassom transretal 15 dias após ovulação, ao ser detectada a vesícula embrionária foi aplicado 5 mg (im) de dinoprost tromethamine (Lutalyse, Nutrivet, Jaguariúna, SP, Brasil) no final do exame.

2.3 Análises espermáticas

As análises espermáticas dos grupos Controle e EG foram analisadas imediatamente após descongelação 37°C por 30 segundos (M0). Os grupos CT+EG e EG+EG foram analisados logo após o procedimento de centrifugação (M0), descrito anteriormente. Todos os grupos foram analisados pós-incubação a 37°C por 60 minutos (M60).

2.3.1 Cinética espermática

Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados através do Sistema computadorizado CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis* (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) medindo 5 campos aleatórios. Para cada amostra, avaliou-se a motilidade espermática total (MT [%]), motilidade espermática progressiva (MP [%]) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP [%]). As configurações do CASA usadas neste estudo são descritas na tabela 1.

211 Tabela 1. Configuração para análise do sêmen da espécie equina.

Features	Setting
Image capture (No. of frames)	30
Cell detection (min cell size)	60 pixels
Defaults (cell size)	3 pixels
Cell detection (min contrast)	30
Progressive cells (STR)	>80%
Progressive cells (VAP)	>70µm/s
Slow cells (static: VAP cutoff)	<30m/s
Slow cells (static: VSL cutoff)	<20m/s
Illumination: intensity	3,600
Illumination: photometer	125
Video source (dark field)	60 Hz
Static intensity gates (min and max)	0.48 and 1.45
Static elongation gates (min and max)	0-97
Chamber-type	Makler1
Temperature	38° C
Field selection	Automatic

212 VAP average path velocity µm/s, VSL velocity straight line µm/s; STR straight %. Hamilton Thorne
 213 Research, Beverly, MA, USA (chamber depth 10.0 µm, stage position 14.3 mm)
 214

215 2.3.2 Citometria de fluxo

216 Para a avaliação espermática por citometria de fluxo será utilizado o equipamento
 217 BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers
 218 de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm (FITC, YOPRO e
 219 C11- BODYPY) e 695/40nm (Iodeto de propidio e MitoSOX Red); vermelho 640-nm,
 220 40 mW com filtro 660/20 nm (MitoStatus Red); e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro
 221 450/50 nm (Hoechst). No mínimo 10.000 células por amostra serão analisadas e os dados
 222 serão avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1. Para tanto, as amostras
 223 serão diluídas em TALP-PVA, segundo Parrish et al. (1988) modificado: 100 mM NaCl,
 224 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%,
 225 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de
 226 sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5 x
 227 10⁶ espermatozoide/mL, suplementado com Hoescht 33342 (7µM; 145333, Sigma) para
 228 a eliminação dos detritos.

Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de YOPRO (YP; Y3603, Life Technologies marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), MitoStatus Red (MST; 564697, BD Pharmingen, potencial mitocondrial) e MitoSOXTM Red (MSR; M36008, Invitrogen, geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial), de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2018). Assim, em uma amostra de 500 μ L de sêmen diluído foram adicionados 25 nM YP, 20 μ M de MST e 2 μ M de MSR, seguido por incubação a 37°C por 20 minutos.

Para a peroxidação lipídica, foi utilizado protocolo de acordo com Guasti et al. (2012), utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, em 500 μ L de sêmen diluído em TALP-PVA foram adicionados 5 μ M de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 μ L de TALP-PVA

2.4 Análises estatísticas

Os resultados das avaliações da qualidade espermática foram avaliados pelo software GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com), e expressos em média e erro padrão. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal das variáveis estudadas. Para as médias obtidas com distribuição normal, utilizou-se teste ANOVA seguida de Tukey e quando não paramétrico teste de Kruskal-Wallis segundo de Dunn. Para análise dos dados gerados da fertilidade foi utilizado modelo de regressão logística multivariada através do software computacional Bioestat 3.0. Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Experimento 1

Os resultados obtidos no (M0) estão presentes na tabela 2. O grupo EG+EG aumentou a motilidade total, motilidade progressiva, rápidos, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática comparada com os outros grupos avaliados. O grupo Controle teve uma diminuição nos parâmetros de motilidade total e rápidos quando comparado com os outros grupos; não diferiu nos parâmetros de motilidade progressiva, estabilidade da membrana plasmática, produção de ânion superóxido e potencial de membrana mitocondrial quando comparado ao grupo EG. O grupo EG não diferiu nos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva do grupo CT+EG. O grupo CT+EG diferiu dos parâmetros de rápidos, estabilidade da membrana plasmática, produção de ânion superóxido, potencial de membrana mitocondrial dos grupos controle e EG. O grupo CT+EG não diferiu do grupo EG+EG na peroxidação lipídica.

Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão médio das avaliações no momento 0 (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático e estabilidade da membrana plasmática, geração de O_2^- mitocondrial, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica por citometria de fluxo dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure™), EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser

Pós-descongelamento (M0)				
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
Motilidade Total (%)	54,2 $\pm$ 2,5 ^c	63,0 $\pm$ 3,2 ^b	66,6 $\pm$ 3,5 ^b	77,9 $\pm$ 3,0 ^a
Motilidade Progressiva (%)	27,1 $\pm$ 2,0 ^c	34,4 $\pm$ 2,3 ^{bc}	40,6 $\pm$ 2,7 ^b	47,64 $\pm$ 2,6 ^a
Espermatozoides Rápidos (%)	34,5 $\pm$ 2,7 ^d	43,9 $\pm$ 3,4 ^c	52,2 $\pm$ 3,6 ^b	61,52 $\pm$ 3,8 ^a
Membrana plasmática estável (%)	32,5 $\pm$ 2,0 ^c	35,2 $\pm$ 2,3 ^c	51,3 $\pm$ 3,2 ^b	59,0 $\pm$ 3,1 ^a
Concentração de O_2^- (%)	66 $\pm$ 2,1 ^a	63,7 $\pm$ 2,3 ^a	45,2 $\pm$ 3,4 ^b	41,3 $\pm$ 3,1 ^b
Alto potencial Mitocondrial (%)	34,9 $\pm$ 2,3 ^c	36,4 $\pm$ 2,3 ^c	50,5 $\pm$ 3,3 ^b	58,8 $\pm$ 3,1 ^a
Peroxidação lipídica (UA)	140 $\pm$ 8,4 ^a	134,1 $\pm$ 7,5 ^{ab}	122,8 $\pm$ 9,4 ^{bc}	117,9 $\pm$ 9,8 ^c

congelado) de 26 ejaculados de 15 garanhões.

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0.05$)

Os resultados obtidos pós-incubação a 37°C por 60 minutos (M60) estão presentes na tabela 3. O grupo EG+EG diferiu dos demais grupos avaliados e aumentou os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, rápidos, alto potencial de membrana mitocondrial, e diminui a produção de O_2^- . O grupo controle não teve diferença do grupo EG nos parâmetros de motilidade total, alto potencial de membrana mitocondrial, produção de O_2^- e peroxidação lipídica. O grupo EG teve diferença do grupo controle na motilidade progressiva e rápidos. O grupo CT+EG diferiu do controle na motilidade total e progressiva, rápidos e peroxidação lipídica. O grupo CT+EG diferiu do EG na motilidade progressiva e rápidos. Controle, EG e CT+EG não diferiram no alto potencial de membrana mitocondrial e produção de O_2^- . Os grupos não diferiram na estabilidade da membrana plasmática.

Tabela 3. Média $\pm$ erro padrão médio das avaliações no momento 60 minutos pós-incubação à 37°C (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático e estabilidade da membrana plasmática, geração de O_2^- mitocondrial, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica por citometria de fluxo dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure™), EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser congelado) de 26 ejaculados de 15 garanhões.

Pós-descongelamento (M60)				
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
Motilidade Total (%)	30,3 $\pm$ 2,3 ^c	38,4 $\pm$ 3,2 ^{bc}	52,6 $\pm$ 3,9 ^b	63,8 $\pm$ 3,9 ^a
Motilidade Progressiva (%)	12,4 $\pm$ 1,5 ^d	17,1 $\pm$ 1,4 ^c	28,3 $\pm$ 2,6 ^b	35,5 $\pm$ 2,7 ^a
Espermatozoides Rápidos (%)	16,2 $\pm$ 1,2 ^d	20,5 $\pm$ 1,5 ^c	35,4 $\pm$ 3,4 ^b	45,9 $\pm$ 3,5 ^a
Membrana plasmática estável (%)	22,8 $\pm$ 1,9 ^a	22,7 $\pm$ 1,9 ^a	24,9 $\pm$ 2,7 ^a	30,1 $\pm$ 3,3 ^a
Concentração de O_2^- (%)	79,0 $\pm$ 1,8 ^a	76,0 $\pm$ 2,0 ^a	74,1 $\pm$ 2,8 ^a	62,8 $\pm$ 3,1 ^b
Alto potencial Mitocondrial (%)	20 $\pm$ 1,5 ^b	19,9 $\pm$ 1,7 ^b	25 $\pm$ 2,7 ^b	33,6 $\pm$ 2,7 ^a
Peroxidação lipídica (UA)	189,1 $\pm$ 10,5 ^a	171,9 $\pm$ 9,8 ^{ab}	155,8 $\pm$ 8,9 ^{bc}	150,1 $\pm$ 9,0 ^c

Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$)

O grupo controle diferiu de todos os grupos testados tendo a maior taxa de recuperação espermática (tabela 4). O grupo EG diferiu do grupo CT+EG, EG+EG. CT+EG e EG+EG não diferiram.

Tabela 4. Média $\pm$ erro padrão médio da taxa de recuperação (TXR, %) pós-centrifugação com o gradiente de densidade coloidal EquiPure™.

Taxa de recuperação				
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
TXR (%) [*]	100 $\pm$ 0 ^a	52,7 $\pm$ 1,5 ^b	34,9 $\pm$ 2,2 ^c	30,1 $\pm$ 1,5 ^c

Valores com sobrescritos diferentes (a,b) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$). (*). Considerando a concentração inicial de 2×10^9 .

3.2 Experimento 2

As partidas de sêmen foram avaliadas e os resultados distribuídos na tabela 5. O grupo controle não diferiu do grupo EG nos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e teve a maior taxa de recuperação espermática quando comparado aos demais grupos testados. O grupo equipure teve maior porcentagem de espermatozoide com movimento rápido e maior taxa de recuperação espermática quando comparada ao grupo controle + equipure e equipure+ equipure. O grupo equipure + equipure teve maior motilidade progressiva quando comparado aos demais grupos e não diferiu do grupo controle+ equipure na motilidade total, espermatozoides rápidos e na taxa de recuperação.

Tabela 5. Média $\pm$ erro padrão das avaliações das partidas utilizadas na inseminação no momento 0 (M0) da cinética espermática (motilidade total, progressiva e espermatozoides rápidos) pela análise computadorizada do movimento espermático dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure™), EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser congelado) de garanhão “Bad freezing” utilizado na inseminação.

Pós-descongelamento (M0)				
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
Motilidade Total (%)	53 $\pm$ 6,1 ^a	58,8 $\pm$ 6,3 ^a	61,3 $\pm$ 7,0 ^{a,b}	67,3 $\pm$ 5,8 ^b
Motilidade Progressiva (%)	20 $\pm$ 1,7 ^a	25,5 $\pm$ 1,8 ^a	27,5 $\pm$ 1,4 ^a	35,1 $\pm$ 0,7 ^b
Espermatozoides Rápidos (%)	29,1 $\pm$ 4,1 ^a	37,3 $\pm$ 3,8 ^b	39,1 $\pm$ 3,8 ^b	45 $\pm$ 5 ^c
Taxa de recuperação (TXR, %)*	100	48 $\pm$ 1	24,7 $\pm$ 0,3	21,3 $\pm$ 0,3

(*) Considerando a concentração inicial de 2×10^9

As taxas de recuperação espermática pós-descongelamento e após a centrifugação com Equipure™ considerando a concentração de 800×10^6 está descrita na tabela 6.

Tabela 6. Taxa de recuperação espermática pós-descongelamento e após a centrifugação com Equipure™ considerando a concentração de 800×10^6 de cavalo “Bad freezing” dos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure™), EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento), CT+EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado) e EG+EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser congelado). Média da dose de inseminação móveis (valor calculado de acordo com a motilidade total). Média da dose de inseminação progressivo (valor calculado de acordo com a motilidade progressiva).

Taxa de recuperação (TXR, %)				
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
Taxa de recuperação (TXR, %)	100	100	24,7 $\pm$ 0,3	44,3 $\pm$ 0,6
Dose de inseminação	800 $\times 10^6$	800 $\times 10^6$	197,6 $\times 10^6$	354,4 $\times 10^6$
Dose de inseminação (Móveis)	424 $\times 10^6$	470 $\times 10^6$	121,3 $\times 10^6$	238,5 $\times 10^6$
Dose de inseminação (progressivos)	160 $\times 10^6$	204 $\times 10^6$	55 $\times 10^6$	124 $\times 10^6$

A taxa de concepção por ciclo foi aumentada do grupo EG+EG quando comparada aos demais grupos (tabela 7). Os grupos controle, EG e CT+EG não tiveram diferenças.

Tabela 7. Taxa de concepção por ciclo (TF, %) do sêmen congelado de um garanhão submetido aos grupos Controle (sem centrifugação com Equipure™); EG (centrifugação com Equipure™ antes do congelamento); CT + EG (centrifugação com Equipure™ após o sêmen ser descongelado); EG + EG (centrifugação com Equipure™ antes e depois do sêmen ser congelado).

	Fertilidade			
	Controle	EG	CT+EG	EG+EG
TF (%)	25(2/8) ^b	25 (2/8) ^b	25(2/8) ^b	62,5 (5/8) ^a
Ciclos/Prenhez	4/1	4/1	4/1	2/1

Valores com sobrescritos diferentes (a,b) na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

4. Discussão

A centrifugação em gradiente de densidade coloidal baseia-se no princípio de que as células se movem para o local onde corresponde à sua própria densidade, chamada de ponto isopícnico (Mortimer, 2000). O espermatozoide tem densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, e, portanto, podem ser separados de outros componentes do ejaculado. Os espermatozoides com morfologia normal e móveis se deslocam em direção da força centrífuga e formam um pellet (Morrel, 2006; Morrel et al. 2012). Os grupos que passaram pelo tratamento com Equipure™, melhoraram os parâmetros de qualidade espermática como motilidade total, progressiva, rápidos, potencial de membrana mitocondrial e diminuição da produção de ânion superóxido. A motilidade espermática pós-descongelamento está correlacionada positivamente com a fertilidade (Vidament et al. 2005; Battut et al. 2017). Demonstrando que esta técnica seleciona os espermatozoides de melhor qualidade e incluem a redução das características espermáticas não compensáveis que podem impactar negativamente na fertilidade.

Os espermatozoides de garanhão diferem das outras espécies, pois suas principais demandas de energia são atendidas pela fosforilação oxidativa e, na presença de inibidores mitocondriais, eles sofrem um rápido declínio no conteúdo de ATP. Essa dependência resulta em uma relação inversamente proporcional entre a produção de

EROs (espécies reativas de oxigênio) e a fertilidade no garanhão (Gibb et al. 2014). O espermatozoide criopreservado apresenta uma senescência prematura, e estudos apontam que as mitocôndrias são extremamente sensíveis ao processo, e seu comprometimento funcional resulta em aumento na geração de EROs (Ortega-ferrusola et al. 2009; Peña et al. 2015). Tal fato seria a principal causa do estresse oxidativo nas membranas espermáticas, associado ao esgotamento do sistema antioxidante de defesa, pela remoção de grande parte do plasma seminal, o que leva a uma redução na fertilidade (Baumber et al. 2013). Verificamos neste trabalho que a utilização do Grupo equipure+equipure selecionou espermatozoides com menor produção de ânion superóxido, a primeira EROs formada durante a fosforilação oxidativa.

A criopreservação diminui a porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial principalmente de garanhões considerados “Bad freezing” e o descongelamento do sêmen aumenta a porcentagem de células com alto nível de $O_2^{\bullet -}$ (Yeste et al. 2014). As correlações entre o potencial de membrana mitocondrial e produção de EROS sugerem que um alto potencial de membrana mitocondrial está associado com baixa produção dos subprodutos metabólicos $O_2^{\bullet -}$ e peróxido de hidrogênio (Morrel et al. 2016). Estudo anterior utilizando EquiPure™ pós-descongelamento teve maior potencial de membrana mitocôndria e menor produção de $O_2^{\bullet -}$, demonstrando que a centrifugação de gradiente de densidade pode ser usada não só para selecionar espermatozoides com a melhor motilidade, mas também células que tenham uma melhor resposta ao estresse oxidativo (Freitas-Dell’aqua et al. 2018). Este resultado também foi demonstrado neste estudo, principalmente o grupo EG+EG. Uma alta proporção de espermatozoides com alto potencial mitocondrial potencial foi considerada correlacionado com a fertilidade em inseminações de garanhões (Johannisson et al. 2014).

A estabilidade de membrana plasmática foi aumentada pelos grupos controle + equipure e equipure+equipure no momento 0, mas no momento M60 não teve diferenças entre os grupos, estudo anterior também teve o mesmo resultado utilizando gradiente de densidade coloidal (Johanisson et al. 2009). Segundo Peña et al. (2015), a mitocôndria é mais sensível ao choque osmótico do que a membrana plasmática, resultado mostrado por este experimento. Além disso, a estabilidade de membrana plasmática tem uma correlação baixa com a fertilidade (Battut et al. 2017).

O grupo equipure não teve diferença com o grupo controle na motilidade progressiva no (M0), mas aumentou a motilidade progressiva no M60, motilidade total e rápidos quando comparado ao controle. Trabalhos anteriores demonstraram que o EquiPure™ antes do congelamento aumentou a motilidade progressiva e total, integridade de membrana plasmática, alto potencial de membrana mitocondrial e integridade de cromatina (Mancill et al. 2010; Gutiérrez-cepeda et al. 2012; Papa et al. 2012). Garanhões considerados subférteis foram submetidos ao processamento com o EquiPure™ antes da criopreservação e conseguiram um aumento da qualidade espermática pós-descongelamento (Gutiérrez-cepeda et al. 2023). O grupo equipure aumentou a taxa de recuperação (52,7%) quando comparado a outro trabalho (40%) utilizando EquiPure™ antes do processo de congelamento (Papa et al., 2012)

Outros trabalhos utilizaram o EquiPure™ pós-descongelamento e os resultados demonstraram um aumento nos parâmetros de motilidade progressiva e total, espermatozoides rápidos, estabilidade da membrana plasmática, aumento do potencial mitocondrial, diminuição da concentração de O_2^- de quando comparados ao controle mesmo resultado encontrado neste estudo (Stoll et al. 2010; Mancill et al. 2010; Cerny et al. 2012; Stoll et al. 2013; Freitas-dell'aqua et al. 2018). Cerny et al. (2012) em seu

experimento também utilizou o EquiPure™ pós descongelamento verificou um aumento na motilidade progressiva, no entanto, no teste de fertilidade (dose 400×10^6 espermatozoides) não ocorreu diferença. Para este experimento a dose de inseminação foi aumentada (800×10^6 de espermatozoides), testado em garanhão considerado 'bad freezing' e também não se encontrou diferenças de fertilidade com o controle. O resultado de fertilidade do grupo controle+equipure pode estar relacionado a baixa recuperação espermática, a quantidade inseminada pode não ser suficiente para uma taxa de prenhez satisfatória. Foi observado que após a centrifugação do controle+equipure de alguns garanhões que tinham baixa qualidade espermática não ocorreu a formação de um pellet normal, este fator também pode ter interferido na recuperação espermática deste grupo. Outro fator que pode ter interferido no resultado é o número limitado de éguas inseminadas (Cerny et al. 2012).

Os grupos controle e equipure não tiveram maiores taxas de prenhez, mesmo com doses mais altas do que os grupos que utilizaram doses menores de sêmen. Os espermatozoides de equinos induzem a cascata do complemento levando a um aumento de C3b e C5a, leucotrienos e prostaglandinas (PG), resultando na quimiotaxia de PMNs no útero (Katila et al, 2022). Quanto maior a dose de inseminação do sêmen congelado, maior é o processo inflamatório com uma resposta anti-inflamatória mais intensa e em éguas saudáveis uma resolução mais rápida (Calazes et al, 2020). No entanto, se a égua for susceptível a endometrite persistente pós-cobertura, recomenda-se a realização com volume menor diminuindo o processo inflamatório. A redução da dose do sêmen congelado pode ser uma alternativa para reduzir resposta inflamatória endometrial (Guvenç et al, 2004, Gomes et al, 2019). Éguas consideradas susceptíveis têm um período uterino prolongado de resposta inflamatória com acúmulo excessivo de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e líquido intrauterino no útero até 96 horas ou mais após

inseminação, prejudicando a sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação (Zent et al, 1998; Canisso et al, 2020). A Neutrofilia persistente, acúmulo excessivo de líquido intraluminal e produção prolongada de citocinas pró-inflamatórias são todas embriotóxicas e levam à diminuição da fertilidade potencial dessas éguas em monta natural ou inseminação artificial (Robertson et al., 2018). As éguas inseminadas no corno uterino com doses menores de sêmen congelado acumularam menos líquido intrauterino (Guvenc et al, 2004).

O processamento com EquiPure™ foi mais eficaz quando aplicado após o sêmen descongelado em vez de antes de congelar, mesmo resultado encontrado por trabalho anterior. Apesar desses efeitos, a viabilidade de aplicar essa abordagem em um programa comercial de criopreservação de sêmen é questionável por causa das perdas significativas do espermatozoide durante essas etapas adicionais de processamento, a taxa de recuperação é menor quando a centrifugação do sêmen através de uma solução de partículas de sílica é realizada após o descongelamento, e não antes do congelamento (Mancill et al. 2010). Trabalhos realizados com a centrifugação pós-descongelamento utilizaram 200g por 35 min, 300g por 30 min com diferentes taxas de recuperação (14% e 22%) (Cerny et al. 2012; Stoll et al. 2013; Podico et al. 2020). Neste trabalho utilizamos 400g x 25 minutos e tivemos uma taxa de recuperação do grupo controle+equipure de 34% e equipure+equipure de 30%, as baixas taxas de recuperação espermática limitam o uso desta técnica a garanhões que tenham baixa qualidade espermática.

A utilização de EquiPure™ antes e depois aumentou a taxa de fertilidade de garanhão considerado “Bad freezing”. Não foi encontrado na literatura um trabalho que tenha utilizado e EquiPure™ para selecionar os espermatozoides antes e depois do congelamento, apenas trabalhos que utilizam antes ou depois do congelamento (Mancill

et al. 2011 e Cerny et al. 2012). Este grupo equipure+equipur pode ter aumentado a taxa de fertilidade pelos resultados encontrados o qual aumentou a motilidade total, motilidade progressiva, rápidos, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática comparado com os outros grupos avaliados no M0. Após incubação por 60 minutos ele aumentou os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, rápidos, alto potencial de membrana mitocondrial e diminui a produção de O_2^- . A taxa de recuperação do grupo EG+EG do garanhão utilizado na inseminação foi a menor quando comparado aos outros grupos, porque empregou-se a concentração inicial (2×10^9) para estimar a real perda de espermatozoide, porém quando comparou-se a taxa de recuperação considerando somente o pós-descongelamento e após centrifugação (v:v) com EquiPure™ a taxa de recuperação foi de aproximadamente ($44,3 \pm 0,6$), maior que o grupo controle+equipure ($24,7 \pm 0,3$), ou seja, inseminamos uma maior concentração de espermatozoides do que o grupo CT+EG, o que pode explicar o resultado da fertilidade do grupo EG+EG.

5. Conclusão

Diante do exposto, concluiu-se, que a utilização de protocolo modificado de EquiPure™ aumenta os parâmetros de qualidade espermática pós-descongelamento do sêmen equino, e que selecionar os espermatozoides antes da criopreservação e pós-descongelamento aumentou a taxa de prenhez de garanhão considerado “bad freezing”.

Referências

- Alvarenga, M.A., Papa F.O., Ramires Neto, C., 2016. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. **32** (3), 521-530. DOI: [10.1016/j.cveq.2016.08.003](https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003)
- Amann, R.P., Pickett, B.W, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine. Vet. Sci.* **7**, 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)

- 516 Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., Camugli, S., 2017. Prediction of
517 the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted
518 motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*. 97,
519 186–200. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2017.04.036](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.036)
- 520 Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003. Reactive oxygen species and
521 cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of*
522 *Andrology*, 24, 621-628. DOI: [10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x)
523
- 524 Canisso, I.F.; Segabinazzi, L.G.T.M.; Fedorka, C.E., 2020. Persistent Breeding-Induced
525 Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to
526 Immunopathogenesis and Pathobiology. *Int J Mol Sci*, 20, 21(4):1432.
- 527
528
- 529 Cazales, N.; Estradé, M.J.; Pereyra, F.; Fiala-rechsteiner, S.M.; Mattos, R.C., 2020.
530 Sperm transport and endometrial inflammatory response in mares after artificial
531 insemination with cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 158, 180-187.
532
533
- 534 Cerny, K.L., Hughes, S., Campos, J.R., Coleman, R.J., Troedsson, M.H.T., Squires, E.L.,
535 2012. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer
536 centrifugation through a colloid. *J Equine Vet Sci* 32, 289-91.
537 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.09.075>
- 538 Edmond, A.J., Brinsko, S.P., Love, C.C., Blanchard, T.L., Teague, S.R., Varner,
539 D.D., 2012. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of
540 equine sperm. *Theriogenology*. 77(5), 959-
541 966. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.002)
- 542 Freitas-Dell'Aqua, C.P., Guasti, P.N., Papa, F.O., Canisso, I.F., Dell'Aqua Junior, J.A.,
543 2018. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen
544 despite high mitochondrial potential. *International Equine Reproduction Symposium*,
545 Cambridge UK. *J. Equi. Vet. Scie.* 66, 57. DOI: [10.1016/j.jevs.2018.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.030)
546
- 547 Gibb, Z., Lambourne, S.R., Aitken, R.J, 2014. The paradoxical relationship between
548 stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction*, 91, 1-
549 10. DOI: [10.1095/biolreprod.114.118539](https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539)
550
- 551 Guasti, P.N., Freitas-Dell'aqua, C.P., Maziero, R.R.D., Monteiro, G.A., Hartwig, F.P.,
552 Lisboa, F.P., Papa, P.M., Papa, F.O, 2012. Lipid peroxidation and generation of hydrogen
553 peroxide from subfertile stallion spermatozoa during storage at refrigeration temperature.
554 In: 39th Annual Conference of the IETS, Hannover. *Reproduction, Fertility and*
555 *Development*. 25, 157. <https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab20>
556
- 557 Gomes, G.M., Crespilho, A.M., Leão, K.M., Jacob, J.C.F, Gomes, L.P.M., Segabinazzi,
558 L.G., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2018. Can sperm selection, inseminating dose and
559 artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares?,
560 *Journal of Equine Veterinary Science*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.010>.
561

Gutiérrez-Cepeda, L., Crespo, F., Blazquez, J.C., Serres, C., 2023. Optimization of the Equine-Sperm Freeze Test in Purebred Spanish Horses by Incorporating Colloidal Centrifugation. *Animals*. 13, 382. <https://doi.org/10.3390/ani13030382>

Gutiérrez-cepada, L., Fernández, A., Crespo, F., Ramírez, M.Á., Gosálvez, J., Serres, C., 2012. The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Vet Scand*, 5, 54-72. DOI: [10.1186/1751-0147-54-72](https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-72)

Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, S., Crespo, F., Gósalvez, J., Serres, C., 2011. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated to the clinical equine sperm processing procedure. *Anim. Reprod. Sci.*124, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.001>

Güvenc, K., Reilas, T., Katila, T., 2003. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology* 63, 2504 –12. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2004.10.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.016)

Güvenc, K.; Reilas, T.; Katila, T., 2005. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, 63(9), 2504-12.

Hartwig, F.P., Lisboa, F.P., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Freitas-dell'aqua, C.P., et al, 2014. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 81(2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.003>

Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., Sieme, H., 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 125,112–118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.001>

Hoogewijs MK, Govaere JL, Rijsselaere T, de Schauwer C, Vanhaesebrouck EM, de Kruif A, De Vlieghe S, 2009: Influence of Technical Settings on CASA Motility Parameters of Frozen Thawed Stallion Semen. *Proceedings of the 55th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Las Vegas, Nevada Dec 5–9, 336– 337.

Johannisson, A., Lundgren, A., Humblot, P., Morrell, J. M., 2014. Natural and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. *Animal* 8, 1706–1714. doi:10.1017/S1751731114001499

Johannisson, A., Morrell, J.M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci.* 116(1-2), 119-28. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.01.008.

- 611 Katila, T., Ferreira-dias, G, 2022. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post
612 Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals (Basel)*. 19, 12(6), 779. doi:
613 10.3390/ani12060779.
- 614 Loomis, P.R., Graham, J.K., 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation
615 in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols.
616 *Anim. Reprod. Sci.* 105, 119–128. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010)
617
- 618 Macpherson, M.L., Blanchard, T.L., Love, C.C., Brinsko, S.P., Varner, D.D., 2002. Use
619 of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in
620 stallions. *Theriogenology*. 58, 317–20. DOI: [10.1016/S0093-691X\(02\)00736-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00736-7)
621
- 622 Mancill, S.S., Love, C.C., Brinsko, S.P., Edmond, A.J., Foster, M.L., Teague, J.A., 2010.
623 Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa.
624 *Anim. Reprod. Sci. Suppl.* 121, 208–209. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.002>
625
- 626 Mateu-Sánchez S, Newcombe JR, Garcés-Narro C, Cuervo-Arango J., 2016. The period
627 of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture
628 influences the subsequent pregnancy rate. *Theriogenology*. 86, 1506-1515. DOI:
629 [10.1016/j.theriogenology.2016.05.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.009)
630
- 631 Morrell, J. M.; Geraghty, R. M., 2006. Effective removal of equine arteritis virus from
632 stallion semen. *Equine vet. J.* 38 (3), 224-229. DOI: [10.2746/042516406776866444](https://doi.org/10.2746/042516406776866444)
633
- 634 Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A-M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. Single-
635 layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of
636 stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*. 72, 879 – 84. DOI:
637 [10.1016/j.theriogenology.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.015)
- 638 Morrel, J. M., Klein, C., Lundeheim, N., Erol, E., Troedsson, M. H. T., 2014. Removal
639 of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*
640 145, 47-53. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.005)
- 641 Morrell, J.M., Nunes, M.M., 2016. Practical guide to single layer centrifugation of
642 stallion semen. *Equine Veterinary Education*, v.30. <https://doi.org/10.1111/eve.12658>
643
- 644 Mortimer, D., 2000. Sperm preparation methods. *J. Androl.* 21, 357– 66.
645
- 646 Oldenhof, H., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., Wolkers, W.F., 2010. Membrane
647 permeability parameters for freezing of stallion sperm by Fourier transform infrared
648 spectroscopy. *Cryobiology*. 61 (1), 115–122. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.002)
649
- 650 Ortega-ferrusola, C., González-fernández, L., Muriel, A., Macías-garcía, B., Rodríguez-
651 martínez, H., Tapia, J.A., Alonso, J.M., Peña, F.J., 2009. Does the microbial flora in the
652 ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reprod Domest Anim*, 44 (3), 518-
653 22. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x)
654
- 655 Papa, P.M., Maziero, R.R.D., Hartwig, F.P., Lisboa, F.P., Dellaqua, J.A., Alvarenga,
656 M.A., Guasti, P.N., Landim-Alvarenga, F.C., Papa, F.O., 2012.

- 657 Effect of density gradient on sperm parameters stallion frozen semen. *J. Equi. Vet.*
 658 *Sci.* 32, 505, 6th ISSR Abstract. DOI: [10.1016/j.jevs.2012.06.078](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.078)
- 659 Peña, F., Plaza Davila, M.; Ball, B.; Squires, E.; Martin Muñoz, P.; Ortega Ferrusola,
 660 C.; Balao da Silva, C., 2015. The Impact of reproductive technologies on stallion
 661 mitochondrial function. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 529–537.
 662 DOI: [10.1111/rda.12551](https://doi.org/10.1111/rda.12551)
- 663 Pertoft, H., 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem.*
 664 *Biophys. Methods.* 44, 1–30. PII: S0165-022X(00)00066-X
- 665 Podico, G., Ellerbrock, R.E., Curcio, B.R., Cheong, S.H., Lima, F.S., Canisso, I.F.,
 666 2020. Single-Layer Colloid Centrifugation as a Method to Process Urine-Contaminated
 667 Stallion Semen After Freezing-Thawing. *J. Equine Vet. Sci.* 87, 102910. DOI:
 668 [10.1016/j.jevs.2020.102910](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102910)
- 669 Robertson, S.A.; Chin, P.Y.; Femia, J.G.; Brown H.M., 2018. Embryotoxic cytokines—
 670 Potential roles in embryo loss and fetal programming. *J. Reprod. Immunol.* 125, 80–88.
- 671 Samper, J.C., Morris, C.A., 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation:
 672 a survey. *Theriogenology.* 49, 895–903. DOI: [10.1016/s0093-691x\(98\)00039-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00039-9)
- 673 Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W.F., 2015. Sperm membrane behaviour during
 674 cooling and cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 50 (3), 20–26. DOI:
 675 [10.1111/rda.12594](https://doi.org/10.1111/rda.12594)
- 676 Squires, E.L., Pickett, B.W., Graham, J.K., Vanderwall, D.K., McCUE, P.M., Bruemmer,
 677 J.E., 1999. Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology*
 678 *Laboratory. Fort Collins, Bulletin*, 9, 901–38.
- 679 Stoll, A., Love, C.C., Ball, B.A., 2010. Use of a single layer density centrifugation to
 680 reduce the number of DNA-damaged sperm and enhance sperm quality in cryopreserved-
 681 thawed stallion semen. *Anim Reprod Sci* 121S, S163–S164. DOI:
 682 [10.1016/j.jevs.2012.08.009](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.08.009)
- 683 Stoll, A.; Love, C.C.; Ball, B.A., 2013. Use of a Single-Layer Density Centrifugation
 684 Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved–Thawed Equine. *J Equine Vet Sci*
 685 33(7), 547–551. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.08.009>
- 686 Tischner, M., 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fertil.* 27,
 687 53–59. PMID: 289832
- 688 Varner, D.D., Love, C.C., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Hartman, D., Bliss, S.,
 689 Carroll, S., Eslick, M., 2008. Semen Processing for the Subfertile Stallion. *J. Equine*
 690 *Vet. Sci.* 28, 677–685. DOI: [10.1016/j.jevs.2008.10.012](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.012)
- 691 Vidament, M., 2005. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of
 692 frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci.* 89, 115–
 693 136. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2005.07.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.003)

Zent, W.W.; Troedsson, M.H.T.; Xue, J.-L., 1998. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study; Proceedings of the 40th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; Baltimore, MD, USA, 64–65.

Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L.G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J.E., Miró, J., 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2):395-407. doi: 10.1111/andr.291