

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS SELEÇÃO
POR CENTRIFUGAÇÃO EM OVIPURE® OU
GRADIENTE DE PERCOLL® DO SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO.**

TACIA GOMES BERGSTEIN

BOTUCATU – SP

Novembro 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS SELEÇÃO
POR CENTRIFUGAÇÃO EM OVIPURE® OU
GRADIENTE DE PERCOLL® DO SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO.**

TACIA GOMES BERGSTEIN

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof Dr. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU – SP

Novembro 2013

TACIA GOMES BERGSTEIN

Qualidade espermática após seleção por centrifugação em Ovipure® ou gradiente de Percoll® do sêmen ovino criopreservado.

Data: 29 de novembro de 2013.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof Dr. Daniel Bartoli de Sousa

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Goiás- Campus Jataí

Aos meus adorados pais, Eduardo e Marta, pelo apoio, incentivo, paciência, cuidado, carinho e por acreditarem na minha capacidade mais que eu própria.

Ao meu amor, Fabrício, por tornar meu período em Botucatu mais colorido e encher a minha vida de amor e alegrias para sempre.

À minha irmã, Laís, por servir de exemplo de profissional que quero ser. Também a ela e ao Renan pela ajuda a qualquer hora, apoio e pelos bons momentos de descontração.

À vocês, que dividiram comigo os ônus desta fase, por tornarem mais fácil esta trajetória e por serem os amores da minha vida, dedico esta dissertação.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Sony Dimas Bicudo, por acreditar no meu potencial, pela dedicação, paciência, ensinamentos infinitos e carinho dispensados a mim. O senhor é um exemplo de profissional e pessoa que quero, e sempre, vou seguir.

À Luana Bicudo por estar totalmente disposta a ajudar, sua presença foi essencial, pelo comprometimento com o trabalho e pela amizade, muito obrigada! Ao Leandro Rodello pelos ensinamentos e experiências divididas além da ajuda na execução da dissertação. À Camila Del Aqua que ajudou prontamente quando precisei.

À minha família, avós, tios, tias, primos e às amigas que levo no coração para toda vida Janaína Hammerschmidt, Bruna De Vitta, Mariana Machado, Ana Augusta Derussi, que torceram por mim e se preocuparam com a realização deste trabalho.

Aos colegas de pós graduação que se tornaram amigos queridos, vocês fizeram esta fase ser inesquecível!

Ao Professor Dr. Romildo Romualdo Weiss, mestre e amigo, obrigada pelas oportunidades, preocupação com a execução do trabalho e incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia como um todo, principalmente ao departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, personificado pelos professores, funcionários e alunos, obrigada pela disponibilidade, recepção e ajuda.

À Alamos Agronegócios, Genética e Part LTDA, empresa da minha vida, que sofreu com a minha ausência mas que será recompensada pela minha dedicação dobrada e eterna gratidão por ser fonte de inspiração constante para meu aperfeiçoamento profissional. À Faculdade Evangélica do Paraná – FEPAR, que despertou em mim o amor pela docência, tornando o objetivo do mestrado mais palpável.

A todos que de qualquer forma contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte desta fase da minha vida, muito obrigada!!!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Trabalho científico 1) - Médias $\pm$ erro padrão da Motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona (PVP), de sêmen ovino criopreservado.....41

Tabela 2 (Trabalho científico 1) - Médias $\pm$ erro padrão da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado (CASA) dos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.....43

Tabela 3 (Trabalho científico 1) - Médias $\pm$ erro padrão do número de espermatozóides, motilidade total (MT), recuperação com e sem considerar a MT dos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.....45

Tabela 1 (Trabalho científico 2) - Valores médios $\pm$ erro-padrão da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo não reagido, membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido, membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido e membrana plasmática lesada e acrossomo reagido, utilizando a combinação de sondas FIT-PSA e IP com leitura em citometria de fluxo, nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.....62

Tabela 2 (Trabalho científico 2) - Valores médios $\pm$ erro padrão da porcentagem de células com cabeça isolada, patologias de cauda e patologias de acrossomo nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da

centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.....64

Tabela 3 (Trabalho científico 2) - Valores médios $\pm$ erro padrão da porcentagem de células viáveis com estabilidade, viáveis sem estabilidade e mortas, utilizando a combinação de sondas M540 e YOPRO1 com posterior leitura em citometria de fluxo, nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.....66

ANEXO 1 - “HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3”.....85

ANEXO 2 - Formulação do diluidor glicina, 5% de gema de ovo e leite (GGL5%) (Rodello et al., 2011).....86

LISTA DE ABREVIACÕES

%RAP – porcentagem de espermatozoides rápidos

µg/mL- microgramas por mililitro

µL – microlitros

µm- micrometros

µm/s – micrometros por segundo

Acro – acrossomo

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça

BCF – frequência de batimento do flagelo

CASA – análise espermática assistida por computador

DIC – diacetado de 6-carboxifluoresceína

DGC – centrifugação em camada descontínua

DNA – ácido desoxirribonucleico

EGGL5% - extrato do meio de glicina, 5% gema e leite

FIT - isotiocianato de fluoresceína

FIV – fertilização *in vitro*

FSC-H - *Forward-Scatter-Cluster-Height*

g- gramas

GGL5% - glicina, 5% gema de ovo e leite

Ho33342 - Hoechst 33342

Hz- Hertz

IA- inseminação artificial

IATF – inseminação artificial em tempo fixo

IP – iodeto de propídio

LIN – linearidade

M540 – merocianina 540

mg/mL- miligramas por mililitro

mL – mililitros

MP íntegra – membrana plasmática íntegra

MP lesada – membrana plasmática lesada

MP- motilidade progressiva

MT – motilidade total

O1 – método de Ovipure[®] com 1mL

O1a – antes da seleção Ovipure[®] 1mL

O1d – após seleção Ovipure[®] 1mL

O4 – método de Ovipure[®] com 4mL

O4a – antes da seleção em Ovipure[®] 4mL

O4d – após seleção em Ovipure[®] 4mL

°C- graus Celsius

P1- método de Percoll[®] com 1mL

P1a - antes da seleção Percoll[®] 1mL

P1d - após seleção Percoll[®] 1mL

P4 – método de Percoll[®] com 4mL

P4a – antes da seleção Percoll[®] 4mL

P4d – após seleção Percoll[®] 4mL

PATO Acro – patologia de acrossomo

PATO Cauda – patologia de cauda

PIV – produção *in vitro*

PNA – aglutinina do *Arachis hypogaea*

PSA - aglutinina do *Pisum sativum*

PVP – polivinilpirrolidona

REC – recuperação espermática

RECMT – recuperação espermática considerando a motilidade total

ROS – espécies reativas do oxigênio

Silica coloidal – PVP- Percoll[®]

Silica coloidal – Silano – Ovipure[®]

SLC – centrifugação em camada única

SSC-H- *Side-Scatter-Cluster-Height*

STR – retilinearidade

VAP – velocidade de trajeto

VCL – velocidade curvilinear

VSL – velocidade progressiva

SUMARIO

INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1-Sêmen ovino congelado e descongelado	16
2- Cinética espermática.....	16
2.1 – Avaliação da cinética espermática	16
3- Membranas espermáticas	20
3.1 – Avaliação da membrana plasmática.....	21
3.2 – Avaliação da estabilidade da membrana plasmática.....	22
3.3 – Avaliação da membrana acrossomal	22
3.4 – Avaliação simultânea	23
4 – Seleção espermática.....	26
4.1- <i>Swim up</i>	26
4.2 – Centrifugação em colóides.....	27
4.2.1- Percoll®	29
4.2.2 – Ovipure®	29
4.2.3 – Sílica coloidal revestida por silano x Percoll®	30
OBJETIVOS	31
TRABALHO CIENTÍFICO 1	32
TRABALHO CIENTÍFICO 2	53
CONSIDERAÇÕES GERAIS	73
CONCLUSÕES FINAIS	78
BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	86
ANEXO 3.....	87
ANEXO 4.....	96

RESUMO

BERGSTEIN, T. G. Qualidade espermática após seleção por centrifugação em Ovipure® ou gradiente de Percoll® do sêmen ovino criopreservado. Botucatu, 2013. 106 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

A diminuição da qualidade espermática após o processo de criopreservação é esperada, porém, por vezes, essa diminuição leva a inutilização de amostras de semen. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de quatro métodos de seleção espermática variando o volume (4mL e 1mL) de duas soluções coloidais comerciais, Percoll® e Ovipure®, nos parâmetros de cinética espermática, aferida em sistema computadorizado, recuperação após a seleção, integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e patologia espermática. Os métodos utilizando Ovipure® apresentaram maior motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e estável e acrossoma não reagido quando comparado aos métodos utilizando o Percoll® e aos controles. Os métodos utilizando Percoll® tiveram recuperação maior em número total e espermatozoides e, com exceção do método utilizando 4mL, foram eficientes em selecionar amostras com maior MT e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e estável e acrossomo não reagido, quando comparados aos controles. Os métodos também foram eficientes em diminuir a porcentagem de células inviáveis e instáveis. O método utilizando 1mL de Ovipure® foi o único eficiente em selecionar amostras com menor incidência de defeitos de acrossoma avaliado em microscopia de contraste de fase, além de diminuir a incidência de espermatozoides com a membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido e aumentar a MT, MP e espermatozoides viáveis e estáveis, sendo este o método sugerido para seleção espermática de semen ovino congelado e descongelado.

ABSTRACT

BERGSTEIN, T. G. Sperm quality after selection by centrifugation on Ovipure® and Percoll® gradient of cryopreserved ovine semen. Botucatu, 2013. 106 pages. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

The decrease in sperm quality after the process of cryopreservation is expected; however, sometimes this reduction leads to the destruction of semen samples. The aim of this study was to evaluate the effect of four methods of sperm selection varying the volume (4mL and 1mL) of two commercial colloidal solutions, Percoll® and Ovipure®, taking into account sperm kinetic parameters measured through a computerized system, recovery after selection, integrity and stability of the plasmatic membrane, integrity of the acrosomal membrane and sperm pathology. The methods using Ovipure® resulted in higher total motility (MT), progressive motility (MP), percentage of sperm with stable and intact plasmatic membranes and unreacted acrosome when compared to the methods using Percoll® and to the controls. The methods using Percoll® resulted in higher recovery in total numbers and sperm and, with the exception of the method using 4mL, were efficient in selecting samples with greater MT and percentage of sperm with stable and intact plasmatic membranes and unreacted acrosome, when compared to the controls. The methods were efficient in decrease percentage of intable and inviable sperm. The method using 1mL of Ovipure® was the only efficient method in selecting samples with lower incidence of acrosome defects evaluated by phase contrast microscopy beyond decreased the incidence os sperm with damage plasmatic membrane and non reacted acro and increased MT, MP and percentage of viable and stable sperm. This one was the suggested method for selecting cryopreserved ovine semen.

INTRODUÇÃO

O ejaculado ovino é composto por população heterogênea de células espermáticas (ALVAREZ et al, 2010), que variam conforme a motilidade, morfologia, integridade das membranas e viabilidade. A criopreservação do sêmen causa injúrias nas células espermáticas que aumentam a população de espermatozoides impossibilitados de fertilizar o oócito (JIMENEZ-RABADAN et al, 2012). Ainda que 40-60% do sêmen ovino permaneça com motilidade, após a descongelação somente 20-30% se mantêm biologicamente intactos. Mudanças nas membranas dos espermatozoides podem não afetar a motilidade, mas diminuir a sobrevivência das células e diminuir ou incapacitar o potencial de fertilização (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os métodos de seleção espermática têm sido usados para selecionar subpopulações espermáticas superiores, esses métodos podem ser aplicados no sêmen fresco ou congelado. O sêmen após selecionado pode ser utilizado nas biotecnologias aplicadas à reprodução, como inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões. A observação no incremento das taxas de produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen selecionado já foi diversas vezes relatada (RHO et al.,2001; SAMARDZIJA et al.,2006; MACHADO et al., 2009). Os métodos de seleção espermática utilizando a centrifugação em sílica coloidal apresentam bons resultados na recuperação de células espermáticas com maior motilidade, viabilidade e maior porcentagem de células morfologicamente normais (JOHANISSON et al., 2009; MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012; BUCCI et al., 2013). Recentemente pesquisas com a técnica de seleção espermática em coluna única de centrifugação têm relatado a eficiência, desta técnica, em selecionar efetivamente espermatozoides de melhor qualidade e tem um tempo de preparação menor quando comparado aos métodos tradicionais de seleção espermática em gradiente descontínuo (JIMENEZ-RABADAN et al., 2012; MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012).

A análise convencional de sêmen usando a microscopia optica vem sendo substituída por métodos mais objetivos como o uso de sondas fluorescentes, citometria de fluxo e a análise espermática assistida por computador (CASA) (HALLAP et al., 2006). O CASA avalia objetivamente o trajeto percorrido por cada células espermática da amostra, e a partir disso

mensura a motilidade total, motilidade progressiva e cinética da amostra. Com a citometria de fluxo é possível contar, examinar e classificar células em uma solução aquosa. Através da citometria de fluxo é capaz medir a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes associados com as células de uma forma imparcial, com inigualável precisão, sensibilidade, rapidez, em um número estatisticamente relevante de células (CORDELLI et al., 2005).

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. A integridade da membrana plasmática é essencial na viabilidade seminal, pois garante a homeostase celular e, consequentemente, mantém a suas características de motilidade e capacidade de fecundação. Os corantes fluorescentes são fluorocromos usados na identificação de condições subcelulares, sejam elas alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula.

REVISÃO DE LITERATURA

1-Sêmen ovino congelado e descongelado

O ejaculado ovino é composto por população heterogênea de células espermáticas (ALVAREZ et al, 2010), que variam conforme a motilidade, morfologia, integridade das membranas e viabilidade. O processo de criopreservação causa perdas de viabilidade dos espermatozóides e, ainda que 40-60% do sêmen ovino permaneça com motilidade após a descongelação, somente 20-30% se mantêm biologicamente intactos. Mudanças nas membranas dos espermatozoides podem não afetar a motilidade, mas diminuir a sobrevivência das células, além de diminuir ou incapacitar o potencial de fertilização (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A célula espermática é composta por uma membrana plasmática externa formada por bicamada lipídica. A fluidez desta membrana é, entre outros motivos, influenciada pela temperatura. Quando é submetida ao decréscimo de temperatura no processo de refrigeração e congelação tende a gelificar e perder sua fluidez (CAMARA & GUERRA, 2011). As taxas de sobrevivência espermática após a descongelação podem ser influenciadas pela formulação do meio diluidor (RODELLO et al., 2011), curvas de refrigeração e congelação, entre outros, porém, sempre haverá uma população de espermatozoides incapaz de fertilizar.

2- Cinética espermática

A motilidade espermática tem sido considerada um dos parâmetros de maior importância para análise da capacidade fecundativa do sêmen (DEL OLMO et al., 2013). Existe forte correlação entre a motilidade espermática e a capacidade dos espermatozoides migrarem através do trato genital feminino até o sítio de fertilização (TSAKMAKIDIS, 2010). A cinética espermática abrange, além da motilidade, o vigor e a direção do movimento espermático, sendo este um parâmetro mais amplo de avaliação.

2.1 – Avaliação da cinética espermática

O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um sistema computadorizado e automático de captura e análise de sucessivas fotos dos

espermatozoides, que, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula. Por esse sistema é possível obter informações mais precisas e acuradas do movimento de cada célula espermática (AMANN & KARTZ, 2004).

As imagens são capturadas por um sistema estroboscópico acoplado a um computador, que digitaliza as imagens, e um software as junta, formando o vídeo. O trajeto é obtido através de marcações de pontos onde a cabeça do espermatozoide está em cada foto. Embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que propulsiona o movimento, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça, porque é tecnicamente mais fácil acompanhar esse movimento do que o do flagelo (AMANN & KATZ, 2004).

Para cada espécie animal, o computador é programado com uma micrometragem mínima e máxima. Neste caso, objetos que tiverem tamanhos dentro da faixa registrada são considerados espermatozoides. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo do mínimo são consideradas parte do fundo (MORTIMER E MAXWELL, 1999).

Depois de identificado o espermatozoide, o *software* une as imagens traçando assim a trajetória de cada célula. As células espermáticas são classificadas quanto ao seu movimento em padrões definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER E MAXWELL, 1999). Para determinar esses padrões são mensuradas várias variáveis:

VAP - Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$): velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme, desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática. É a velocidade da trajetória média do espermatozoide.

VSL - Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$): é a distância, considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória, dividida pelo tempo decorrido.

VCL - velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$): é a distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem. É a velocidade da trajetória real do espermatozoide.

ALH - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm): corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento. A mensuração desse parâmetro está relacionada à capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.

BCF - Frequência de batimentos do flagelo (Hz): determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção.

STR - Retilinearidade (%): é a medida do afastamento médio da trajetória da célula espermática, considerando-se uma linha reta. Calculado pela relação entre $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

LIN - linearidade (%): é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a razão entre $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$.

Meara et al. (2008) avaliaram a relação de diversos testes *in vitro* do sêmen congelado e descongelado e fertilidade *in vivo*. Esses autores utilizaram ejaculados de carneiros com fertilidade conhecida (alta, intermediária e baixa) e tentaram correlacionar com os resultados dos parâmetros cinéticos do CASA. Não houve diferença significativa para os parâmetros cinéticos quando categorizados no grau de fertilidade dos carneiros, porém, os autores relataram uma grande variabilidade das médias de VCL, VAP, VSL, BCF, LIN e STR ($p < 0,001$) entre as replicadas de doses descongeladas.

Freour et al. (2010), ao estudar a evolução dos parâmetros do CASA durante a seleção espermática em sílica coloidal como indicador de fertilidade no sêmen humano, relataram que a proporção de MT e MP, além do ALH, têm efeito diagnóstico da fertilidade do sêmen selecionado, ainda que os mecanismos de tal relação não sejam claros.

Del Olmo et al. (2013) objetivaram examinar o valor diagnóstico dos parâmetros do CASA sobre a fertilidade do sêmen ovino. Neste estudo, os

autores mimetizaram as condições fisiológicas do trato reprodutivo com a incubação do sêmen por duas horas, à 38°C em meio sintético similar ao fluido do oviduto ou em meio para congelação pelo mesmo tempo e temperatura. As amostras de sêmen provenientes de machos com baixa fertilidade apresentaram menor linearidade e velocidades ($P < 0,05$). A VAP ($p = 0,044$; $R^2 = 0,678$), a VCL ($p = 0,027$; $R^2 = 0,745$) e o BCF ($p = 0,006$; $R^2 = 0,852$) apresentaram alta correlação positiva com a fertilidade, porém, esses resultados só foram encontrados após a incubação, pelo período de duas horas, em meio para congelação.

A análise computadorizada de sêmen tem-se mostrado uma boa ferramenta na pesquisa de novos diluidores e crioprotetores seminais, na quantificação de hiperativação e outros tipos de processamento (AMANN & KATZ, 2004).

Mortimer e Maxwell (1999) promoveram a capacitação espermática por meio de *swim up* no meio de capacitação HSO. Em seguida, filmaram a cinética dos espermatozoides e identificaram diferença estatística na cinética espermática quando compararam as amostras controle e capacitadas. Eles definiram células que apresentaram $VCL > 250,0 \mu\text{m}$ e $VSL \leq 100,0 \mu\text{m}$ e $LIN \leq 30\%$ e $ALH_{\text{max}} > 9,0 \mu\text{m}$ em sêmen de ovinos como células hiperativadas.

Bravo et al (2011) analisaram o efeito individual do carneiro e a estação reprodutiva na constituição de subpopulações em ejaculados de carneiros Ile de France. Neste estudo, foi possível subdividir o ejaculado de seis carneiros em cinco subpopulações espermáticas com base nos parâmetros avaliados no CASA, sendo eles: subpopulação 1, constituído por células rápidas, progressivas e não sinuosas ($VCL = 126,41 \mu\text{m/s}$, $STR = 92,87\%$ e $LIN = 86,47\%$); subpopulação 2, espermatozoides progressivos com velocidade moderada ($VCL = 74,74 \mu\text{m/s}$ e $STR = 84,03\%$); subpopulação 3, representada por espermatozoides rápidos, progressivos e sinuosos ($VCL = 130,45 \mu\text{m/s}$, $STR = 76,02\%$ e $LIN = 47,68\%$); subpopulação 4, com células rápidas, porém, não progressivas ($VCL = 128,69 \mu\text{m/s}$ e $STR = 44,09\%$); subpopulação 5, que incluía baixa motilidade, espermatozoides não progressivos e com trajetórias irregulares ($VCL = 36,81 \mu\text{m/s}$ e $STR = 47,04\%$). Não houve influência

significativa da estação reprodutiva nas subpopulações espermáticas e essas subpopulações se mantiveram entre os carneiros. Os autores sugerem que a análise do sêmen e proporção das subpopulações pode ser usada como um método de análise da fertilidade do carneiro.

Ainda que não se saiba ao certo quais características do CASA tem real valor diagnóstico na fertilidade, acredita-se que a motilidade é a característica mais importante do sêmen na habilidade de fertilizar (TSAKMAKIDIS, 2010), sendo a que a linearidade também apresenta correlação com a fertilidade (ARRUDA et al., 2011).

3- Membranas espermáticas

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. A membrana plasmática envolve toda a célula espermática e é formada, quase que inteiramente, por lipídios e proteínas (BORGES et al., 2011). A qualidade espermática está correlacionada com a integridade da membrana plasmática, pois esta membrana não apenas limita a célula mas também tem função nas interações celulares, como por exemplo a ligação do espermatozoide ao epitélio do oviduto ou a penetração da célula espermática no oócito (FOSTER et al., 2011).

Ainda que a membrana plasmática envolva a célula espermática toda, ela é constituída de três compartimentos distintos, a membrana acrossomal externa que envolve todo o acrossomo, a membrana que envolve a porção posterior ao acrossomo na cabeça do espermatozoide e o compartimento que envolve a peça intermediária (MOCÉ & GRAHAM, 2008). O acrossomo é um compartimento espermático preenchido de enzima hidrolíticas, quando a membrana acrossomal se funde à membrana plasmática essas enzimas são liberadas facilitando a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (SILVA & GADELLA, 2006).

Capacitação é um termo coletivo para as mudanças que um espermatozoide sofre quando entra em contato com o trato reprodutivo feminino (HALLAP et al., 2006). As mudanças incluem a reorganização de proteínas de membrana, efluxo de colesterol da bicamada lipídica (HALLAP et al., 2006), com consequente aumento da fluidez da membrana, modulação da

concentração iônica intracelular, aumento da atividade da tirosina quinase e desenvolvimento da motilidade hiperativada. A última alteração sofrida pelo espermatozoide no processo de capacitação é a reação acrossomal, iniciada imediatamente após a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, quando há a fusão entre membrana plasmática e acrossomal externa com posterior liberação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas (ARRUDA et al, 2010).

A desestabilização da membrana plasmática é uma das etapas no processo de capacitação e é necessária para que ocorra o influxo de cálcio, que dá a partida neste processo. Alterações bioquímicas que ocorrem na membrana plasmática durante o resfriamento da célula espermática têm, como consequência, o aumento da permeabilidade da membrana com estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons, que levam a uma desestabilização da membrana e podem causar danos irreparáveis às células (BORGES et al., 2011). Então, a desestabilização de membrana plasmática pode ser um indício do início da capacitação ou de um processo de morte celular, sendo sua quantificação de grande interesse, a fim de obter informações sobre o estado ultraestrutural da célula espermática.

A funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos tem sido monitorados por procedimentos específicos de coloração conhecidos como sondas fluorescentes (ARRUDA et al., 2011). As sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas na avaliação de ultraestruturas presentes nos espermatozoides e têm aumentado o número de técnicas para avaliação do sêmen *in vitro*, tornando esta avaliação mais precisa para predição da fertilidade (DEL OLMO et al., 2013).

3.1 – Avaliação da membrana plasmática

A maioria dos ensaios sobre viabilidade espermática avalia a integridade da membrana plasmática do espermatozoide, classificando como “viável” a membrana plasmática íntegra e como “morta”, quando a membrana plasmática está lesada (MOCÉ & GRAHAM, 2008). Normalmente os testes de integridade

de membrana utilizam sondas fluorescentes impermeáveis à membrana. Aquelas células que forem eficientes em excluir tais sondas são consideradas vivas (SILVA & GADELLA, 2006)

O diacetado de 6-carboxifluoresceína (DIC) é uma sonda fluorescente permeável à membrana plasmática do espermatozoide. Enzimas presentes no citoplasma espermático convertem a molécula de DIC em fluoresceína que emite uma fluorescência verde. O iodeto de propídio (IP) tem afinidade com receptores localizados no DNA. Ele não é permeável à membrana plasmática, porém, quando esta apresenta alguma falha de continuidade, a molécula de IP consegue penetrar na célula e se ligar ao DNA. Quando isso ocorre é emitida uma fluorescência vermelha (HARRISON & VICKERS, 1990; ARRUDA et al., 2011).

O SYBR-14 tem afinidade pelo DNA e é permeável à membrana plasmática íntegra. O YO-PRO-1 também possui afinidade ao DNA, porém, não é permeável à membrana. Essas duas sondas fluorescem em verde (ALVAREZ et al., 2012; MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2012).

O Hoechst 33342 é usado como marcador de células e cora espermatozoides com a membrana intacta. Pode ser usado como marcador celular ou ainda na coloração para exames de morfometria espermática (YANIZ et al., 2012).

3.2 – Avaliação da estabilidade da membrana plasmática

A merocianina 540 (M540) é uma sonda fluorescente, que tem afinidade pelos fosfolipídios da membrana plasmática. Em uma membrana estabilizada, esses fosfolipídios permanecem na parte interior da bicamada lipídica (BORGES et al., 2011), porém, quando há a desestabilização da membrana, parte desses fosfolipídios são expostos, permanecendo livres para a ligação com a M540 (HALLAP et al., 2006). Ao se ligar aos fosfolipídios, a sonda fluoresce em laranja.

3.3 – Avaliação da membrana acrossomal

O isotiocianato de fluoresceína (FIT) tem afinidade por carboidratos presentes na membrana acrossomal externa, sendo que é usado para identificar espermatozoides que já iniciaram a reação acrossomal. Dependendo

da espécie é usada a aglutinina do *Pisum sativum* (ervilha verde; PSA) ou da *Arachis hypogaea* (amendoim; PNA), que são fluorocromos verde que são conjugado ao FIT para possibilitar a visualização da reação (SILVA & GADELLA, 2006; MOCÉ & GRAHAM, 2008; ARRUDA et al., 2010).

3.4 – Avaliação simultânea

A leitura das amostras coradas com sondas fluorescentes pode ser feita em microscópio de fluorescência ou em citometro de fluxo. O microscópio de fluorescência possui uma lâmpada que emite raios ultravioletas com o intuito de excitar as sondas, que, ao serem excitadas, reemitem a fluorescência com comprimentos de onda conhecidos. Embora o uso de sondas fluorescentes por meio de microscopia venha sendo um método para a avaliação espermática, o número de espermatozoides normalmente examinados por análise não excede a 200 (ARRUDA et al., 2011).

Com a citometria de fluxo é possível contar, examinar e classificar células em uma solução aquosa. Essa solução é direcionada a um fluxo linear, onde as células passam individualmente através de um feixe de luz ou laser. Esse feixe excita as sondas fluorescentes ou fluorocromos associadas às células e capta a frequência da luz. O equipamento converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por *softwares* específicos. Através da citometria de fluxo é possível medir a quantidade de uma ou mais sondas fluorescentes, associadas às células de forma imparcial, com inigualável precisão, sensibilidade, rapidez, e em um número estatisticamente relevante de células (CORDELLI et al., 2005).

A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras, clássicas, para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar em torno de 30.000 espermatozoides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição do tempo de preparação requerido pelas outras técnicas fluorescentes (MARTINEZ-PASTOR et al., 2010; ARRUDA et al., 2011). Além disso, é possível a associação de sondas fluorescentes com diferentes funções e o exame da mesma célula para vários componentes

subcelulares, alterando apenas a frequência de excitação do laser (CORDELLI et al., 2005; ARRUDA et al., 2011).

Ao se associar o DIC ao IP, é possível identificar três populações de espermatozoides: os corados em verde, que não possuem a membrana plasmática lesada, por isso são considerados íntegros, os corados em vermelho são identificados como lesados, pois foi possível a penetração da sonda no DNA, e os lesados com acrossoma intacto são corados em verde com o núcleo vermelho (HARRISON & VICKERS, 1990; ARRUDA et al., 2011).

Harrison & Vickers (1990) adaptaram a metodologia de Garner et al. (1986) para avaliação de integridade da membrana plasmática usando o DIC e o IP. Os primeiros autores adicionaram pequenas quantidades de formoldeído à solução com as sondas e amostras de sêmen, com o intuito de imobilizar os espermatozoides. Como resultado, esta metodologia tornou-se mais sensível na avaliação da integridade da membrana plasmática.

Quando o FIT-PSA é associado ao IP é possível a identificação de três subpopulações espermáticas. As células que são coradas em vermelho são identificadas como lesadas e as que colorem em verde sofreram reação acrossomal, sendo que o grau de fluorescência é usado para identificar a quantidade de carboidratos da membrana externa que estão expostos, o que possibilita identificar o grau de reação acrossomal. As células não coradas possuem membrana plasmática intacta e ainda não sofreram reação acrossomal. A desvantagem dessa combinação de sondas é que há necessidade de alternância de lentes pela dificuldade de visualização de células não coradas. Então é possível ainda associar o Hoechst 33342 que identifica as células intactas. (NUR et al., 2010; ALVAREZ et al., 2012; MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2012).

Alvarez et al. (2012) avaliaram a cinética e viabilidade espermática (YO-PRO-1/IP e SYBR-14/IP), além da lesão acrossomal (FIT-PSA/IP) de sêmen ovino congelado em diferentes concentrações (200, 400, 800 e 1600 x 10⁶ espermatozoides/dose). Eles concluíram que congelar sêmen ovino com concentração acima de 400 x 10⁶ espermatozoides por dose afeta negativamente a viabilidade espermática após a descongelação. Eles

sugeriram que esse efeito negativo no sêmen seria resultado do excesso de radicais livres, modificações no metabolismo dos espermatozoides, mudanças no meio resultante de um catabolismo dos produtos e mudanças físicas durante o processo de congelação e descongelação, entre outros.

Ao associar a M540 com a sonda impermeável à membrana plasmática e com afinidade ao DNA espermático, YOPRO-1, é possível avaliar simultaneamente o status de estabilidade da membrana plasmática e a viabilidade seminal (PENÃ et al., 2004). Os espermatozoides corados em verde (YOPRO-1 +) são considerados mortos, os corados em laranja (M540+) estão instáveis e os sem coloração ou corados em azul, quando o Ho33342 é associado, são os espermatozoides estáveis e viáveis.

Hallap et al. (2006) testaram o uso da associação de sondas M540, YOPRO-1 e Hoechst 33342 (Ho33342) na mensuração da estabilidade de membrana plasmática de sêmen bovino congelado, descongelado e submetido à seleção por *swim up*. Esses autores apontaram que espermatozoides com membrana plasmática estável tem maior motilidade, morfologia normal de cabeça e integridade de membrana, e comprovaram a eficiência deste método de coloração para aferição do status de estabilidade da membrana no sêmen bovino congelado e descongelado.

Martinez-Alborcia et al (2012) usaram a associação de M540 e YOPRO1 para avaliar o status de capacitação de sêmen suíno selecionado em SLC antes e após a criopreservação. Como resultado, os autores encontraram menor porcentagem de células espermáticas com membrana desestabilizada no sêmen selecionado em SLC antes da criopreservação, paralelamente a uma menor concentração de ROS intracelular. Como conclusão, esses autores relataram que a menor fluidez de membrana, mensurada pelo M540 e YOPRO1, e menor concentração de ROS indicam que o sêmen selecionado em SLC seria mais resiliente à criocapacitação.

Alguns trabalhos tentam correlacionar os resultados encontrados na citometria de fluxo com a fertilidade do sêmen. Os resultados são controversos e variam muito entre si, porém, é consenso que, ainda que a citometria de fluxo seja capaz de mensurar vários fluorocromos simultaneamente, outros testes

paralelos como a análise da cinética e morfologia espermática são necessários para acessar a capacidade fecundativa do sêmen (GILLIAN et al., 2005; GARCÍA-ALVAREZ et al., 2009; MEARA et al., 2008; DEL OLMO et al., 2013).

4 – Seleção espermática

Os processos de separação espermática têm a capacidade de melhorar a qualidade espermática aumentando a motilidade e viabilidade das amostras selecionadas, além de remover o plasma seminal, crioprotetores, meios diluidores e debris celulares (SAMARDZIJA et al., 2006; BATISTA et al., 2011; ANJA et al., 2013; SJUNNESSON et al., 2013). A seleção espermática promove o aumento da frequência de subpopulações com vantagens qualitativas no sêmen selecionado, com maior motilidade, viabilidade e morfologia normal (DORADO et al., 2011). Ainda há indícios de que as seleções espermáticas diminuem títulos virais de doenças transmitidas através da cópula, como o vírus da artrite equina (MORREL et al., 2013) e o vírus da AIDS (KAKIMOTO et al., 2002). As técnicas de seleção incluem centrifugação em soluções coloidais, *swim up* (MEHMOOD et al., 2009), filtração em lã de vidro (RHO et al., 2001), entre outros.

A utilização de espermatozoides com alta motilidade e membrana plasmática e acrossomal intactas é um passo importante no sucesso de programas de fertilização *in vitro* em diversas espécies (MEHMOOD et al., 2009). Esta vem sendo a aplicação mais frequente das técnicas de seleção espermática. Porém, um ponto limitante no uso desta tecnologia é que há indícios de que os métodos de seleção espermática causam a capacitação precoce, reação acrossomal prematura, aumentam os fenômenos de apoptose dentro da amostra selecionada e apresentam baixos índices de recuperação espermática (BATISTA et al., 2011; MARTI et al., 2006; THYS et al., 2009).

4.1- *Swim up*

O *swim up* é um método amplamente utilizado para preparação de sêmen para FIV (fertilização *in vitro*) com o intuito de limpar e selecionar espermatozoides com maior motilidade e viabilidade. A técnica de *swim up* é usada para mimetizar a seleção espermática durante o transporte de espermatozoides pelo trato reprodutivo feminino (HALLAP et al., 2006). A

seleção é feita pela recuperação de espermatozoides capazes de se deslocar até o sobrenadante da solução que permanece em temperatura de 39°C durante uma hora (PARRISH et al., 1994). Os trabalhos, comparando o método de *swim up* e Percoll®, são controversos. Alguns experimentos com bovinos (PARRISH et al., 1994), bubalinos (MEHMOOD et al., 2009) e ovinos (MARTI et al., 2006) demonstraram a superioridade do método de *swim up* na taxa de clivagem na produção *in vitro* de embriões (PIV), porém, a baixa recuperação de espermatozoides é relatada. Outros autores não encontraram diferença significativa de PIV (produção *in vitro*) entre os métodos (CESARI et al., 2006) ou relataram que o Percoll® foi mais eficiente na PIV quando comparado ao *swim up* (RHO et al., 2001).

4.2 – Centrifugação em colóides

Durante a centrifugação, todos os espermatozoides são alinhados paralelamente à força centrífuga, desta forma, as células que têm movimento progressivo podem se mover até o fundo do tubo de centrifugação mais rapidamente que espermatozoides imóveis ou com baixo vigor (RHO et al., 2001). As soluções de centrifugação são formadas por partículas coloidais revestidas, que formam uma barreira para a passagem dos espermatozoides, limitando o trânsito de células espermáticas defeituosas. Dentre os gradientes de centrifugação os descontínuos (Discontinuous Layer Centrifugation – DLC) possuem duas ou mais soluções com densidades diferentes. Essas soluções devem ser depositadas umas sobre as outras a fim de formar o gradiente de centrifugação. Os produtos mais frequentemente utilizados neste tipo de método são o Percoll® (MEHMOOD et al 2009) e o Puresperm® (DORADO et al, 2013). Alternativamente aos DLC, foram criadas soluções coloidais que formam o gradiente em camada única (Single Layer Centrifugation – SLC). Essas soluções têm a mesma eficiência das DLC em selecionar espermatozoides com melhor qualidade (MORREL et al., 2013) e têm como vantagens serem prontas para o uso, serem espécie-específicas, apresentarem homogeneidade entre as partidas e possibilidade de adaptação para grandes volumes de amostras (THYS et al. 2009; BUCCI et al., 2013; SJUNNESSON et al., 2013). Exemplos de SLC espécie-específicos são o Androcoll-E® (JOHANNISSON et

al., 2009) para equinos, Androcoll-P[®](SJUNNESSON et al., 2013) para suínos e o Ovipure[®] para ovinos.

Thys et al. (2009) selecionaram sêmen bovino congelado e descongelado em Percoll[®] e sílica coloidal, com preparação contínua e descontínua. Eles avaliaram a qualidade espermática *in vitro* e fertilização *in vitro* de oócitos bovinos. Esses autores não encontraram diferenças expressivas entre os tratamentos, mas enaltecem as vantagens do SLC: ser mais rápido na preparação da coluna para centrifugação, pela possibilidade de aumentar o volume da coluna de centrifugação para a seleção de maior volume de sêmen, haver estabilidade da sílica coloidal em soluções salinas e uniformidade das formulações de sílica coloidal, e a possibilidade de autoclavagem da solução, que faz com que diminuam os níveis de endotoxinas.

Jimenez- Rabadan et al (2012) avaliaram o efeito da seleção espermática em SLC de sêmen caprino antes e após a congelação e descongelação. Os parâmetros de motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta e espermatozoides com alto potencial mitocondrial melhoraram no sêmen selecionado após a descongelação, quando comparados às amostras selecionadas antes da congelação ou não selecionadas.

Martinez-Alborcia et al. (2013) demonstrou que, ao selecionar sêmen suíno em SLC antes do congelamento, é possível observar a redução da incidência de espermatozoides com fragmentação de DNA, além da atenuação na geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) durante os processos de congelação e descongelação.

Anja et al. (2013) objetivaram melhorar a qualidade do sêmen equino congelado e descongelado, para isso utilizaram a técnica de seleção em SLC. Esses autores observaram a melhoria da amostra selecionada pela diminuição de lesão de DNA, aumento da motilidade progressiva, aumento da porcentagem de espermatozoides com morfologia normal de cabeça e

aumento da proporção de células com alto potencial mitocondrial e maior viabilidade, quando compararam com o sêmen congelado e descongelado não selecionado.

4.2.1- Percoll®

O Percoll® é uma solução coloidal estéril, formada por partículas de sílica revestidas com polivinilpirrolidona não hidrolisável (PVP) (HISHUMINA & SEKINO, 2004). O uso do Percoll® foi abolido da utilização em reprodução humana assistida, pois foi relatado efeito tóxico desta solução aos espermatozoides (MAKKAR et al, 1999; MENDES et al, 2003).

Existe uma grande variabilidade de metodologias aplicando o Percoll®. Essas metodologias diferem na concentração do coloide, volume de Percoll® utilizado, tempo e intensidade de força *g* de centrifugação. Machado et al (2009) avaliaram o efeito do volume (4mL e 0,8mL) de Percoll®, tempo de centrifugação (20 minutos e 5 minutos) e intensidade de força *g* na centrifugação (700xg e 5000xg) sobre a qualidade de sêmen bovino, desenvolvimento embrionário e sexo dos embriões produzidos *in vitro*. Eles concluíram que reduzir o volume de Percoll®, tempo de centrifugação e aumentar a intensidade da força na centrifugação não alterou significativamente a qualidade espermática, o desenvolvimento embrionário e não alterou a relação macho:fêmea dos embriões produzidos na PIV.

4.2.2 – Ovipure®

O Ovipure® (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suécia) é uma solução iso-osmótica, com partículas de sílica coloidal revestida com silano, e apresenta baixa toxicidade aos espermatozoides. O Ovipure® foi desenvolvido para uso exclusivo em ovinos, porém, não se diferencia muito de outros produtos da mesma empresa, como os específicos para bovinos (Bovipure®), equinos (Equipure®), caprinos (Capripure®) e humanos (PureSperm®). Outras empresas também têm soluções para seleção espermática utilizando a sílica coloidal revestida de silano, como exemplos, é possível citar o Androcoll-E® e

Androcoll-P® (Swedish University of Agricultural Sciences – SLU, Uppsala, Suécia).

Até onde se sabe não existem trabalhos que avaliaram a seleção espermática de sêmen ovino em sílica coloidal revestida por silano.

4.2.3 – Sílica coloidal revestida por silano x Percoll®

Batista et al. (2011) compararam a seleção espermática em Percoll® e Capripure® de sêmen congelado e descongelado de caprinos e relataram que não houve diferença significativa das amostras antes e após as centrifugações, com exceção de um aumento no potencial de mitocôndria e diminuição de integridade de acrossomo. Esses autores não encontraram diferença significativa entre os métodos.

Samardzija et al. (2006) examinaram o efeito de sêmen bovino congelado e descongelado selecionado em Percoll® ou Bovipure® na qualidade *in vitro* do sêmen e produção *in vitro* de embriões bovinos. Estes autores relataram que não houve diferença entre os métodos na avaliação do sêmen, porém, a taxa de clivagem e de blastocistos no 7º dia foi significativamente ($P < 0,05$) maior para o sêmen selecionado em Bovipure®.

Rodriguez- Vilamil et al. (2012) avaliaram motilidade, concentração, morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, além da produção de blastocistos *in vitro* de sêmen bovino congelado e descongelado e sexado ou não sexado selecionado em Percoll® ou Isolate® (sílica coloidal revertida por silano, usando preparação descontínua). Esses autores obtiveram maior recuperação de espermatozoides pelo método Percoll®, porém a integridade de membrana plasmática e produção de blastocistos foram maiores no tratamento com Isolate®.

Esta dissertação está formatada no “Formato Publicação”, neste modelo os trabalhos científicos são considerados elementos textuais e, por este motivo, fazem parte do corpo do texto. O capítulo de considerações gerais contempla a discussão dos achados mais importantes relatados nos dois trabalhos

científicos apresentados e a conclusão geral remete às conclusões finais considerando os resultados de ambos os trabalhos científicos.

OBJETIVOS

Os objetivos pretendidos neste trabalho foram avaliar o efeito de duas soluções comerciais, Ovipure® ou Percoll®, constituídas de sílica coloidal, na seleção espermática de sêmen ovino congelado e descongelado, assim como o efeito da diminuição do volume de solução constituída de sílica coloidal para 1mL e comparar seu efeito ao método tradicional de 4mL e por fim padronizar a metodologia de seleção espermática de sêmen ovino congelado e descongelado em sílica coloidal, identificando o método para seleção de subpopulações qualitativamente superiores nas amostras de semen ovino criopreservado.

TRABALHO CIENTÍFICO 1

Este trabalho será enviado à Animal Reproduction Science

Cinética e recuperação espermática, após seleção por centrifugação em soluções coloidais, do sêmen ovino criopreservado.

“Kinematics and spermatic recuperation after centrifugation selection on colloid solutions of ovine cryopreserved semen.”

Bergstein, T. G.^a; Bicudo, L. C.^a; Rodello, L.^b; Bicudo, S.D.^c.

- a. Pós-graduanda, DRARV¹- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Distrito de Rubião Júnior, s/n - Botucatu/SP. CEP: 18618-970 tacia@onda.com.br
- b. Pós doutorando, DRARV – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP.
- c. Professor, DRARV¹ – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Resumo

O sêmen ovino congelado e descongelado sofre alterações morfofuncionais que impossibilitam ou diminuem a eficiência na fecundação. Os métodos de seleção espermática visam melhorar a qualidade e viabilidade do material fecundante. Quatro métodos de seleção espermática utilizando duas soluções de sílica coloidal revestida por silano (sílica coloidal-silano) ou por polivinilpirrolidona (sílica coloidal-PVP), variando o volume de solução coloidal. Foram testados a cinética espermática no CASA e a recuperação espermática. Os protocolos utilizando sílica coloidal-silano apresentaram maior motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides rápidos (%RAP) quando comparado aos métodos utilizando a sílica coloidal-PVP e às amostras antes da seleção espermática. A sílica coloidal-PVP teve maior recuperação espermática quando comparado à sílica coloidal-silano. Somente o método utilizando 4mL de sílica coloidal-PVP não foi eficiente na seleção de amostras com melhor qualidade quando comparado às amostras analisadas antes da seleção espermática. Os métodos utilizando menores volumes de solução coloidal não diferiram dos métodos de maior volume, sendo a sílica coloidal-silano com 1 mL o método que apresentou os melhores

¹ DRARV – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

resultados. Como conclusão os resultados encontrados no trabalho apontaram a maior eficiência da sílica coloidal-silano em selecionar sêmen ovino congelado e descongelado quando comparado à seleção em sílica coloidal-PVP. O método utilizando 1mL de sílica coloidal-silano foi igualmente eficiente ao método com maior volume, sendo uma alternativa para processar amostras com baixa concentração espermática.

Palavras chave: sílica coloidal, ovino, CASA, seleção, silano

ABSTRACT

Frozen and thawed ovine semen undergo morphofunctional changes that prevent or decrease the efficiency of fertilization. Sperm selection methods have beneficial effects on the selected sperm, improving sperm quality and viability. Four methods of sperm selection were tested using two colloidal silica solutions coated with silane (silica colloid- silane) ou povinilpirrolidone (silica colloid-PVP), varying the volume of colloidal solution. Furthermore, analyses of sperm kinetics in CASA and sperm recovery were carried out. The protocols using silica colloid-silane resulted in greater MT, MP, and %RAP when compared to the methods using silica colloid-PVP and the semen before selection. Silica colloid-PVP had higher sperm recovery when compared to silica colloid-silane. Only the method using 4mL of silica colloid-PVP was not efficient in the selection of best quality samples when compared to the semen before selection. The methods using lower volumes of colloidal solutions did not differ from the methods with higher volumes, being the method with 1mL of silica collois-silane better than the 4mL method. In conclusion the results of the study indicate the superiority of silica colloid-silane in selecting frozen and thawed ovine semen when compared to silica colloid-PVP. The method using 1mL of silica colloid-silane was equally efficient to the standard method and has lower costs, being an interesting alternative to process samples with low sperm concentration.

Keywords: silica colloid, ovine, CASA, selection, silane

1. Introdução

O ejaculado ovino é composto por população heterogênea de células espermáticas (Alvarez et al, 2010), que variam conforme a motilidade, morfologia, integridade das membranas e viabilidade. A criopreservação do sêmen causa injúrias nas células espermáticas podendo aumentar a população de espermatozoides impossibilitados de fertilizar o oócito (Jimenez-Rabadan et al, 2012). Existem diversos métodos de seleção espermática que melhoram significativamente a qualidade do sêmen (Samardzija et al, 2005). Esses métodos separam os espermatozoides do plasma seminal e de diluentes e selecionam as células móveis ou com morfologia normal. A aplicação dessas técnicas é rotineira na fertilização *in vitro* (Mehmood et al, 2009; Alvarez et al, 2010), porém, também, podem ter aplicação considerada importante em programas de inseminação artificial em ovinos (Marti et al, 2006).

Um método bastante usado na seleção espermática é a centrifugação em soluções coloidais em gradientes contínuos (Single Layer Centrifugation-SLC) ou descontínuos (Discontinuous Layer Centrifugation – DLC). A seleção espermática por centrifugação em soluções coloidais tem por princípio que as células espermáticas com motilidade progressiva podem se movimentar através das macromoléculas mais rapidamente que os espermatozoides imóveis ou com baixa motilidade (Rho et al, 2001).

Os DLC são formados por duas soluções com densidades diferentes. Alguns exemplos são o Percoll[®] (Mehmood et al, 2009), o Puresperm[®] (Dorado et al, 2013) e o Bovipure[®] (Samardzija et al 2005). O Percoll[®] é composto por partículas de sílica coloidal (15-30nm de diâmetro) revestidas com polivinilpirrolidona não hidrolisável (PVP) (Samardzija et al, 2005). Algumas partidas de Percoll[®] podem diferenciar entre si e algum efeito endotóxico é encontrado na célula espermática, sendo este o motivo pelo qual o Percoll[®] foi banido do uso em reprodução humana assistida (Makkar et al, 1999; Mendes et al, 2003).

Os SLC possuem apenas uma densidade em toda a coluna de centrifugação, sendo que alguns exemplos são o Androcoll-E[®] e o Ovipure[®]. O SLC apresenta algumas vantagens quando comparado aos DLC, entre elas estão a especificidade das formulações, homogeneidade das partidas, facilidade na

formação do gradiente e mobilidade de volumes, dependendo da amostra a ser selecionada (Sjunnesson et al., 2013). O Ovipure[®] é uma solução iso-osmótica com partículas de sílica coloidal revestida com silano e apresenta baixa toxicidade aos espermatozoides. O Ovipure[®] foi desenvolvido para uso exclusivo em ovinos, porém não se diferencia muito de outros produtos da mesma empresa, como os específicos para bovinos (Bovipure[®]), equinos (Equipure[®]) e humanos (PureSperm[®]).

Estudos em bovinos (Mendes et al, 2003; Samardzija et al, 2005; Thys et al.,2009), equinos (Gutierrez-Cepeda et al.,2011; Morrel et al, 2013; Rodríguez-Villamil et al, 2012), suínos (Bucci et al.,2013; Martinez-Alborcia et al.,2012; Sjunnesson et al., 2013), cães (Hishinuma e Sekine, 2004), caprinos (Jimenez-Rabadan et al.,2012) e humanos (Perez et al., 1997) relataram o incremento da qualidade e viabilidade do sêmen após seleção em SLC ou DLC, porém não há trabalhos que comparem esses dois métodos de seleção espermática em ovinos.

O objetivo deste trabalho foi comparar quatro métodos de seleção espermática variando o volume de duas soluções de sílica coloidal revestidas por silano (Ovipure[®]) ou PVP (Percoll[®]) e seus efeitos na análise da cinética e recuperação espermática de sêmen ovino criopreservado.

2. Material e métodos

2.1. Processamento do sêmen

Foram usadas triplicatas de sêmen congelado e descongelado provenientes de 10 carneiros da raça Dorper. A média de espermatozoides por dose era de $149 \pm 9,41 \times 10^6$, envasados em palhetas de 0,25mL, sendo a diluição feita com meio à base de glicina, 5% de gema de ovo e leite (GGL5%) (Rodello et al., 2011). As doses foram congeladas em equipamento automatizado (TK 3000[®], TK Congelações, Brasil) com curva padrão de congelamento de sêmen ovino “S2P3”. Para descongelação a palheta de sêmen era imersa em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Logo após a descongelação, a observação exata do volume de sêmen era feito através da aferição da coluna de sêmen presente na palheta com auxílio de escala com unidades equivalentes a 10µL. O conteúdo

da palheta era depositado em tubo de fundo cônico, previamente aquecido à 37°C e, a partir desta amostra, eram retiradas alíquotas para as análises espermáticas.

2.2. Soluções e extensores

O Ovipure[®] foi doado pela empresa Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suécia. O gradiente Percoll[®] utilizado no experimento, foi produzido pela empresa Nutricell Nutrientes Celulares LTDA, Campinas, Brasil. As concentração de Percoll[®] utilizadas foram de 90% e 45%.

O extrato do meio glicina, gema e leite (EGGL) foi obtido através da centrifugação do meio GGL5%, sem glicerol (Rodello et al., 2011) a 10000g por 15 minutos a 4°C, adaptado da metodologia de Falleiros et al. (2013). O EGGL5% foi utilizado como clarificador das amostras na análise da cinética espermática

2.2.1 Silica coloidal revestida por silano (Silica coloidal – Silano; Ovipure[®])

Foram preparados dois protocolos utilizando o silica coloidal revestida de silano (Silica coloidal – Silano) (Ovipure[®] - Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suécia), o protocolo O4, seguiu as orientações do fabricante, e o protocolo O1, com volume reduzido, a fim de potencializar o uso do produto.

A preparação para centrifugação O4, foi feita em tubo Falcon^{®2} com capacidade para 15mL, sendo depositados 4mL de solução silica coloidal-silano. Para o segundo protocolo O1, em tubo Eppendorf^{®3} com capacidade para 1,5mL, foi depositado 1 mL da mesma solução. No topo das colunas em ambos os protocolos, foram cuidadosamente dispensados 250 µL de sêmen descongelado. Os tubos foram centrifugados à temperatura fixa de 25°C, por 20 minutos, com intensidade de 300g. Após a centrifugação, o sobrenadante era retirado, permanecendo 750µL do *pellet* decantado para O4 e 200µL do *pellet* decantado em O1. Esse sedimento era ressuspendido em 4250µL(O4) e 1050µL(O1) do EGGL e submetido a 10 minutos de centrifugação, a uma

² BD – Becton Dickison, San José, CA, USA

³ Eppendorf AG – Hamburg, ALE.

intensidade de 500g à 25°C. Em seguida à centrifugação, o sobrenadante era cuidadosamente, retirado, permanecendo o *pellet* de 300µL(O4) e 200µL(O1), que foi homogeneizado e submetido às análises *in vitro*.

2.2.2 Silica coloidal revestida por polivinilpirrolidona (Silica coloidal – PVP; Percoll®)

O gradiente de centrifugação P4 foi preparado em tubo Falcon® de 15 mL, sendo 2 mL do Percoll® 90% foi colocado no fundo do tubo, em seguida, e, cuidadosamente, 2mL do Percoll® 45% foi despejado sobre este, formando assim o gradiente para centrifugação. Para o método P1 foi utilizado tubo Eppendorf® com capacidade de 1,5mL. Foi pipetado 0,5mL do Percoll® 90% no fundo do tubo, seguido de 0,5 mL do Percoll® 45% foi pipetado sobre este, formando assim o gradiente para centrifugação. O volume de sêmen congelado e descongelado de 250µL, com contagem espermática média de 100×10^6 espermatozoides foi, delicadamente, colocado sobre a coluna de Silica coloidal-PVP nos dois métodos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos com intensidade de 900g, em temperatura fixa de 25°C, em seguida, o sobrenadante era retirado, permanecendo 750µL em P4 e 200µL em P1 do *pellet* decantado. Esse sedimento era ressuspendido em 4250µL(P4) e 1050µL(P1) do EGGL e submetido a 5 minutos de centrifugação, a uma força de 300g, à 25°C. Em seguida, o sobrenadante era cuidadosamente retirado, permanecendo o *pellet* de 300µL em P4 e 200µL em P1, que foi homogeneizados e submetidos às análises *in vitro*.

2.5. Análise *in vitro* do sêmen

As análises *in vitro* do sêmen foram realizadas em dois momentos: logo após a descongelação, antes da seleção (O4a,O1a,P4a,P1a) e depois da seleção (O4d, O1d, P4d, P1d).

2.5.1. Cinética espermática

Para avaliação da cinética espermática 10µL do sêmen congelado e descongelado, era diluído em 300µL de EGGL previamente e mantido aquecido a 37°C. Aproximadamente 6µL do sêmen diluído era depositado na câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Selfi-Medical, Haifa, Israel) e esta era

submetida a Análise de Cinética Espermática Assistida por Computador (CASA) em equipamento Hamilton Thorn Motility Analyser – HTMA –IVOS 12 (Hamilton Research – Beverly, MA, USA) . Um campo da câmara era escolhido pelo examinador e dois outros campos da camara eram aleatoriamente escolhidos pelo equipamento e analisados para motilidade total (MT,%), motilidade progressiva (MP,%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, m/s), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Avaliou-se ainda a porcentagem de células com movimento rápido (RAP,%).

O *setup* utilizado foi baseado nas indicações do fabricante obtidas através do manual de uso do equipamento (HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3), sendo que o tamanho da célula era de 5 pixels, intensidade da célula 55, VAP 75 μs , STR 80%, VAP *cutoff* 21,9 μs , VSL *cutoff* 6,0 μs , intensidade de estáticos mínimo 0,25 e máximo 1,5, tamanho de estáticos mínimo 0,6 e máximo 8,0 e elongação de estáticos mínimo 0 e máximo 95. A magnificação foi de 1,95, frequência de vídeo 60 Hz, intensidade de iluminação 2400, fotômetro baixo 73 e alto 125.

2.5.2. Concentração

A concentração espermática foi realizada pela contagem de células em câmara de Neubauer. Logo após a descongelação, a diluição usada foi de 1:400, e após a centrifugação, devido a menor concentração, foi feita na diluição 1:20.

A recuperação de células espermáticas após a seleção em gradientes de sílica coloidal-silano e sílica coloidal-PVP foi estimada de duas maneiras. Na primeira, a recuperação total de células espermáticas (REC), foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{REC} = (\text{Total de espermatozoides após a centrifugação}) / (\text{total de espermatozoides antes da centrifugação}) * 100.$$

Na segunda, a recuperação considerando a motilidade total (RECMT), foi calculada a partir da fórmula:

RECMT= (total de espermatozoides após a centrifugação*motilidade total após a centrifugação) / (total espermatozoides antes da centrifugação*motilidade total antes da centrifugação) * 100.

2.6. Análise estatística

As análises das amostras não foram de ordem pareada. Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com oito tratamentos (O4a; P4a; O1a; P1a; O4d; P4d; O1d; P1d) e dez blocos (reprodutores). Para a análise dos dados foram utilizadas as médias dos valores obtidos nas triplicatas de cada reprodutor. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo método Kolmogorov-Smirnov, sendo utilizado ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, empregando-se o programa GraphPad Prism[®], versão 5.03 para Windows. Nível de significância de $P > 0,05$.

3. Resultados

Os resultados de MT e MP estão descritos na Tabela 1. Os dois resultados da motilidade total (MT) antes da centrifugação em sílica coloidal-silano e sílica coloidal-PVP, nos protocolos com 4mL O4a ($27,0 \pm 3,1\%$), P4a ($27,0 \pm 2,3\%$) e 1mL O1a ($24,3 \pm 1,9\%$), P1a ($24,7 \pm 2,3\%$) não diferiram entre si ($P > 0,05$). Após a seleção espermática, a MT foi maior ($P < 0,05$) nos dois protocolos de centrifugação utilizando sílica coloidal-silano (O4d: $62,0 \pm 4,1\%$; O1d: $64,6 \pm 3,8\%$), sendo que não houve diferença entre os métodos (O4d = O1d).

No protocolo utilizando a solução de sílica coloidal-PVP com 4mL (P4d), não houve diferença ($P > 0,05$) da MT em relação a antes da centrifugação (P4a: $27,0 \pm 2,3\%$; P4d: $30,0 \pm 3,6\%$). Porém, a MT após a centrifugação em coluna de 1mL de sílica coloidal-PVP (P1d: $45,9 \pm 4,3\%$) foi maior ($P < 0,05$) quando comparada às análises antes da seleção (P1a: $24,7 \pm 2,3\%$), no entanto menor que os métodos O4d e O1d (O4d: $62,0 \pm 4,1\%$; O1d: $64,6 \pm 3,8\%$).

Antes da seleção espermática, a motilidade progressiva (MP) não diferiu ($P > 0,05$) entre os grupos (O4a: $18,0 \pm 2,6\%$; O1a: $15,0 \pm 1,6\%$; P4a: $15,0 \pm 1,9\%$; P1a: $15,4 \pm 1,6\%$). Somente as centrifugações em sílica coloidal-silano apresentaram aumento ($P < 0,05$) na MP das amostras (O4d: $42,0 \pm 4,0\%$; O1d: $46,8 \pm 3,0\%$), quando comparadas às amostras antes da seleção. Foi

indiferente o uso de 4 ou 1mL de sílica coloidal-silano para o resultado da MP após a centrifugação ($P>0,05$).

Tabela 1 - Médias $\pm$ erro padrão da motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona (PVP), de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4mL silica coloidal				1 mL silica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
MT (%)	27,0 $\pm$ 3,1 c	62,0 $\pm$ 4,1 a	27,0 $\pm$ 2,3 c	30,0 $\pm$ 3,6 c	24,3 $\pm$ 1,9 c	64,6 $\pm$ 3,8 a	24,7 $\pm$ 2,3 c	45,9 $\pm$ 4,3 b
MP (%)	18,0 $\pm$ 2,6 b	42,0 $\pm$ 4,0 a	15,0 $\pm$ 1,9 b	18,0 $\pm$ 2,9 b	15,0 $\pm$ 1,6 b	46,8 $\pm$ 3,0 a	15,4 $\pm$ 1,6 b	25,1 $\pm$ 2,9 b

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

Os resultados da cinética espermática estão descritos na Tabela 2. No VAP, VCL e ALH não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos antes e após a seleção. O VSL foi menor em P1d, quando comparado à amostra antes da seleção (P1a: $108,6 \pm 3,1 \mu\text{m/s}$; P1d: $88,9 \pm 3,8 \mu\text{m/s}$). O BCF foi menor ($P<0,05$) em P1d e P4d (P1d: $37,6 \pm 0,6\text{Hz}$; P4d: $36,3 \pm 0,7\text{Hz}$), que não diferiram entre si ($P<0,05$) quando comparados às amostras antes da seleção (P1a: $41,7 \pm 0,7 \text{ Hz}$; P4a: $44,1 \pm 1 \text{ Hz}$) e aos tratamentos utilizando sílica coloidal-silano (O1d: $41 \pm 1 \text{ Hz}$; O4d: $41,3 \pm 0,8 \text{ Hz}$).

A %Rap foi maior ($P<0,05$) em O1d ($52,3 \pm 3,3\%$) e O4d ($49,1 \pm 4,2\%$), quando comparados às amostras antes da seleção e aos métodos utilizando o sílica coloidal-PVP. Em P1d ($31 \pm 3,4\%$) houve um aumento ($P<0,05$) da %Rap, quando comparado à de P1a ($17,5 \pm 1,9\%$), porém não diferiu ($P>0,05$) de P4d ($21,3 \pm 3,1\%$) e de P4a ($20,1 \pm 2,2\%$).

Tabela 2 - Médias $\pm$ erro padrão da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado (CASA) dos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4mL sílica coloidal				1 mL sílica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
VAP ($\mu\text{m/s}$)	112,4 $\pm$ 4,6 a	119 $\pm$ 4,2 a	120,5 $\pm$ 4 a	103,7 $\pm$ 3,6 a	114,6 $\pm$ 4,1 a	110,1 $\pm$ 4,2 a	119,4 $\pm$ 2,9 a	105,5 $\pm$ 3,6 a
VSL ($\mu\text{m/s}$)	100,2 $\pm$ 4,5 ab	105,6 $\pm$ 4,4 ab	109,1 $\pm$ 4,2 a	92 $\pm$ 3,8 ab	100,7 $\pm$ 4,2 ab	98,46 $\pm$ 4,2 ab	108,6 $\pm$ 3,1 a	88,99 $\pm$ 3,8 b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	170,6 $\pm$ 6,7ab	176,5 $\pm$ 5,5 ab	182,4 $\pm$ 5,5 ab	155 $\pm$ 5,1 b	171,8 $\pm$ 11,4 ab	160,2 $\pm$ 5,0 ab	183,4 $\pm$ 4,7 a	162 $\pm$ 4,9 ab
ALH (μm)	5,47 $\pm$ 0,2 a	5,46 $\pm$ 0,2 a	7,31 $\pm$ 1,6 a	5,59 $\pm$ 0,2 a	4,95 $\pm$ 0,2 a	5,08 $\pm$ 0,1 a	5,7 $\pm$ 0,1 a	5,7 $\pm$ 0,1 a
BCF (Hz)	44 $\pm$ 0,9 a	41,3 $\pm$ 0,8 a	44,1 $\pm$ 1 a	36,3 $\pm$ 0,7 b	41,8 $\pm$ 0,6 a	41 $\pm$ 1 a	41,7 $\pm$ 0,7 a	37,6 $\pm$ 0,6 b
STR (%)	84,5 $\pm$ 0,8 b	87,9 $\pm$ 0,9 a	82 $\pm$ 2 b	84,4 $\pm$ 1,2 b	83,4 $\pm$ 0,9 b	89 $\pm$ 0,8 a	85 $\pm$ 0,8 b	80,7 $\pm$ 1 b
LIN (%)	57,7 $\pm$ 1,3 ab	58,3 $\pm$ 1,5 ab	60,9 $\pm$ 1,3 a	59,1 $\pm$ 1,3 ab	59,2 $\pm$ 1,2 ab	60,2 $\pm$ 1,3 ab	60,8 $\pm$ 1,2 a	54,9 $\pm$ 1,2 b
% Rap (%)	22 $\pm$ 2,8 bc	49,1 $\pm$ 4,2 a	20,1 $\pm$ 2,2 bc	21,3 $\pm$ 3,1 b	17,3 $\pm$ 1,8 c	52,3 $\pm$ 3,3 a	17,5 $\pm$ 1,9 c	31 $\pm$ 3,4 b

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

VAP – Velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade; %Rap - porcentagem de espermatozoides rápidos; mL-mililitros.

O número de espermatozoides ($N^{\circ}\text{sptz}$) (Tabela 3) antes da centrifugação diferiu entre os protocolos de 4mL e 1mL (O4a, P4a e O1a, P1a) , porém não diferiu dentro do mesmo método ($O4a \cong P4a$ e $O1a \cong P1a$). O $N^{\circ}\text{sptz}$ foi menor ($P < 0,05$) após as centrifugações em todos os métodos, quando comparados às amostras antes da seleção. Não houve diferença significativa no $N^{\circ}\text{sptz}$ após a centrifugação entre os protocolos (O4d,P4d,O1d,P1d).

A recuperação de espermatozoides (REC) foi igual ($P > 0,05$) entre os protocolos dentro do mesmo produto (O4d: $9,1 \pm 1,5\%$ $\cong$ O1d: $4,1 \pm 0,3\%$ e P4d: $16,2 \pm 2,1\%$ $\cong$ P1d: $14,5 \pm 1,4\%$), porém diferiu entre os produtos utilizados. A REC foi maior ($P < 0,05$) para os protocolos utilizando o sílica coloidal-PVP (P4d e P1d), sendo que O4d não diferiu dos métodos utilizando sílica coloidal-PVP. No método O1d a REC foi menor mas não diferiu de O4d.

A recuperação considerando a motilidade total (RECMT) não diferiu ($P > 0,05$) entre O4d ($22,4 \pm 3,7\%$), P4d ($17,9 \pm 2,8\%$) e O1d ($11,8 \pm 1,2\%$). A RECMT foi maior ($P < 0,05$) em P1d ($34,6 \pm 8,9\%$).

Tabela 3 - Médias $\pm$ erro padrão do número de espermatozóides, motilidade total (MT), recuperação com e sem considerar a MT dos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4 mL sílica coloidal				1 mL sílica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
Nºsptz ($\times 10^6$ sptz)	132 $\pm$ 7,8 b	9,3 $\pm$ 0,9 c	134 $\pm$ 10,4 b	22,1 $\pm$ 3,5 c	166 $\pm$ 9,8 a	6,5 $\pm$ 0,6 c	167 $\pm$ 9,6 a	23,5 $\pm$ 2,5 c
Rec (%)	-	9,1 $\pm$ 1,5 abA	-	16,2 $\pm$ 2,1 a	-	4,09 $\pm$ 0,3 bA	-	14,5 $\pm$ 1,4 a
RecMT (%)	-	22,4 $\pm$ 3,7 bB	-	17,9 $\pm$ 2,8 b	-	11,8 $\pm$ 1,2 bB	-	34,6 $\pm$ 8,9 a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Turkey. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, diferem entre si na coluna pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

NºStpz - número de espermatozoides; MT- motilidade total; Rec - recuperação; RecMT - recuperação considerando a motilidade total; Sptz – espermatozoides

4. Discussão

A MT e MP tem correlação positiva com a viabilidade espermática (Maia et al., 2009) e pode interferir na fertilidade do sêmen, pois esses parâmetros estão intimamente relacionados à capacidade da célula espermática atingir o sítio de fecundação (Dorado et al, 2011). Foram constatadas melhoras significativas na MT, MP e %RAP das amostras após seleção em sílica coloidal-silano. Nestes parâmetros os protocolos utilizando sílica coloidal-silano (O4d e O1d) superaram os protocolos de seleção em sílica coloidal-PVP. Resultados similares foram relatados em outros trabalhos realizados com bovinos (Mendes et al, 2003; Samardzija et al, 2005; Thys et al.,2009), humanos (Makkar et al, 1999) e equinos (Rodríguez-Villamil et al, 2012) que compararam métodos de seleção utilizando o sílica coloidal-silano e sílica coloidal-PVP. Não houve diferença significativa na MT e MP entre os dois protocolos utilizando sílica coloidal-silano (O4d e O1d), sendo verificado que a diminuição do volume de solução de sílica coloidal revestida por silano mostrou-se eficiente para seleção espermática em relação a estes parâmetros.

Somente o protocolo P1d apresentou melhora na MT quando comparado ao protocolo P1a, este resultado vai ao encontro dos resultados de Machado et al (2009) que reduziram o volume de Percoll® do tradicional 4mL para 800uL. Ao contrário de outros autores (Alvarez et al., 2010; Machado et al., 2009; Mehmood et al., 2009; Samardzija et al., 2005), no presente estudo não foi relatado aumento significativo na MT e MP no protocolo de sílica coloidal-PVP utilizando 4mL (P4), quando comparada às amostras antes da seleção. Estes resultados podem variar conforme as concentrações da solução coloidal de sílica, preparação do gradiente (Thys et al.,2009), variações de intensidade na força *g* e tempo de centrifugação (Gil et al., 2000; Thys et al.,2009), variação de soluções de lavagem após a seleção espermática, qualidade da amostra antes da centrifugação (Martinez-Alborcia et al., 2013), entre outros motivos.

Os parâmetros de cinética espermática estavam próximos aos encontrados em outros experimentos que avaliaram sêmen ovino congelado e descongelado em mesmo *setup* (Maia et al, 2009; Maia et al.,2010; Rodello et al, 2011; Sirchele et al.,2011).

O P1d teve a menor LIN entre todos os métodos, e diferiu de P1a, já a STR diferiu das amostras analisadas antes da seleção quando comparados à P4d, O1d e O4d. Resultados parecidos foram encontrados por Gutierrez Cepeda et al. (2011), que observaram o aumento do STR após seleção espermática de sêmen equino em sílica coloidal-silano, porém diferiram de Thys et al. (2009), que encontraram um incremento na LIN de sêmen bovino selecionado em sílica coloidal-PVP.

A sílica coloidal revestida por PVP foi usada em protocolos de centrifugação com a finalidade de selecionar e capacitar o sêmen para realização da FIV. Mortimer e Maxwell (1999) padronizaram a identificação de células hiperativadas em ejaculado de ovinos com base na cinética espermática $VCL > 250,0 \mu m$ e $VSL \leq 100,0 \mu m$ e $LIN \leq 30\%$ e $ALHmax > 9,0 \mu m$. Neste experimento as médias dos métodos não se encaixaram na padronização de Mortimer e Maxwell (1999), indicando que não houve a hiperativação após a seleção espermática em nenhuma das duas soluções coloidais utilizadas.

A concentração espermática baixou após a seleção por centrifugação nos quatro métodos utilizados. Este resultado já era esperado, visto que a seleção separa as células espermáticas que, por algum motivo, não foram capazes de atravessar a barreira do gradiente. Resultados parecidos foram encontrados em outros estudos utilizando gradiente de sílica coloidal-PVP em caprinos (Rho et al, 2001) e búfalos (Mehmood et al, 2009). Resultados parecidos também foram encontrados em experimentos com caprinos (Jimenez-Rabadan et al 2012), equinos (Anja et al, 2013) e cães (Dorado et al, 2011), que utilizaram métodos de SLC espécie-específicos.

A REC foi maior em P1d e P4d quando o resultado é comparado aos tratamentos com sílica coloidal-silano. Este resultado condiz com outros trabalhos nos quais a taxa de recuperação em seleção espermática com sílica coloidal-PVP foi sempre superior à recuperação de células em sílica coloidal-silano (Anja et al, 2013; Jimenes-Rabadan et al 2012; Rodriguez-Vilamil et al 2012).

Na RECMT a MT é considerada, sendo que esse parâmetro aumentou em todos os tratamentos com diferença significativa quando comparado às REC.

Ao se considerar a MT, o O4d e O1d se equiparam ao P4d, sendo inferiores a P1d, que apresentou a maior RECMT entre os tratamentos. Resultados parecidos foram encontrados por Jimenez-Rabadan et al (2012), que selecionaram sêmen caprino em uma sílica coloidal revestida de silano específica para bovinos.

As taxas de recuperação podem ser alteradas por diversos fatores, entre eles: qualidade do sêmen antes da centrifugação (García-Alvarez et al 2010; Martinez-Alborcia et al., 2013), cuidado no momento de deposição da amostra de sêmen no topo da coluna do gradiente de seleção (Thys et al., 2009), incremento da MT após a seleção espermática, tempo e intensidade de força de centrifugação (Carvajal et al., 2004). Martinez-Alborcia et al (2013) levantaram a hipótese de que espermatozoides não funcionais saturam a interface entre o sêmen e o coloide, obstruindo a passagem de espermatozoides funcionais.

Carvajal et al (2004) testaram diversos protocolos de centrifugação de sêmen suíno e sugeriram que a intensidade de força de centrifugação é mais importante que o tempo de centrifugação na taxa de recuperação dos espermatozoides. Este fato explicaria a maior recuperação nos métodos utilizando a sílica coloidal-PVP, visto que a intensidade da força g era de 900 comparado a 300 nos métodos utilizando sílica coloidal-silano.

Estudos em suínos (Sjunnesson et al., 2013; Martinez-Alborcia et al., 2013) indicam que o uso de sêmen selecionado em SLC na FIV predispõe à poliespermia e pode levar a perdas embrionárias pelo aumento na MT e viabilidade espermática. Sjunnesson et al (2013) não acharam diferença significativa ao diminuir a razão oócito:espermatozoides até 1:300 na FIV em suínos, porém sugerem que esta seria uma alternativa para evitar a poliespermia, além de diminuir o tempo de incubação. Considerando, esta hipótese, a baixa recuperação após a centrifugação em sílica coloidal-silano, pode então ser compensada pela menor concentração de espermatozoides que devem ser utilizados na FIV. Até onde se sabe não há trabalhos envolvendo a FIV e SLC em ovinos, sendo necessário esse tipo de estudo para

averiguar a taxa ótima de oócitos:espermatozoides após seleção em SLC, evitando a polispermia.

O enriquecimento da recuperação é necessário para que a perda de espermatozoides viáveis não aconteça, para isso seriam necessários trabalhos com a finalidade de melhorar os protocolos de centrifugação, padronizar a concentração das amostras processadas, alterar as propriedades físicas do coloide (Martinez-Alborcia et al., 2013).

Nos parâmetros da MT, MP, cinética e recuperação os protocolos com 1mL, nas duas soluções de sílica coloidal, diferiram muito pouco se comparados aos métodos tradicionais de 4mL, sendo o método com 1mL de sílica coloidal-PVP superior ao método utilizando 4mL.

4.1. Conclusão

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a sílica coloidal-silano é mais seletiva para obtenção de amostras de espermatozoides criopreservados com maior motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de células rápidas quando comparada a sílica coloidal-PVP. Em contrapartida a sílica coloidal-PVP apresenta maior recuperação de espermatozoides e recuperação considerando a motilidade total, sendo menos seletiva para os parâmetros qualitativos, porém ainda com diferença significativa de qualidade quando comparado às amostras antes da seleção no método utilizando 1mL de sílica coloidal-PVP. Sendo assim os dois métodos podem ter aplicação prática dependendo da seletividade e recuperação necessárias em cada biotecnologia reprodutiva.

São necessários estudos comparativos entre as soluções de sílica coloidal revestidas com silano ou PVP, utilizando outros parâmetros de fertilidade *in vitro* e *in vivo* com o intuito de confirmar a eficiência fecundativa dos métodos de seleção propostos neste trabalho.

Referências

Anja, S., Love, C., Ball, B. A., 2013. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved-Thawed Equine Spermatozoa . Journal of Equine Veterinary Science., 33, 547-551.

Bucci, D., Spinaci, M., Morrel, J., Vallorani, C., Tamanini, C., Guidetti, R., Galeati, G. , 2013. Effects of single layer centrifugation with Androcoll-P on boar sperm. *Animal Reproduction Science*. 138, 276-281.

Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., Roca, J., 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology*. 25, 389-396.

Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J. M., Acha, D., Hidalgo, M., 2011. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradiente. *Animal Reproduction Science*. 125, 211-218.

Dorado, J., Alcaraz, L., Gálvez, M. J., Acha, D., Ortiz, I. Urbano, M., Hidalgo, M., 2013. Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog sêmen. *Animal Reproduction Science*. 140, 232-240.

Falleiros, M. B., Bicudo, S. D., Rodello, L., Monteiro, C. D., Sakashita, S. M., Weiss, R. R., 2013. Implicações do uso do extrato de LBD (Lipoproteína de baixa densidade) ou gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermática no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. *Veterinária e Zootecnia*. 20(2), 307-317.

Freour, T., Jean, M., Mirallie, S., Dubourdieu, S., Barrière, P., 2010. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 149, 186–189.

Alvarez, O. G., Maroto-Morales, A., Ramón, M., Del Olmo, E., Montoro, V., Dominguez-Rebolledo, A.E., Bisbal, A., Jiménez-Rabadán, P., Pérez-Guzmán, M.D., Soler, A.J., 2010. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 74, 979-988.

Gil, J., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Influence of centrifugation and diferente extenders on post-thaw sperm quality of ram sêmen. *Theriogenology*. 54, 93-108.

Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, A., Crespo, F., Gosálvez, J., Serre, C., 2011. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science*. 124,85-89.

Hishinuma M. E Sekine J., 2004. Separation of canine epididymal Spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. *Theriogenology*. 61,365-372.

Jiménez-Rabadan, P., Morrel, J.M., Johannisson, A., Ramón, M., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Álvaro-García, P.J., Pérez-Gúzman, M.D., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., Soler, A.J., 2012. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtiberica buck sêmen. *Animal Reproduction Science*. 136, 47-54.

Machado, G.M., Carvalho, J.O., Siqueira Filho, E., Caixeta, E.S., Franco, M.M., Rumpf, R., Dode, M.A.N., 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*,.71,1289-1297.

Maia M.S., Bicudo, S. D., Sicherle, C. C., Rodello, L., Gallego, I. C. S., 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 122,118-123

Maia, M.S., Bicudo, S.D.,2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*33,183-193.

Makkar, G., Hung-Yu, N.G., Yeung, S.B., Ho, P.C., 1999. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based médium. *Fertility and sterility*. 72,796-802.

Martí, E., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Perez, J. A., 2006. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*.27,746-753.

Martinez-Alborcia M. J., Morrel, J. M., Gil, M. A., Barranco, I., Maside, C., Alkmin, D. V., Parrilla, I., Martinez, E. A., Roca, J., 2013. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 140,173-179.

Martinez-Alborcia, M. J., Morrel, J. M., Parrilla, I., Barranco, I., Vázquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., 2012. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. *Theriogenology*.78,1117-1125.

Meara, C.M., Hanrahan, J.P., Prathalingam, N.S., Owen, J. S., Donovan, A., Fair, S., Ward, F., Wade, M., Evans, A.C.O., Lonergan, P., 2008. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 69,513-522.

Mehmood, A., Anwar, M., Saqlan Naqvi, S.M., 2009. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*. 111,141-148.

Mendes, J.O.B., Burns, P.D., De La Torre-Sanchez, J.F., Sidel Jr, G.E., 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*. 60,331-340.

Morrel, J. M., Winblad, C., Georgakas, A., Stuhmann, G., Humblot, P., Johannisson, A., 2013. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *ANIMAL Reproduction Science*. 140,62-69

Mortimer, S.T. E Maxwell, W. M. C., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod. Fertl. Dev.* 11,25-30.

Perez, S. M., Chan, P.J., Patton, W.C., King, A., 1997. Silane-Coated Silica Particle Colloid Processing of Human Sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 14, 388-393.

Rho, G. J., Hahnel, A. C., Betteridge, K. J., 2001. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*. 56,503-516.

Rodello, L., Bicudo, S. D., Falleiros, M. B., Monteiro, C. D., Sakashita, S. M., 2011. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. *Veterinária e Zootecnia*. 18(2),239-248.

TRABALHO CIENTÍFICO 2

Este trabalho será enviado a Theriogenology

Integridade e estabilidade de membranas espermáticas, após seleção em soluções coloidais, do semen ovino criopreservado.

“Spermatic membranes integrity and stability after sperm selection on colloidal solution of cryopreserved ovine semen.”

Bergstein, T. G.^a; Bicudo, L. C.^a; Rodello, L.^b; Bicudo, S.D.^c.

- a. Pós-graduando, DRARV¹- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Distrito de Rubião Júnior, s/n - Botucatu/SP. CEP: 18618-970 tacia@onda.com.br
- b. Pós doutorando, DRARV¹- FMVZ –UNESP, Botucatu-SP.
- c. Professor, DRARV¹ – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Resumo

A integridade das membranas espermáticas é vital para que o sêmen apresente potencial fecundativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de quatro métodos de seleção espermática, variando o volume (4mL ou 1mL) de sílica coloidal revestida de polivinilpirrolidona (sílica coloidal-PVP) ou silano (sílica coloidal-silano), na integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal e morfologia espermática do sêmen ovino congelado e descongelado. Para mensurar a integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizada a associação de sondas FIT-PSA/IP e para avaliar a estabilidade de membrana plasmática foi usada a associação de sondas fluorescente M540/YOPRO1. Todos os métodos foram eficientes em selecionar amostras de sêmen com maior estabilidade e integridade de membrana plasmática. Somente o método utilizando 1mL de sílica coloidal-PVP não foi eficiente em diminuir células espermáticas com acrossomo reagido, detectado pelo FIT-PSA+. Somente o método utilizando 1mL de sílica coloidal-silano foi eficiente em diminuir a incidência de espermatozoides com patologias de acrossomo. Nenhum dos métodos foi eficiente em eliminar células com

¹ DRARV – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

membrana plasmática lesada e acrossomo reagido ou espermatozoides viáveis sem estabilidade de membrana plasmática. Concluindo, a seleção espermática em sílica coloidal silano e PVP melhorou a qualidade espermática quando comparado às amostras antes da seleção. A sílica coloidal-silano apresentou vantagem sobre o sílica coloidal-PVP na seleção de sêmen ovino criopreservado. O método utilizando 1mL de sílica coloidal-silano foi o único eficiente na eliminação de espermatozoides com acrossomo lesado, este método também foi eficiente em diminuir a incidência de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido, sendo assim este foi o método que apresentou os melhores resultados.

Abstract

The integrity of spermatid membranes is vital for the fertilization potential of the semen. The aim of this study was to evaluate the effect of four methods of sperm selection, varying the volume (4mL or 1mL) of two commercial colloidal silica solutions coated with polyvinylpyrrolidone (colloidal silica-PVP) or silane (colloidal silica-silane), in the integrity and stability of the plasmatic membrane, integrity of the acrosomal membrane and spermatid morphology of frozen and thawed ovine semen. In order to measure the integrity of the plasmatic and acrosomal membrane, an association of probes FIT-PSA/IP was used. To evaluate the stability of the plasmatic membrane, an association of fluorescent probes M540/YOPRO1 was used. All of the methods were efficient in selecting sperm samples with greater stability and integrity of the plasmatic membrane. Only the method using 1mL of colloidal silica-PVP was not efficient in reducing spermatid cells with reacted acrosome, detected by the FIT-PSA+. Only the method using 1mL of colloidal silica-silane was efficient in reducing the incidence of sperm with acrosome pathologies. None of the methods were efficient in eliminating cells with damaged plasmatic membranes and reacted acrosomes or viable sperm without stability of the plasmatic membrane. In conclusion, sperm selection in colloidal silica-silane and colloidal silica-PVP improved sperm quality when compared to the controls. Colloidal silica-silane showed advantages over colloidal silica-PVP in the selection of frozen and thawed ovine semen. The method using 1mL of colloidal silica-silane was the

only efficient process in eliminating sperm with damaged acrosome. Associated to the fact that it has lower cost, it was the method that showed the best results.

Palavras chave: seleção espermática, membranas espermáticas, sílica coloidal

1. Introdução

O processo de criopreservação causa perdas de viabilidade dos espermatozoides, ainda que 40 a 60% do sêmen ovino permaneça com motilidade após a descongelação somente 20 a 30% se mantém biologicamente intactos [1]. Mudanças nas membranas dos espermatozoides podem não afetar a motilidade, mas diminuir a sobrevivência das células e diminuir ou incapacitar o potencial de fertilização [2].

A qualidade espermática está correlacionada com a integridade da membrana plasmática, pois esta membrana não apenas delimita a célula mas também tem função nas interações celulares, como por exemplo a ligação do espermatozoide ao epitélio do oviduto ou a penetração da célula espermática no oócito [3]. A capacitação é o termo usado para definir uma sequência de reações que acontecem no espermatozoide a partir do momento em que ele entra no trato reprodutivo feminino [2]. Tais mudanças são necessárias para que a célula espermática seja capaz de atingir e fecundar o óvulo. A última alteração sofrida pelo espermatozoide no processo de capacitação é a reação acrossomal, iniciada imediatamente após a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, quando há a fusão entre membrana plasmática e acrossomal externa, com posterior liberação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas [4,5]. Quando a reação acrossômica ocorre prematuramente, pode-se observar uma queda na fertilidade do sêmen [5].

As sondas fluorescentes são usadas na avaliação de ultraestruturas presentes nos espermatozoides [6]. A associação de aglutinina do *Pisum sativum* (FIT-PSA) e iodeto de propídio (IP) é usada para identificação da integridade de membrana plasmática e *status* de reação acrossomal em diversas espécies de animais domésticos [7,8]. Merocianina 540 (M540) e Yo-Pro-1 é uma associação de sondas confiáveis na avaliação de estabilidade de membrana plasmática e viabilidade espermática [2].

Os gradientes de centrifugação têm a capacidade de selecionar espermatozoides criopreservados com maior motilidade, viabilidade e características de membranas que tornam essas células mais propensas a fertilizar os oócitos [9]. Os espermatozoides de boa qualidade têm a capacidade de atravessar as barreiras de coloide e se depositar no *pellet* do fundo do tubo [10]. Foram desenvolvidos métodos que empregam o uso de uma camada de coloide espécie-específica (Single Layer Centrifugation - SLC) e selecionam a população espermática com a mesma eficiência que os tradicionais coloides descontínuos (Discontinuous Gradient Centrifugation – DGC). As vantagens das SLC em relação aos DGC são que exigem menos tempo de preparação, são processos menos complicados e podem ser dimensionados dependendo da quantidade de amostras a serem processadas [11].

O objetivo deste trabalho foi avaliar, com base na integridade e estabilidade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e morfologia espermática, a seleção espermática por centrifugação em sílica coloidal revestida com silano (Ovipure[®]) e com polivinilpirrolidona (Percoll[®]).

2. Material e métodos

2.1. Processamento do sêmen

Foram usadas triplicatas de sêmen congelado e descongelado provenientes de 10 carneiros da raça Dorper. A média de espermatozoides por dose era de $149 \pm 9,41 \times 10^6$, envasados em palhetas de 0,25mL, sendo a diluição feita com meio à base de glicina, 5% de gema de ovo e leite (GGL5%) (Rodello et al., 2011). As doses foram congeladas em equipamento automatizado (TK 3000[®], TK Congelações, Brasil) com curva padrão de congelamento de sêmen ovino “S2P3”. Para descongelação a palheta de sêmen era imersa em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Logo após a descongelação, a observação exata do volume de sêmen era feito através da aferição da coluna de sêmen presente na palheta com auxílio de escala com unidades equivalentes a 10µL. O conteúdo da palheta era depositado em tubo de fundo cônico, previamente aquecido à 37°C, e, a partir desta amostra, eram retiradas alíquotas para as análises espermáticas.

4.2. Soluções e extensores

O Ovipure[®] foi doado pela empresa Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suécia. O gradiente Percoll[®], utilizado no experimento, foi produzido pela empresa Nutricell Nutrientes Celulares LTDA, Campinas, Brasil. As concentração de Percoll[®] utilizadas foram de 90% e 45%.

O extrato do meio glicina, gema e leite (EGGL) foi obtido através da centrifugação do meio de glicina, 5% de gema e leite (GGL5%), sem glicerol (Rodello et al., 2011) a 10000g por 15 minutos a 4°C, adaptado da metodologia de Falleiros et al. (2013). O EGGL5% foi utilizado como clarificador das amostras na análise da cinética espermática

2.2.2 Silica coloidal revestida por silano (Silica coloidal – Silano; Ovipure[®])

Foram preparados dois protocolos utilizando o silica coloidal revestida de silano (Silica coloidal – Silano) (Ovipure[®] - Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suécia), o protocolo O4, seguiu as orientações do fabricante, e o protocolo O1, com volume reduzido, a fim de potencializar o uso do produto.

A preparação para centrifugação O4, foi feita em tubo Falcon^{®2} com capacidade para 15mL, sendo depositados 4mL de solução silica coloidal-silano. Para o segundo protocolo O1, em tubo Eppendorf^{®3} com capacidade para 1,5mL, foi depositado 1 mL da mesma solução. No topo das colunas em ambos os protocolos, foram cuidadosamente dispensados 250 µL de sêmen congelado e descongelado. Os tubos foram centrifugados à temperatura fixa de 25°C, por 20 minutos, com intensidade de 300g. Após a centrifugação, o sobrenadante era retirado, permanecendo 750µL do *pellet* decantado para O4 e 200µL do *pellet* decantado em O1. Esse resíduo era ressuspendido em 4250µL(O4) e 1050µL(O1) do EGGL e submetido a 10 minutos de centrifugação, a uma intensidade de 500g, à 25°C. Em seguida à centrifugação, o sobrenadante era cuidadosamente, retirado, permanecendo o

² BD – Becton Dickison, San José, CA, USA

³ Eppendorf AG – Hamburg, ALE.

pellet de 300µL(O4) e 200µL(O1), que seria homogeneizado e submetido às análises *in vitro*.

2.2.2 Silica coloidal revestida por polivinilpirrolidona (Silica coloidal – PVP; Percoll®)

O gradiente de centrifugação P4 foi preparado em tubo Falcon® de 15 mL, sendo 2 mL do Percoll® 90% foi colocado no fundo do tubo, em seguida, e, cuidadosamente, 2mL do Percoll® 45% foi despejado sobre este, formando assim o gradiente para centrifugação. Para o método P1 foi utilizado tubo Eppendorf® com capacidade de 1,5mL. Foi descartado 0,5mL do Percoll® 90% no fundo do tubo, seguido de 0,5 mL do Percoll® 45% despejado sobre este, formando assim o gradiente para centrifugação. O volume de sêmen congelado e descongelado de 250µL, com contagem espermática média de 100×10^6 espermatozoides foi, delicadamente, colocado sobre a coluna de Silica coloidal-PVP nos dois métodos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos com intensidade de 900g, em temperatura fixa de 25°C, em seguida, o sobrenadante era retirado, permanecendo 750µL em P4 e 200µL em P1 do *pellet* decantado. Esse resíduo era ressuspendido em 4250µL(P4) e 1050µL(P1) do EGGL e submetido a 5 minutos de centrifugação, a uma força de 300g, à 25°C. Em seguida, o sobrenadante era, cuidadosamente, retirado, permanecendo o *pellet* de 300µL em P4 e 200µL em P1, que seriam homogeneizados e submetidos às análises *in vitro*.

2.5. Análise *in vitro* do sêmen

As análises *in vitro* do sêmen eram realizadas em dois momentos: logo após a descongelação, antes da seleção (O4a,O1a,P4a,P1a) e depois da seleção (O4d, O1d, P4d, P1d).

2.5.1. Citometria de fluxo

As análises de integridade e estabilidade da membrana plasmática e reação acrossomal, foram feitas por citometria de fluxo (Accuri C6® - Accuri Cytometers, Ann Arbor, USA). Para definir as populações espermáticas e/ou debris foram utilizados, com base em diferenças de tamanho e complexidade, o *Forward-Scatter-Cluster-Height* (FSC-H) e o *Side-Scatter-Cluster-Height* (SSC-

H) no gráfico de pontos. Os dados fornecidos em pontos bi-dimensionais numa escala logarítmica foram analisados pelo *software* CFlow Plus® (Accuri Cytometers, Ann Arbor, USA) [14]. Em todas as amostras eram avaliadas 10.000 células espermáticas e os pontos eram gerados pelo *software* CFlow Plus® após a contagem.

2.5.1.1. Viabilidade espermática e integridade de membrana acrossomal

Para aferição da integridade de membrana plasmática e reação acrossomal foi usada uma associação de sondas compostas por aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FIT-PSA) e iodeto de propídio (IP). A solução de trabalho foi formulada com 25 µL de FIT-PSA a 100µg/mL em PBS, 2 µL de IP a 2mg/mL de PBS e 100 µL de TRIS. A alíquotagem das amostras de sêmen era feita em dois momentos: logo após a descongelação (O4a,O1a,P4a,P1a) e logo após a centrifugação (O4d,O1d,P4d,P1d), sendo que o volume da alíquota era de 1µL e 10µL, respectivamente. Após a diluição da amostra, a solução era submetida a 8 minutos em banho-maria, à 38°C. Após a leitura em citometria de fluxo os espermatozoides eram classificados em categoria 1 (CAT 1, FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; categoria 2 (CAT 2, FIT-PSA+/IP-), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; categoria 3 (CAT 3, FIT-PSA-/IP+), com membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; categoria 4 (CAT 4, FIT-PSA+/IP+), com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida [15].

2.5.1.2. Viabilidade espermática e estabilidade de membrana plasmática

Para aferição da viabilidade espermática e estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides, foi utilizada a associação de sondas merocianina 540 (M540) e YO-PRO1. A solução de trabalho foi formulada com 1µL de YoPRO1 (25µM em DMSO), 2,6µL de M540(1mM em DMSO) e 100 µL de TRIS. A alíquotagem das amostras de sêmen era feita em dois momentos: logo após a descongelação (O4a, O1a, P4a, P1a) e logo após a centrifugação (O4d,O1d,P4d,P1d) sendo que o volume da alíquota era de 1µL e 10µL, respectivamente. Após a diluição da amostra a solução era submetida a 8 minutos em banho-maria, à 38°C. A leitura era feita em citometria de fluxo

BDAccuri™ C6 (Becton Dickison, San José, CA, USA), com contagem fixa de dez mil células por amostra. Os espermatozoides eram classificados em categoria 1 (CAT 1, YOPRO1+/M540-), mortos; categoria 2 (CAT 2, YOPRO1-/M540-), viáveis com estabilidade de membrana plasmática; categoria 3 (CAT3, YOPRO1-/M540+), viáveis com instabilidade de membrana plasmática [2].

2.5.3. Morfologia espermática

A morfologia espermática foi realizada pela contagem diferencial de 200 células por amostra, seguindo a classificação de Blom [16]. Logo após a descongelação, uma amostra de 10µL do sêmen descongelado era transferida para tubo de fundo cônico contendo 300µL de Glutaraldeído a 0,2%. Após a centrifugação, a alíquota retirada de sêmen era de 100 µL para 300µL de glutaraldeído a 0,2%. As amostras eram mantidas a 4°C para posterior leitura. A contagem diferencial era realizada em microscopia de contraste de fase (Olympus BX-40, Tokyo, Japan) em aumento de 1000x, sob imersão em preparações úmidas, colocando-se uma gota entre lâmina e lamínula.

2.6. Análise estatística

As análises das amostras não foram de ordem pareada. Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com oito tratamentos (O4a; P4a; O1a; P1a; O4d; P4d; O1d; P1d) e dez blocos (reprodutores). Para a análise dos dados foram utilizadas as médias dos valores obtidos nas triplicatas de cada reprodutor. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo método Kolmogorov-Smirnov, sendo utilizado como métodos estatísticos ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, empregando-se o programa GraphPad Prism®, versão 5.03 para Windows. O nível de significância utilizado foi de $P > 0,05$.

3. Resultados

A média de porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e acrossoma não reagido (FIT-PSA-/IP-) não diferiu ($P > 0,05$) entre as amostras analisadas antes da seleção (O4a: $19,9 \pm 2,13\%$; O1a: $27,1 \pm 1,65\%$; P4a: $19,2 \pm 1,89\%$; P1a: $21,7 \pm 1,23\%$). Os dois protocolos utilizando Silica coloidal - silano demonstraram aumento ($P < 0,05$) na FIT-PSA-/IP-, quando

comparados às amostras antes da seleção, porém não diferiram entre si ($P>0,05$) (O4d: $52,8 \pm 3,73\%$; O1d: $63,4 \pm 4,08\%$). Os protocolos utilizando Silica coloidal -PVP (P4d: $37,1 \pm 4,12\%$; P1d: $46,8 \pm 4,23\%$) não diferiram entre si e apresentaram um incremento na FIT-PSA-/IP-, quando comparados às amostras analisadas antes da seleção, porém, de magnitude menor, quando comparados aos protocolos utilizando o Silica coloidal - silano, disponível na Tabela1.

Tabela 1 - Valores médios $\pm$ erro-padrão da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo não reagido, membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido, membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido e membrana plasmática lesada e acrossomo reagido, utilizando a combinação de sondas FIT-PSA e IP com leitura em citometria de fluxo, nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4mL silica coloidal				1 mL silica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
MP íntegra Acro não reagido FIT-PSA -/ IP-	19,9 $\pm$ 2,1 c	52,8 $\pm$ 3,7 a	19,2 $\pm$ 1,9 c	37,1 $\pm$ 4,1 b	27,1 $\pm$ 1,6 c	63,4 $\pm$ 4,1 a	21,7 $\pm$ 1,2 c	46,8 $\pm$ 4,2 b
MP íntegra Acro reagido FIT-PSA +/- IP-	41 $\pm$ 4,2 ab	19,3 $\pm$ 1,7 c	44,6 $\pm$ 4,3 a	29,7 $\pm$ 2,9 bc	39,1 $\pm$ 2,8 ab	19,6 $\pm$ 2,4 c	39,1 $\pm$ 2,4 ab	30 $\pm$ 2,7 ab
MP lesada Acro não reagido FIT-PSA-/IP+	37,4 $\pm$ 3,4 a	24,6 $\pm$ 3 ab	34,7 $\pm$ 3,3 ab	31,4 $\pm$ 3,2 ab	32,2 $\pm$ 2,1 ab	3,9 $\pm$ 1 c	37 $\pm$ 2,4 a	22,2 $\pm$ 2,7 b
MP lesada Acro reagido FIT-PSA+/IP+	1,7 $\pm$ 0,4 a	3,3 $\pm$ 0,9 a	1,4 $\pm$ 0,2 a	1,1 $\pm$ 0,2 a	1,7 $\pm$ 0,2 a	13,2 $\pm$ 2,5 a	2,2 $\pm$ 0,4 a	1,0 $\pm$ 0,1 a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

MP - membrana plasmática; Acro - acrossomo; FIT-PSA - aglutinina do *Pisum sativum*; IP - iodeto de propídio; mL- mililitros.

A porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido (FIT-PSA+/IP-) foi maior em P4a ($44,6 \pm 4,33\%$), que não diferiu ($P>0,05$) de O4a ($41 \pm 4,22\%$), O1a ($39,1 \pm 2,76\%$) e P1a ($39,1 \pm 2,4\%$). Os protocolos utilizando Silica coloidal – silano (O4d: $19,3 \pm 1,75\%$; O1d: $19,6 \pm 2,42\%$) não diferiram entre si e apresentaram FIT-PSA+/IP- significativamente inferiores ($P<0,05$) à O4a e O1a. Não houve diferença significativa de FIT-PSA+/IP- nos protocolos utilizando Silica coloidal -PVP (P4d: $29,7 \pm 2,89\%$; P1d: $30 \pm 2,68$), quando comparados à P1a e P4a e a O4d e O1d, porém, foram significativamente inferiores a P4a, descrito na Tabela 1.

Somente os métodos com volume de 1mL foram eficientes em eliminar espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido O1d ($3,9 \pm 1\%$) e P1d ($22,2 \pm 2,7\%$), quando comparados à O1a ($32,2 \pm 2,1\%$) e P1a ($37 \pm 2,4\%$) (Tabela 1).

Não foi observado efeito significativo ($P<0,05$) na seleção espermática em células com membrana plasmática lesada e acrossomo reagido (Tabela 1), tampouco nas patologias de cabeça isolada e de cauda (Tabela 2).

As patologias de acrossomo foram significativamente menos frequentes nas amostras selecionadas em O1d ($2,6 \pm 0,4\%$), quando comparadas à O1a ($8,53 \pm 1,1\%$).

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ erro padrão da porcentagem de células com cabeça isolada, patologias de cauda e patologias de acrosso no nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4mL silica coloidal				1 mL silica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
Cabeça Isolada	2,3 $\pm$ 0,6 b	3 $\pm$ 1 ab	2,3 $\pm$ 0,5 b	2,3 $\pm$ 0,7 b	3,1 $\pm$ 1 ab	7,4 $\pm$ 2 a	3 $\pm$ 0,7 ab	6,1 $\pm$ 1,5 ab
PATO Cauda	17,6 $\pm$ 1,9 ab	28,1 $\pm$ 3,2 a	16,4 $\pm$ 1,6 b	27,2 $\pm$ 3 ab	19,2 $\pm$ 2,6 ab	22,4 $\pm$ 2,5 ab	18,7 $\pm$ 1,8 ab	25,7 $\pm$ 2,6 ab
PATO Acro	7,5 $\pm$ 1,1 a	6,1 $\pm$ 1 ab	7,7 $\pm$ 1,2 a	8,4 $\pm$ 1,5 a	8,53 $\pm$ 1,1 a	2,6 $\pm$ 0,4 b	7,6 $\pm$ 0,8 a	4,9 $\pm$ 0,8 ab

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

Pato - Patologia; Acro- acrosso; mL- mililitros.

A porcentagem de espermatozoides viáveis e com estabilidade de membrana plasmática (M540-/YOPRO1-) não diferiu entre as amostras antes da seleção (O4a: $30,2 \pm 2,22\%$; O1a: $27,3 \pm 2,02\%$; P4a: $27,6 \pm 2,01\%$; P1a: $27,4 \pm 1,91\%$). Houve um aumento significativo ($P < 0,05$) de M540-/YOPRO1- nos protocolos utilizando Silica coloidal - PVP (P4d: $41 \pm 3,52\%$; P1d: $42 \pm 3,34\%$), quando comparados aos controles, porém, foi inferior ao incremento de M540-/YOPRO1- observado nos protocolos utilizando Silica coloidal - silano (O4d: $62,7 \pm 2,83\%$; O1d: $73,3 \pm 2,98\%$). Não houve diferença significativa de M540-/YOPRO1- entre os protocolos utilizando o mesmo produto na centrifugação (Tabela 3).

A percentualidade de células viáveis e sem estabilidade (M540+/YOPRO1-) não foi diferente ($P > 0,05$) nas amostras antes e após a centrifugação e entre os produtos utilizados na seleção espermática.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na porcentagem de espermatozoides mortos (YOPRO1+) entre as amostras analisadas antes da seleção (O4a: $67,1 \pm 2,31\%$; O1a: $72,3 \pm 2,01\%$; P4a: $70,8 \pm 2,21\%$; P1a: $72,5 \pm 1,91\%$). O YOPRO1+ baixou nas amostras selecionadas em Silica coloidal - PVP (P4d: $57,3 \pm 3,51\%$; P1d: $58 \pm 3,34\%$), quando comparadas à P4a e P1a. O YOPRO1+ foi ainda menor nas amostras centrifugadas em Silica coloidal - silano (O4d: $35,4 \pm 2,78\%$; O1d: $26,5 \pm 2,97\%$) quando comparadas às amostras antes da seleção e aos tratamentos utilizando o Silica coloidal -PVP.

Tabela 3 - Valores médios $\pm$ erro padrão da porcentagem de células viáveis com estabilidade, viáveis sem estabilidade e mortas, utilizando a combinação de sondas M540 e YOPRO1 com posterior leitura em citometria de fluxo, nos tratamentos antes e após a centrifugação em 4mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona e antes ou depois da centrifugação em volume de 1mL de Silica coloidal revestida por silano ou polivinilpirrolidona, de sêmen ovino criopreservado.

Variáveis	4mL silica coloidal				1 mL silica coloidal			
	Silano		PVP		Silano		PVP	
	Antes (O4a)	Depois (O4d)	Antes (P4a)	Depois (P4d)	Antes (O1a)	Depois (O1d)	Antes (P1a)	Depois (P1d)
Viáveis com estabilidade M540 -	30,2 $\pm$ 2,2 a	62,7 $\pm$ 2,8 b	27,6 $\pm$ 2,0a	41 $\pm$ 3,5 c	27,3 $\pm$ 2,0 a	73,3 $\pm$ 2,9 b	27,4 $\pm$ 1,9 a	42 $\pm$ 3,3 c
Viáveis sem estabilidade M540 +	2,7 $\pm$ 0,8 a	1,9 $\pm$ 0,6 a	1,6 $\pm$ 0,4 a	1,6 $\pm$ 0,5 a	0,3 $\pm$ 0,1 a	0,2 $\pm$ 0,03 a	0,13 $\pm$ 0,04 a	0,02 $\pm$ 0,005 a
Mortos YOPRO+	67,1 $\pm$ 2,3 a	35,4 $\pm$ 2,8 b	70,8 $\pm$ 2,2 a	57,3 $\pm$ 3,5 c	72,3 $\pm$ 2,0 a	26,5 $\pm$ 2,9 b	72,5 $\pm$ 1,9 a	58 $\pm$ 3,3 c

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$) diferem entre si pelo teste de Tukey.

M54- merocianina 540; mL- mililitros.

4. Discussão

As médias de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomo não reagido (FIT-PSA -/IP-) foram significativamente ($P<0,05$) maiores após os métodos de centrifugação. Os métodos utilizando sílica coloidal – silano e sílica coloidal –PVP diferiram entre si, sendo que as amostras selecionadas com sílica coloidal- silano apresentaram as maiores médias (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que avaliaram o efeito de SLC ou DLC em bovinos [2,17], equinos [8], cães [7] e caprinos [10].

As médias de membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido foram menores em O1a, diferindo de todas as amostras antes da centrifugação e de todos os outros métodos. P1d também foi efetivo na diminuição desta categoria, quando comparado a P1a. Somente os métodos com 1mL foram eficientes em diminuir a incidência de espermatozoides com a membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido. A passagem das células espermáticas em gradientes de seleção exercem um efeito mecânico na membrana plasmática [18], levando à diminuição da concentração de glicoproteínas presentes na membrana plasmática, que regulam o início da capacitação [19]. É possível que a exposição a um volume maior de sílica coloidal, aumentando o percurso do espermatozóide desde o sobrenadante até o fundo do tubo, esteja alterando a integridade desses espermatozoides e levando a uma posterior perda do acrossomo.

A patologia de acrossomo foi menor ($P<0,05$) em O1d, quando comparado a todos os métodos analisados antes da seleção. Não houve correlação entre a patologia de acrossomo e a reação de acrossomo aferida com FIT-PSA/IP. A patologia foi conferida de forma subjetiva e em um número relativamente baixo de células, quando comparado à citometria de fluxo (200 e 10000, respectivamente). Além disso, a FIT-PSA/IP tem afinidade com a membrana acrossomal externa no momento em que esta é exposta, sendo portanto a marcação anterior à observação de extrusão acrossomal, tornando o FIT-PSA/IP um método de detecção mais precoce. Resultados similares foram relatados por Morris et al. [23], que selecionaram sêmen de carneiros em Sílica coloidal - PVP.

A estabilidade de membrana plasmática está relacionada à motilidade, morfologia normal de cabeça e integridade de membrana plasmática [2]. A desestabilização da membrana plasmática é uma etapa da capacitação espermática [1], sendo também resultante da criocapacitação [5].

No presente estudo, a centrifugação em gradientes coloidais promoveu maior seleção de espermatozoides viáveis e com estabilidade de membrana plasmática (YOPRO1-/M540-), sendo que os métodos utilizando sílica coloidal - silano foram mais eficientes nesta seleção, quando comparados àqueles utilizando o sílica coloidal-PVP (Tabela 3). Garcia-Alvarez [24] correlacionaram YOPRO1-/M540+ com fertilidade *in vivo*, testada a partir da taxa de não retorno ao estro após IA uterina em ovinos, constatando uma correlação média ($FERT_c = 0,172 + 0,073; r = 0,37$).

Já é sabido que a centrifugação em sílica coloidal-PVP promove a capacitação espermática [25] pela alteração da estabilidade de membrana plasmática e consequente reação acrossomal [18], sendo este artifício usado na preparação do sêmen para a fertilização *in vitro*. Em contrapartida, a capacitação pode ser uma desvantagem na reprodução assistida em animais, quando o tempo entre a ovulação e a inseminação artificial não estiverem bem sincronizados, ou, ainda, quando o intervalo entre a preparação do sêmen e inseminação for muito prolongado [1, 25], pois a sobrevivência do espermatozoide capacitado é menor [1]. O montante de espermatozoides viáveis e não capacitados ao uso em inseminação artificial é uma valiosa informação da qualidade espermática [2]. No presente experimento, não houve diferença ($P > 0,05$) nas médias dos espermatozoides viáveis sem estabilidade de membrana plasmática antes e após a seleção espermática. Resultados parecidos foram encontrados por Johannisson [8] ao selecionar sêmen equino em SLC.

Todos os métodos foram eficientes em selecionar menor porcentagem de espermatozoides mortos (YOPRO+), sendo que os métodos usando sílica coloidal-silano tiveram médias menores, quando comparadas à sílica coloidal-PVP. A diminuição de células lesadas no volume final é interessante, visto que células morfológica ou funcionalmente anormais são fontes de ROS [22, 26].

Em resumo, a centrifugação em Sílica coloidal-silano selecionou espermatozoides com membrana plasmática íntegra e estável, com acrossoma

não reagido e com menor média de defeitos de acrossomo e membrana plasmática lesada e acrossomo não reagido. As centrifugações em Silica coloidal-PVP foram eficientes em selecionar espermatozoides com membrana plasmática íntegra e estável, com acrossomo não reagido, porém, não tiveram efeito sobre a morfologia espermática, além de haver a hipótese de que tenham provocado a desestabilização de membrana plasmática das amostras. O método utilizando 1mL de Silica coloidal-silano foi o mais eficiente em selecionar o sêmen com características desejáveis, além de diminuir a incidência de espermatozoides com características indesejáveis, como membrana plasmática lesada ou acrossoma reagido, sendo este o melhor método identificado neste experimento.

4.1. Conclusão

Concluiu-se, portanto, que a silica coloidal-silano foi mais seletiva quando comparado à silica coloidal-PVP na seleção de sêmen ovino congelado e descongelado com melhor qualidade. Entre os métodos utilizando silica coloidal-silano, o que utiliza o volume de 1mL foi o único método eficiente na exclusão de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossoma não reagido. São necessários estudos que comprovem a eficiência deste tipo de preparação do sêmen na fertilização *in vitro* e *in vivo* para que esta seja incorporada na rotina de preparação de sêmen para IA e FIV.

Referências

- [1] Salamon, SE, Maxwell, WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 2000;62:77-111.
- [2] Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing Membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology* 2006;65:1122-36.
- [3] Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, Lacaze K, Blanchard TL. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology* 2011;76:334-41.
- [4] Mocé E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 2008;105:104-18.

- [5] Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006;65:958-78.
- [6] Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Molares A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernandez-Santos MR. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science* 2013;138:102-9.
- [7] Dorado J, Alcaraz L, Gálvez MJ, Acha D, Ortiz I, Urbano M, Hidalgo M. Single-layer centrifugation through PureSperm[®] 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog sêmen. *Animal Reproduction Science* 2013;140:232-40.
- [8] Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jonsson M, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science* 2009;116:119-28.
- [9] Anja S, Love C, Ball BA. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved-Thawed Equine Spermatozoa . *Journal of Equine Veterinary Science* 2013;33:547-51.
- [10] Jiménez-Rabadan P, Morrel JM, Johannisson A, Ramón M, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Álvaro-García PJ, Pérez-Gúzman MD, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtiberica buck sêmen. *Animal Reproduction Science* 2012;136:47-54.
- [11] Morre, JM, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science* 2013;140:62-9.
- [12] Rodello L, Bicudo SD, Falleiros MB, Monteiro C D, Sakashita SM. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. *Veterinária e Zootecnia* 2011;18(2):239-48.
- [13] Falleiros M B, Bicudo SD, Rodello L, Monteiro CD, Sakashita, SM, Weiss RR. Implicações do uso do extrato de LBD(Lipoproteína de baixa densidade) ou gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermática no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. *Veterinária e Zootecnia* 2013;20(2):307-17.

- [14] Cheuquema C, Bravo P, Treule F, Giojalas LC, Villegas J, Sanchez R, Risopatro J. Sperm Membrane Functionality in the Dog Assessed by Flow Cytometry. *Reprod Dom Anim* 2012;47:39–43.
- [15] Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals* 2007;42:479-88.
- [16] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaermed* 1973;25:382-91.
- [17] Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T. A comparison of BoviPure[®] and Percoll[®] on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science* 2005;91:237-47.
- [18] Machado GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009;71:1289-97.
- [19] Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vicenti A, Fornés MW, Albertio R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 2006;66:1185-93.
- [20] Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2011;35:145-51.
- [21] Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Gosálvez J, Serre C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science* 2011;124:85-9.
- [22] Martinez-Alborcia M J, Morrel JM, Gil MA, Barranco I, Maside C, Alkmin DV, Parrilla I, Martinez EA, Roca J. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2013;40:173-9.

- [23] Morris LHA, Randall AE, King WA, Johnson WH, Buckrell BC. The contribution of the male to ovine embryogenesis in an in vitro embryo production system. *Animal Reproduction Science* 2003;75:9-26.
- [24] Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, Del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, Bisbal A, Jiménez-Rabadán P, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2010;74:979-88.
- [25] Martí E, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Perez JA. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2006;27(6):746-53.
- [26] Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Ver. Bras. Reprod. Anim.* 2009;33:183-93.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As seleções espermáticas têm trazido resultados muito interessantes para a preparação de sêmen em diversas espécies. Nos estudos, é possível constatar um substancial incremento da MT e MP, viabilidade e potencial mitocondrial nas análises de sêmen *in vitro* e incremento, também, nas taxas de PIV (SAMARDZIJA et al., 2006; THYS et al., 2009; JIMENEZ-RABADAN et al., 2012). Seleção espermática com centrifugação em SLC tem se destacado pela facilidade de preparação do método, soluções prontas para o uso, espécie-específicas e a mobilidade de volumes, quando é necessário processar grande número de amostras (BUCCI et al., 2013; SJUNNESSON et al., 2013).

As MT e MP têm correlação positiva com a viabilidade espermática (MAIA et al., 2009) e acredita-se que a motilidade é a característica mais importante do sêmen na habilidade de fertilizar (TSAKMAKIDIS, 2010). No presente trabalho, os métodos utilizando sílica coloidal-silano superaram aqueles utilizando a sílica coloidal-PVP nos parâmetros de motilidade (Artigo 1-Tabela 1). Trabalhos comparando a sílica coloidal-PVP e a sílica coloidal-silano já haviam relatado resultados semelhantes (MENDES et al., 2003; THYS et al., 2009; RODRÍGUEZ VILLAMIL et al., 2012). Não houve diferença significativa entre os métodos com variação dos volumes de centrifugação. Diferente de outros trabalhos (MACHADO et al., 2009; GARCIA-ALVAREZ et al., 2010), não foi verificado neste trabalho o incremento de MT ou MP no método de seleção utilizando 4mL de sílica coloidal-PVP. Acredita-se que esse resultado pode sofrer influência do tempo de centrifugação e intensidade de força *g* de centrifugação aplicada no método, qualidade da amostra antes da centrifugação, efeito da solução de lavagem após a seleção espermática, entre outros.

A relevância da cinética espermática na predição da fertilidade de uma amostra de sêmen é controversa. Enquanto alguns autores relatam que a cinética pode ser útil para identificar amostras com baixa fertilidade (DEL OLMO et al., 2013), outros defendem que a cinética, excluindo a MT e MP, não

tem relação com a fertilidade das amostras (MEARA et al., 2008; FRÉOUR et al., 2010). Neste trabalho a VAP, A VCL e o ALH não sofreram interferência da seleção espermática (Artigo 1 – Tabela 2). De modo geral, houve um decréscimo das médias das velocidades após a seleção espermática. É possível que esse achado tenha sido referente ao gasto energético sofrido pelas amostras durante o período de processamento.

Já era esperada a diminuição do número de espermatozoides após a seleção espermática, visto que este método separa células imóveis ou com baixa motilidade da fração rica em espermatozoides com boa motilidade (RHO et al., 2001). Em concordância com outros estudos (JIMENEZ-RABADAN et al, 2012; RODRIGUEZ-VILAMIL et al, 2012; ANJA et al, 2013), os métodos de seleção utilizando sílica coloidal-silano obtiveram a REC menor que os métodos utilizando sílica coloidal-PVP, porém, como discutido anteriormente, os métodos em sílica coloidal-silano foram mais efetivos em selecionar amostras com maior MT e MP. Por este motivo foi avaliada a RECMT em que a MT é levada em consideração. Ainda assim, as RECMT foram inferiores nos métodos utilizando sílica coloidal-silano quando comparadas aos métodos utilizando sílica coloidal-PVP.

Cseh et al. (2012) revisaram os métodos de inseminação artificial em ovinos e os processamentos de sêmen disponíveis nessa espécie. Pela particularidade anatômica do colo do útero de ovelhas, vários métodos de inseminação artificial foram elaborados, para cada método há um número ideal de células espermáticas a serem depositadas, sendo que, se o sêmen for depositado na entrada da cervix, o número é de 400×10^6 espermatozoides, se for no corpo do corno uterino, devem ser 200×10^6 espermatozoides. No entanto, se a inseminação for intrauterina, é possível a utilização de 20×10^6 espermatozoides. Os valores de RECMT para os métodos utilizando 4mL e de 1 mL de sílica coloidal-PVP superaram este número total de espermatozoides, porém, no método que utiliza 1mL de sílica coloidal-silano esse valor não foi atingido, sendo necessária a utilização de mais de uma palheta de sêmen para recuperar o total ideal para a inseminação intrauterina (Artigo 1- Tabela 3).

Baldassarre et al. (2003) utilizaram 5×10^3 espermatozoides para a fertilização *in vitro* de oócitos de cabras. Logo, a REC ou RECMT encontrada no presente trabalho são suficientes para utilização em inseminação artificial intrauterina e FIV de ovinos.

Ainda que a REC e RECMT sejam suficientes para FIV e IA intrauterina, seria interessante incrementar as recuperações após seleção espermática em soluções coloidais, para isso são necessários estudos que procurem padronizar as concentrações das amostras processadas, alterar as propriedades físicas dos coloides e melhorar os protocolos de centrifugação. A variação da intensidade de força *g* de centrifugação parece ter mais efeito na recuperação dos espermatozoides, quando comparado ao tempo de centrifugação (CARVAJAL et al., 2004).

As membranas espermáticas exercem funções específicas no espermatozoide, e sua integridade está intimamente relacionada à capacidade de fecundar. A membrana plasmática é responsável pela homeostase celular e serve de limite externo para a célula espermática (BORGES et al., 2011). As sondas fluorescentes vêm trazendo novos meios de análise das ultraestruturas celulares e da sua fisiologia. A citometria de fluxo é usada, com vantagens, sobre o microscópio de epifluorescência, para analisar várias sondas simultaneamente e aumentar a rapidez e acurácia das análises (MARTINEZ-PASTOR et al., 2010; ARRUDA et al., 2011).

A capacitação espermática é um requisito necessário para que o espermatozoide esteja apto a fecundar. Durante este processo, a membrana plasmática sofre alterações que vão permitir a reação acrossomal verdadeira, constituída pela fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática e consequente liberação de enzimas proteolíticas presentes no acrossoma, possibilitando a passagem do espermatozoide através da zona pelúcida do ovócito (ARRUDA et al., 2012). Dentre as alterações sofridas pelo espermatozoide no processo de capacitação é possível citar a depleção da relação entre colesterol e fosfolípido na superfície espermática, maior fluidez de membrana, desestabilização de membrana plasmática, influxo de íons de

cálcio, aumento das concentrações de AMP cíclico e aumento do pH intracelular (BORGES et al., 2011).

No presente estudo, foi avaliada a média da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo não reagido, utilizando a associação de sonda FIT-PSA/IP. Nos métodos utilizando sílica coloidal-silano, a proporção desta categoria de células foi maior, quando comparado aos métodos utilizando sílica coloidal-PVP, ainda que a sílica coloidal-PVP tenha sido eficiente na seleção destas células quando comparado às amostras de sêmen não selecionadas. Este dado, associado ao aumento da MT e MP nos protocolos utilizando sílica coloidal revestida de silano, vai ao encontro aos resultados de outros autores (SAMARDZIJA et al., 2006; JOHANISSON et al., 2009; JIMENEZ-RABADAN et al., 2012; DORADO et al., 2013).

Os métodos de seleção também foram eficientes na diminuição da incidência de categorias de células indesejáveis (membrana plasmática íntegra com acrossomo reagido e membrana plasmática lesada com acrossomo não reagido), com exceção da centrifugação em sílica coloidal-PVP 4mL. Como mencionado anteriormente, o método utilizando 4mL de sílica coloidal-PVP foi o único a não incrementar as médias de MT e MP. É possível que este método não tenha sido efetivo na seleção de subpopulações espermáticas com vantagens qualitativas. Os resultados podem ter sofrido interferência do tempo e intensidade de centrifugação, qualidade da amostra antes da centrifugação, efeito da solução de lavagem após a seleção espermática ou preparação da solução coloidal, entre outros. Nenhum dos métodos foi eficiente em diminuir a porcentagem de células com membrana plasmática lesada e acrossomo reagido. Casari et al (2006) relataram que a sílica coloidal-PVP não foi eficiente em reduzir a população de espermatozoides bovinos com acrossomo reagido, e aponta a origem do sêmen, congelado e descongelado, como principal razão para esta constatação.

O método utilizando 1mL de sílica coloidal-silano foi o único eficiente em diminuir patologia espermática de acrossomo, sendo que a patologia de cauda ou presença de cabeça isolada não diferiu entre antes e após a centrifugação. Este resultado foi similar ao de outros autores (MORRIS et al., 2003;

GUTIERREZ-CEPEDA et al., 2011; MARTINEZ- ALBORCIA et al., 2013), que não encontraram diferença significativa na morfologia após seleção espermática.

Não foi possível observar relação entre a quantificação de reação acrossomal na patologia e no uso do FIT-PSA. Existem duas possibilidades para a reação acrossomal: a verdadeira é quando o espermatozoide está em fase de capacitação e ocorreu a fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática espontaneamente, e a segunda é quando a célula espermática perde o acrossoma por já ter havido a morte celular (ARRUDA et al., 2011). O FIT-PSA se liga aos receptores da membrana acrossomal externa no momento em que esses receptores são expostos, sendo muito mais precoce que a observação da extrusão acrossomal feita na avaliação da morfologia espermática.

No presente estudo, os protocolos utilizando a sílica coloidal-silano apresentaram as maiores médias de espermatozoides com estabilidade de membrana, sendo superiores aos métodos utilizando sílica coloidal-PVP e às amostras analisadas antes da seleção espermática. Logo, o presente estudo corrobora com o trabalho de Hallap et al. (2006), que relataram que a estabilidade de membrana plasmática está relacionada à motilidade, morfologia normal de cabeça e integridade de membrana plasmática. Já foi relatado que a passagem dos espermatozoides através da sílica coloidal-PVP promove a retirada de proteínas presentes na membrana plasmática. Essas proteínas evitam a desestabilização da membrana plasmática e consequente reação acrossomal precoce (CESARI et al., 2006). É possível que a passagem em sílica coloidal-silano, por ser composta por apenas uma fase, não seja tão agressiva aos espermatozoides e evite a extração destas proteínas, explicando a maior estabilidade de membrana e menor reação acrossomal observada nessas amostras.

Todos os métodos foram eficientes em eliminar células espermáticas mortas, sendo que os métodos utilizando sílica coloidal-silano foram mais eficientes nesta seleção. A eliminação de debris celulares e espermatozoides com morfologia alterada contribuem para a diminuição de geração de ROS no

esperma (BORGES et al., 2011; MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). Autores relataram a diminuição de geração de ROS após seleção espermática em DLC ou SLC (MORREL et al., 2013).

As SLC têm se destacado nas pesquisas por apresentarem a mesma eficiência que os DLC (MORREL et al., 2013) com benefícios práticos, porém, o que foi possível observar neste trabalho é que a sílica coloidal-silano têm eficiência superior à sílica coloidal-PVP na seleção espermática de sêmen ovino criopreservado. A sílica coloidal-silano foi mais eficiente em selecionar sêmen com maior MT, MP, %RAP, integridade e estabilidade de membrana plasmática e menor porcentagem de células com reação acrossomal ou mortas. Ao testarmos variações de volume dos coloides nos métodos, foi possível observar que os métodos com volumes menores foram ainda mais eficientes que os métodos utilizando 4mL de solução coloidal. Machado et al (2010) propuseram diminuir o volume de Percoll[®] utilizado na seleção espermática de bovinos e observou que essa alteração era possível sem comprometer os resultados pós-seleção.

CONCLUSÕES FINAIS

A utilização de soluções coloidais para seleção de sêmen congelado e descongelado de ovinos incrementa a qualidade espermática. Ao comparar as soluções de sílica coloidal revestida por silano ou PVP, a solução revestida por silano apresenta maior seletividade para MT, MP, integridade e estabilidade de membrana plasmática e diminuem a porcentagem de células com reação acrossomal e células inviáveis. A sílica coloidal-PVP tem maior recuperação e seleciona amostras de semen com maior integridade de membrana plasmática e menor incidência de espermatozoides mortos. Entre os métodos utilizando sílica coloidal-silano, o que utiliza o volume de 1mL foi o único método eficiente na diminuição da incidência de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossoma não reagido.

São necessários estudos que comprovem a efetividade do semen ovino selecionado em sílica coloidal-silano na fertilização de ovócitos *in vitro* e *in vivo* e que esclareça lacunas que permaneceram.

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; MATA-CAMPUZANO, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; PAZ, P. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram sêmen. *Theriogenology*, 77, 1111–1118, 2012.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25, 317-325, 2004.

ANJA, S., LOVE, C., BALL, B. A. Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved-Thawed Equine Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p. 547-551, 2013.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F. ; OLIVEIRA, L.Z. ; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 145-151, 2011.

ARRUDA, R.L.; ORROS, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 168-184, 2010.

BALDASSARRE, H., WANG, B., KAFIDI, N., GAUTHIER, M., NEVEU, N., LAPOINTE, J., SNEEK, L., LEDUC, M., DUGUAY, F., ZHOU, J.F., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 59, p.831-839, 2003.

BATISTA, A.M., SILVA, S.V., SOARES, A.T., MONTEIRO JR, P.L.J., WISCHRAL, A., GUERRA, M.M.P. Comparison of CapriPure and Percoll density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Animal. Reprod.*, v.8, p.81-84, 2011.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Veterinaarmed*, v.25, p.382-391, 1973.

BORGES, J.C., SILVA, M.R., GUIMARÃES, J.D., ESPER, C.R., FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, n.3, p.303-314, 2011.

BRAVO, J.A.; MONTANERO, J.; CALERO, R.; ROY, T. J. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal Reproduction Science*, 129, 22– 29, 2011.

BUCCI, D., SPINACI, M., MORREL, J., VALLORANI, C., TAMANINI, C., GUIDETTI, R., GALEATI, G. Effects of single layer centrifugation with Androcoll-P on boar sperm. *Animal Reproduction Science*, v.138, p. 276-281, 2013.

CAMARA, D.R., GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.33-40, 2011.

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

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p. 479-488, 2007

CESARI, A., KAISER, G.G, MUCCI, N., MUTTO, A., VICENTI, A., FORNÉS, M.W., ALBERTIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*, v.66, p.1185-1193, 2006.

CHEUQUEMA C., P. BRAVO, F. TREULE, L.C. GIOJALAS, J. VILLEGAS, R. SANCHEZ, J. RISOPATRO. Sperm Membrane Functionality in the Dog Assessed by Flow Cytometry. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.39–43, 2012.

CORDELLI, E., ELEUTERI, P., LETER, G., RESCIA, M., SPANO, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, v.72, p.273-279, 2005.

CSEH, S., FAIGL, V., AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v.130, p.187-192, 2012.

DEL OLMO, E., BISBAL, A., MAROTO-MOLARES, A., GARCÍA-ALVAREZ, O., RAMON, M., JIMENEZ-RABADAN, P., MARTÍNEZ-PASTOR, F. SOLER, A.J., GARDE, J.J., FERNANDEZ-SANTOS, M.R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science*, v.138, p.102-109, 2013.

DORADO, J., ALCARÁZ, L., DUARTE, N., PORTERO, J. M., ACHA, D., HIDALGO, M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradiente. *Animal Reproduction Science*, v.125, p.211-218, 2011.

DORADO, J., ALCARAZ, L., GÁLVEZ, M. J., ACHA, D., ORTIZ, I. URBANO, M., HIDALGO, M. Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog sêmen. *Animal Reproduction Science*, v.140, p.232-240, 2013.

FALLEIROS, M. B., BICUDO, S. D., RODELLO, L., MONTEIRO, C. D., SAKASHITA, S. M., WEISS, R. R. Implicações do uso do extrato de LBD(Lipoproteína de baixa densidade) ou gema de ovo “purificada”, sobre a motilidade e morfologia espermática

no sêmen ovino refrigerado por 24 ou 48 horas. Veterinária e Zootecnia, v.20(2), p.307-317, 2013.

FOSTER, M.L., LOVE, C.C., VARNER, D.D., BRINSKO, S.P., HINRICHS, K., TEAGUE, S., LACAZE, K., BLANCHARD, T.L. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. Theriogenology, v.96, p.334-341, 2011.

FREOUR, T., JEAN, M., MIRALLIE, S., DUBOURDIEU, S., BARRIÈRE, P. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v.149, p.186–189, 2010.

GARCIA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., RÁMON, M., DEL OLMO, E., MONTORO, V., DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E., BISBAL, A., JIMÉNEZ-RABADÁN, P., PÉREZ-GUZMÁN, M.D., SOLER, A.J. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. Theriogenology, v.74, p.979-988, 2010.

GIL, J., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and diferente extenders on post-thaw sperm quality of ram sêmen. Theriogenology, v. 54, p.93-108, 2000.

GILLIAN, 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.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L., FERNÁNDEZ, A., CRESPO, F., GOSÁLVEZ, J., SERRE, C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. Animal Reproduction Science, v. 124, p. 85-89, 2011.

HALLAP, T., NAGY, S., JAAKMA, U., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing Membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. Theriogenology, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fert, 88, 343-352, 1990.

HISHINUMA M. E SEKINE J. Separation of canine epididymal Spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. Theriogenology, v. 61, p.365-372, 2004.

JIMÉNEZ-RABADAN, P., MORREL, J.M., JOHANNISSON, A., RAMÓN, M., GARCÍA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., ÁLVARO-GARCÍA, P.J., PÉREZ-GÚZMAN, M.D., FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R., GARDE, J.J., SOLER, A.J. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtiberica buck sêmen. Animal Reproduction Science, v.136, p.47-54, 2012.

- JOHANNISSON, A., MORRELL, J. M., THORÉN, J., JONSSON, M., DALIN, A.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.119-128, 2009.
- MACHADO, G.M., CARVALHO, J.O., SIQUEIRA FILHO, E., CAIXETA, E.S., FRANCO, M.M., RUMPF, R., DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 71, p. 1289-1297, 2009.
- MAIA M.S., BICUDO, S. D., SICHERLE, C. C., RODELLO, L., GALLEGOS, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p.118-123, 2010.
- MAIA, M.S., BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MAKKAR, G., HUNG-YU, N.G., YEUNG, S.B., HO, P.C. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. *Fertility and sterility*, v. 72, n.5, p.796-802, 1999.
- MARTÍ, E., PÉREZ-PÉ, R., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.27, n.6, 2006.
- MARTINEZ-ALBORCIA M. J., MORREL, J. M., GIL, M. A., BARRANCO, I., MASIDE, C., ALKMIN, D. V., PARRILLA, I., MARTINEZ, E. A., ROCA, J. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.140, p.173-179, 2013.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M. J., MORREL, J. M., PARRILLA, I., BARRANCO, I., VÁZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., ROCA, J. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. *Theriogenology*, v.78, p.1117-1125, 2012.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 84, 121–133, 2004.
- MEARA, C.M., HANRAHAN, J.P., PRATHALINGAM, N.S., OWEN, J. S., DONOVAN, A., FAIR, S., WARD, F., WADE, M., EVANS, A.C.O., LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.69, p.513-522, 2008.

MEHMOOD, A., ANWAR, M., SAQLAN NAQVI, S.M., Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradiente method from frozen-thawed buffalo sêmen. *Animal Reproduction Science*, v.111, p.141-148, 2009.

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

MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v.105, p.104-118, 2008.

MORREL, J. M., WINBLAD, C., GEORGAKAS, A., STUHTMANN, G., HUMBLLOT, P., JOHANNISSON, A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *ANIMAL Reproduction Science*, v.140, p.62-69, 2013.

MORRIS, L.H.A., RANDALL, A.E., KING, W.A., JOHNSON, W.H., BUCKRELL, B.C. The contribution of the male to ovine embryogenesis in an in vitro embryo production system. *Animal Reproduction Science*, v.75, p. 9-26, 2003.

MORTIMER, S.T. E MAXWEL, W. M. C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod. Fertl. Dev.*, v.11 , p.25-30, 1999.

NUR, Z.; ZIK, B.; USTUNER, B.; SAGIRKAYA, H.; OZGUDEN, C. G. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73, 1267–1275, 2010.

PARRISH, J.J., KROGENAES, A., SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, v.44, p.859-869, 1995.

PEÑA, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, v.61, p.63-70, 2004.

PEREIRA, K. F.; GARCIA, A. R.; NAHÚM, B. S.; KAHWAGE, P. R. USO DE SONDAS DE EPIFLUORESCÊNCIA PARA A AVALIAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO BUBALINO. XVI Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 2012.

PEREZ, S. M., CHAN, P.J., PATTON, W.C., KING, A. Silane-Coated Silica Particle Colloid Processing of Human Sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 14, n. 7, p. 388-393, 1997.

RHO, G. J., HAHNEL, A. C., BETTERIDGE, K. J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*, v.56, p.503-516, 2001.

RODELLO, L., BICUDO, S. D., FALLEIROS, M. B., MONTEIRO, C. D., SAKASHITA, S. M. Implicações da redução na concentração de gema de ovo no meio glicina-gema-leite sobre a cinética, morfologia e integridade de membranas espermáticas em sêmen ovino criopreservado. *Veterinária e Zootecnia*, v.18(2), p239-248, 2011.

RODRIGUEZ VILLAMIL, P., WEI, H., MOREIRA, G., CACCIA, M., FERNANDEZ TARANCO, M., BÓ, G.A. Fertilization rates and *in vitro* embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. *Theriogenology*, v.78, p.165-171, 2012.

SALAMON, S. e MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p. 77-111, 2000.

SAMARDZIJA M., KARADJOLE, M., MATKOVIC, M., CERGOLJ, M., GETZ, I., DOBRANIC, T., TOMASKOVIC, A., PETRIC, J., SURINA, J., GRIZELJ, J., KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, v.91, p.237-247, 2005.

SICHERLE, C.C., MAIA, M.S., BICUDO, S.D., RODELLO, L., AZEVEDO, H.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*, v.95, p.144-149, 2011.

SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.

SJUNNESSON, Y. C. B., MORREL, J. M., GONZÁLEZ, R. Single layer centrifugation-selected boar spermatozoa are capable of fertilization in vitro. *ACTA Veterinaria Scandinavica*, v.55, p.1-6, 2013.

THYS, M., VANDAELE, L., MORREL, J.M., MESTACH, J., VAN SOOM, A., HOOGHEWIJS, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In vitro Fertilizing Capacity of Frozen-thawed Bull Spermatozoa Selected by Single-layer (Glycidoxypyltrimethoxysilane) Silane-coated Silica Colloidal Centrifugation. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p.390-394, 2009.

TSAKMAKIDIS I. A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, v.92, p.126–130, 2010.

YÁNIZ, J. L.; VICENTE-FIEL, S.; CAPISTRÓS, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology*, 77, 1343–1350, 2012.

ANEXO 1
“HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3”

ANALYSIS SETUP – RAM		
IMAGE CAPTURE		
Frames Per Sec.	60 Hz	
No. Of Frames	30	
CELL DETECTION		
Minimum Contrast	60	
Minimum Cell Size	5pix	
DEFAULTS (if < 5 Motile Cells)		
Cell Size	5pix	
Cell Intensity	55	
PROGRESSIVE CELLS		
Path Velocity (VAP)	75 μ/s	
Straightness (STR)	80%	
SLOW CELLS		
Slow Cells	Static	
VAP Cutoff	21,9 μ/s	
VSL Cutoff	6,0 μ/s	
STATIC GATES (on QC Plots)		
MINIMUM		MAXIMUM
0,25	Static intensity gates	1,5
0,60	Static size gates	8,00
0	Static elongation gates	95
CALIBRATION		
Magnification	1,95	
VIDEO SOURCE		
Frequency	60 Hz	
Field	Dark	
ILUMINATION		
Intensity	2.400	
Photometer	Low	73
	High	125
ANALYSIS CHAMBER		
Chamber type	Makler	
Chamber depth	10μ	
Stage position	14,3mm	
Field selection	Automatic	
Set stage temperature	37°C	

ANEXO 2

Anexo 2- Formulação do diluidor glicina, 5% de gema de ovo e leite (GGL5%).
(Rodello et al., 2011)

COMPONENTE	VOLUME
Fração I	
Solução A+B em partes iguais (mL)	75
Gema de ovo (mL)	5
Orvus Es Paste – OEP – Procter & Gambler (mL)	0,4
Leite desnatado 11% - La Serenissima (mL)	15
Água destilada (mL)	4,6
Fração II	
Solução A+B em partes iguais (mL)	69
Gema de ovo (mL)	5
Orvus Es Paste – OEP (mL)	0,4
Leite desnatado 11% (mL)	15
Glicerol – Sigma, G2025 (mL)	10
Solução A	
Glicina – Sigma, G7126	1,4g
Citrato de Sódio – Sigma, S4641	2,97g
Água destilada	100mL
Solução B	
Frutose – Sigma, F3510	3g
Amicacina	0,04g
Água destilada	100mL

ANEXO 3

ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan
University of Melbourne
Veterinary Clinical Centre
250 Princess Highway
VIC 3030 Werribee, Australia
k.macmillan@unimelb.edu.au

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.
Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical

or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep>.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's

name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves

separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should

also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the

material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticleservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

ANEXO 4

• THERIOGENOLOGY - GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)

2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Theriogenology*.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Open Access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY NC SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Creative Commons Attribution (CC-BY): available only for authors funded by organizations with which we have established an agreement with. For a full list please see www.elsevier.com/fundingbodies

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. www.elsevier.com/fundingbodies

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The Open Access publication fee for this journal is \$USD 2,500, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy
www.elsevier.com/openaccesspricing

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-

submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. **Submit your article** Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close connection with any of the authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION

Use of word-processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section should

generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or a Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of review and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics.

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Please see *Additional Style Notes* below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
 - For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
 - Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
 - Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
 - Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g.,
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 &Mg;g im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125

- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 α	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min
 dpm - disintegrations per min
 g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h - hour
 kg - kilogram
 L - liter
 mL - milliliter
 μ L - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio

wk - week
wt/vol - weight per volume
y - year

Routes of treatment

id - intradermal
im - intramuscular
iu - intrauterine
iv - intravenous
sc - subcutaneous
po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
CV - coefficient of variation
df - degrees of freedom
F - variance ratio
NS - not significant
P - probability
SD - standard deviation
SEM - standard error of the mean
r - correlation coefficient
 r^2 - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012