

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

SELEÇÃO ESPERMÁTICA DO SEMÊN EQUINO E SUAS APLICAÇÕES

ANNA BETTINA ALTMEIER

PORTO ALEGRE 2018/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

SELEÇÃO ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO E SUAS APLICAÇÕES

Autora: Anna Bettina Altmeier

**Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado à Faculdade de
Veterinária da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de Médico
Veterinário.**

Orientador: Gustavo H Z Winter

PORTO ALEGRE 2018/2

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, o agradecimento vai para Deus que tudo criou, se hoje foi possível chegar onde cheguei, é graças a Ele.

Agradeço a minha família sempre foi a minha base, o meu porto seguro. Minha mãe Ana Carine Michalosky, minha avó Marly Zimmer e minha tia Ana Caroline que sempre deram todo o apoio que foi necessário, tenha sido ele financeiro ou emocional. Estavam de prontidão em tempo integral desde o início da minha vida, mas principalmente nesses anos de faculdade. O meu muito obrigada.

Ao REPROLAB que foi a chave de muitas portas, assim como seus integrantes, meus amigos. Veronica, Gustavo, Henrique, Giovane, Gabriel, Luiz, Marília, Luzia, Johanna, Luciana, Cesar, Taciane, Leonardo, Paula, Rogan, Dominique, Sabrina, Barbara, Mariana, Caroline, Natália, Tomaz, Matheus, Juliana, Vinicius e Vanessa. E não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a quem sempre me orientou durante meu estágio e em outros trabalhos desenvolvidos no Reprolab, nos últimos quatro anos, transmitindo todo seu conhecimento, muito obrigada Professor Rodrigo Costa Mattos.

Aos meus amigos que estavam mais perto ou mais distantes, mas que de uma forma ou outra participaram do meu dia a dia. As melhores amigas que eu poderia ter feito na graduação Carolina Hatwig, Gabriela Behnck e Giulia Zanardo que me acompanharam do início ao fim. As amigas que fiz ao longo da graduação e que são muito especiais Annelise Zabel, Ana Paula, Ana Carolina, Camila Alves, Giuliana Marques, Isadora Comparsi, Livia Adams, Luana Garcia, Marina Hiller e Patrícia Cesca. São poucas as palavras para dizer o quanto vou ser grata a vocês por fazerem parte da minha vida

Ao Laboratório de Reprodução Equina da Universidade Nacional de Rio Cuarto, Professor Doutor Luis Losinno e toda sua equipe de veterinários e colegas de estágio que me proporcionaram meses intensos de vivência com o que eu mais gosto. Muito obrigada por todos ensinamentos e oportunidades.

Agradecimentos também ao meu orientador de monografia, Prof. Gustavo Winter, pela convivência e por todo conhecimento transmitido.

Não importa o que aconteça, continue a nadar

Walters Graham

Procurando Nemo (2003)

RESUMO

Na espécie equina a seleção dos reprodutores não é realizada baseada nas características reprodutivas, mas através de fatores fenotípicos e performance atlética. A isto associado ao fato de que muitos reprodutores com idade avançada (>18 anos) permanecem em atividade reprodutiva. Existindo conseqüentemente a necessidade de se utilizar estratégias para aumentar a qualidade do sêmen e fertilidade destes animais. A seleção espermática é uma técnica que vem sendo largamente utilizada para aumentar a qualidade e fertilidade do sêmen fresco de garanhões e a resistência de seus espermatozoides à refrigeração e congelação. Esta técnica consiste em separar os espermatozoides com motilidade progressiva e sem alterações de morfologia do resto do ejaculado. Dessa forma, este trabalho de conclusão de curso retrata as diferentes formas de seleção espermática e suas aplicações.

Palavras-chave: garanhão, sobrevivência espermática, motilidade progressiva, espermatozoides viáveis

ABSTRACT

In the equine species breeding selection is not performed based on reproductive characteristics, but through phenotypic factors and athletic performance. This is associated with the fact that many breeding animals with advanced age (> 18 years) remain in reproductive activity. There is therefore a need to use strategies to increase the semen quality and fertility of these animals. Sperm selection is a technique that has been widely used to increase the quality and fertility of fresh stallion semen and the resistance of its spermatozoa to refrigeration and freezing. This technique consists in separating the spermatozoa with progressive motility and without alterations of morphology of the rest of the ejaculate. Thus, this work of course completion portrays the different forms of sperm selection and its applications.

Keywords: stallion, sperm survival, progressive motility, viable spermatozoa.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1 - Materiais necessários para centrifugação por gradiente de densidade	13
Figura 2 - Etapas para a realização da centrifugação de camada única	16
Figura 3 - Métodos de centrifugação coloidal	17
Figura 4 - Materiais para filtração	20
Figura 5 - Materiais necessários para filtração SpermFilter	20
Figura 6 - Sperm Filter	21
Figura 7 - Desenho esquemático do dispositivo de filtração/migração	22
Figura 8 - Passo a passo da separação espermática por Nano-partículas magnéticas	24
Quadro 1 - Vantagens da Centrifugação de Camada Única sobre a Centrifugação por	15

LISTA DE ABREVIACOES

CC - Centrifugação coloidal

DGC - Centrifugação por gradiente de densidade

IA- Inseminação artificial

Mv - Milivolt

NP - Nanopartículas

PMS - Espermatozoides com motilidade progressiva

PS - Plasma seminal

PVP - Polivinilperrolidona

ROS - Espécies reativas de oxignio

SLC - Centrifugação de camada única

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MÉTODOS DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA	11
2.1 Centrifugação coloidal (CC).....	11
2.1.1 Centrifugação por Gradiente de Densidade (DGC)	12
2.1.2 Centrifugação de camada única (SLC).....	13
2.2 Migração	17
2.2.1 Migração e sedimentação	18
2.3 Filtros.....	18
2.4 Migração/Filtração.....	21
2.5 Seleção e sexagem por nano-partículas magnéticas	22
3 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Como os garanhões são escolhidos para reprodução com base na excelência da competição, em seu antecedente genético, desempenho, conformação ou genealogia e não na qualidade espermática, a fertilidade e a congelabilidade dos espermatozoides são altamente variáveis, apesar do desenvolvimento de diferentes protocolos de congelamento (LOOMIS *et al.*, 2007). Isto não é visto em animais de produção porque os machos para produção de sêmen nestas espécies são selecionados pela sua qualidade e viabilidade espermática. (LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2007; MORRELL *et al.*, 2008).

Infelizmente, depois que eles são escolhidos para uma carreira de criação, muitos desses garanhões são subfêrteis ou infêrteis, resultando em perdas econômicas e genéticas significativas para os criadores (BRINSKO *et al.*, 2007). Algumas formas de subfertilidade podem ter uma base genética, mas a infertilidade também está associada a situações de envelhecimento, programas de treinamento, manejo, fatores ambientais, medicamentos (como progestagenos, anabolizantes, anti-inflamatórios não esteroidais...), febre, doenças sistêmicas, traumas genitais... em que uma função reprodutiva inadequada causa baixa qualidade espermática em um garanhão de outra maneira fértil (VARNER *et al.*, 2008).

Assim, nos casos de alguns garanhões com sêmen de baixa qualidade, a única maneira de obter descendentes é selecionar os espermatozoides de melhor qualidade e usá-los para inseminações artificiais (IA) em dose baixa ou para produção *in vitro* de embriões. (COLLEONI *et al.*, 2011). Embora o número mínimo de espermatozoides em uma dose inseminante possa sofrer variação individual (SIEME *et al.*, 2004), a referência para a fertilização de éguas foi estabelecida em 500 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva (PMS).

Em um programa típico de inseminação artificial, essa dose varia de 250 a 500 milhões de espermatozoides, o que torna a seleção espermática viável para sua realização, visto que o número de espermatozoides reduz após sua utilização. Além disso, estudos recentes indicam que doses abaixo de 100 milhões de espermatozoides não reduzem a fertilidade (BRISKO, 2006; BRISKO, 2011), ou seja, se a seleção for eficiente e ficar com uma dose suficiente para realização da IA o uso da técnica é adequado.

Visto isto, vários métodos têm sido sugeridos para mimetizar a seleção de espermatozoides de boa qualidade no trato reprodutivo feminino. A filtração dos espermatozoides, ativa ou passiva, a partir do plasma seminal, imitando a migração dos espermatozoides para os cornos uterinos ou selecionando os espermatozoides mais aptos do

remanescente do ejaculado, como ocorre na junção útero tubárica *in vivo* (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Espermatozoides de alta qualidade devem ser selecionados antes da inseminação para melhorar a taxa de prenhez, dessa forma, técnicas laboratoriais, como: o gradiente de centrifugação ou o *swim-up* são usadas rotineiramente para a exclusão de espermatozoides imóveis e anormais. Este processamento é realizado para obter alíquotas ricas em espermatozoides de alta qualidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 2002). Estas técnicas requerem uma ou mais passagens por centrifugação (ENGEL *et al.*, 2001).

O objetivo da seleção espermática é uma melhora quantitativa e qualitativa do ejaculado quando comparado ao ejaculado nativo, evitando alterações físico-químicas dos espermatozoides (ENGEL *et al.*, 2001). A inseminação apenas de espermatozoides de alta qualidade selecionados antes da inseminação deve melhorar as taxas de prenhez (NIE *et al.*, 2003; MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

Esta monografia visa prover informação em forma de revisão bibliográfica sobre as diferentes formas de seleção espermática de gametas, além de proporcionar um levantamento de técnicas já relatadas para compará-las.

2 MÉTODOS DE SELEÇÃO ESPERMÁTICA

Logicamente, parece óbvio que bons embriões vêm de bons gametas. Espera-se que os mecanismos de seleção de espermatozoides dentro do trato reprodutivo feminino permitam apenas espermatozoides morfológicamente normais com membranas intactas e boa integridade da cromatina para passar para os ovidutos e fertilizar oócitos (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2010-2011). Foi sugerido que o uso de técnicas de preparação de sêmen *in vitro* que copiam essa seleção, isto é, biomimético (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009), poderia melhorar as taxas de prenhez, particularmente selecionando espermatozoides com boa integridade da cromatina.

As técnicas de seleção espermática permitem separar os espermatozoides de melhor qualidade do restante do ejaculado, como pode ocorrer na junção útero-oviduto e nos ovidutos *in vivo*, e também remover os espermatozoides do plasma seminal (PS), mimetizando assim o efeito dos espermatozoides migrando para longe do local de deposição de sêmen sob condições fisiológicas (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2010-2011). São elas: Centrifugação coloidal, migração, filtros, migração/filtração, seleção e sexagem por nano-partículas magnéticas.

2.1 Centrifugação coloidal (CC)

A centrifugação coloidal é uma técnica útil que tem sido usada há aproximadamente 18 anos para preparar espermatozoides equinos (MEYERS *et al.*, 1995). Esta, tem sido comprovada como útil para melhorar a qualidade por seleção dos melhores espermatozoides para diferentes espécies, começando com a centrifugação por gradiente de densidade e progredindo mais recentemente para a centrifugação de camada única. Seu uso é recomendado para melhorar a fertilidade de garanhões subfêrteis (GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2011).

Esta técnica centrifuga sêmen diluído através de camadas de um colóide de densidade variável, o que promove a separação do plasma e os espermatozoides viáveis. (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Durante esse processo, as células se moverão para o fundo do tubo ou para a posição de equilíbrio. Nesse ponto, as células podem ser separadas do plasma (PERTOFT, 2000), não sendo um método fisiológico de separação (MEHMOOD *et al.*, 2009).

O principal problema é que os atuais protocolos de CC de equinos usam um volume de centrifugação muito baixo (2-5ml de sêmen diluído, 1: 1) e uma alta quantidade de produto de centrifugação. Considerando que a média de sêmen no volume varia entre 40 e 150ml, teremos

que esperar usar entre 16 e 60 tubos de centrífuga (50ml) e 160-600ml de produto de centrifugação, o que não é clinicamente viável devido ao custo e às dificuldades técnicas inerentes ao processo (GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2011).

2.1.1 Centrifugação por Gradiente de Densidade (DGC)

Neste método, o sêmen diluído é centrifugado através de camadas de coloide, que efetivamente separa os espermatozoides do plasma seminal e também seleciona a subpopulação de espermatozoides. Durante a centrifugação através de um gradiente de densidade, as células se movem para o ponto no gradiente que corresponde à sua própria densidade – “*isopycnic point*” (PERTOFT, 2000). Ao alterar as condições de centrifugação (força g e tempo) e as propriedades físicas do coloide, um pellet de esperma é formado contendo os espermatozoides mais robustos e de boa qualidade. O DGC separa os espermatozoides móveis, morfológicamente normais e intactos à cromatina do resto do ejaculado. No entanto, só é possível processar pequenos volumes de ejaculação por este método (EDMOND AJ *et al.*, 2008) e a taxa de recuperação (rendimento) é frequentemente baixa (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 1997; MORRELL *et al.*, 2005).

O coloide mais utilizado no sêmen animal era o Percoll™, que consiste de partículas de sílica revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) em uma solução salina, usadas como duas ou mais camadas de diferentes densidades. Porém, durante a década de 1990, o Percoll™ foi reclassificado pelo fabricante como “apenas para fins de pesquisa (MORTIMER, 2000) provavelmente devido a problemas com níveis variáveis de endotoxina em diferentes lotes do colóide, embora também tenha havido relatos de suposta toxicidade por PVP livre no colóide (AVERY & GREVE, 1995).

Mais recentemente, alterações “parecidas com apoptose” foram identificadas em espermatozoides equinos após DGC com Percoll (BRUM *et al.*, 2008) Na última década, o Percoll™ foi substituído por colóides de sílica revestidos com silano para uso em reprodução assistida humana (MORTIMER, 2000), e algumas formulações espécies específicas para animais (MORRELL, 2006). Os colóides de sílica revestidos com silano têm as vantagens sobre os colóides revestidos com PVP de serem autoclaváveis, reduzindo assim os níveis de endotoxinas e de serem estáveis durante longos períodos em soluções salinas, permitindo assim que as formulações prontas para uso sejam comercializadas, o exemplo para ganho é o EquiPure™ (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

Para realizar a seleção espermática com o gradiente de densidade, um total de 1×10^9 espermatozoides devem ser concentrados em 5 mL de diluente comercial à base de leite desnatado, para isso pode-se utilizar a centrifugação convencional. Após isso, 5 mL do gradiente de densidade (Equipure) deve ser adicionado em um tubo de 15 mL. Os 5 mL com o sêmen concentrado devem ser cuidadosamente adicionados neste mesmo tubo, acima do gradiente de densidade. Para isso, pode-se utilizar uma pipeta tipo Pasteur, deslizando vagorosamente o sêmen através das paredes do tubo. É realizada uma centrifugação de 300 a 400 x g por 20 minutos e após isso os espermatozoides sem alterações morfológicas e com motilidade progressiva ficam depositados no fundo do tubo. O restante do ejaculado fica retido acima do gradiente de densidade. Com o auxílio de uma pipeta de 1mL, deve-se remover o pellet com os espermatozoides selecionados e diluí-lo com o meio apropriado. Espera-se uma perda de 40 a 60% do total de células durante após a seleção (ALVARENGA et. al 2017).

Figura 1 - Materiais necessários para centrifugação por gradiente de densidade (Equipure)



Fonte: adaptado de: <http://botupharma.com.br/produto/equipure/>, acesso 28/11/2018 22:00

2.1.2 Centrifugação de camada única (SLC)

Este método é uma simplificação do DCG, pois envolve a passagem de espermatozoides através de uma única camada de sílica colóide revestida com glicidoxipropiltrimetoxissilano (Androcoll-E; SLU, Uppsala, Suécia), evitando assim, a necessidade de preparar e colocar em camadas vários colóides de diferentes densidades. (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Além disso é mais conveniente e consome menos tempo do que a DGC, sendo mais versátil e permitindo que o método seja ampliado em tubos maiores sem comprometer a qualidade espermática nas preparações resultantes (MORRELL et al., 2009).

Para realizar a seleção espermática por centrifugação de camada única deve-se equilibrar o coloide e o sêmen diluído à temperatura ambiente para evitar o choque dos espermatozoides. Ajustar a concentração de espermatozoides para não mais que 100×10^6 / mL. Com cuidado, colocar até 4,5 mL de sêmen diluído em cima de 4 mL de Equicoll usando uma pipeta Pasteur. Usar uma centrífuga com um rotor basculante; centrifugar a 300 g durante 20 min. Remover o sobrenadante (plasma seminal, extensor de sêmen e a maior parte do coloide) usando uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não agitar o pellet de esperma. Deixar aproximadamente 2mm de coloide acima do pellet de espermatozoides. Usar uma pipeta limpa, aspirar o pellet de esperma debaixo do coloide. Adicionar o diluente ao grânulo de esperma para obter a concentração desejada de espermatozoides. O mesmo procedimento é utilizado para as outras variantes do SLC, diferindo apenas no tamanho do tubo, no tipo e volume do coloide e no volume de sêmen a ser utilizado. Para tubos de 50 mL, são utilizados 15 mL de coloide e até 20 mL de sêmen diluído. Para tubos de 500 mL, 150 mL de sêmen diluído e 150 mL de coloide são utilizados (MORRELL, 2016).

É importante adicionar o sêmen sobre o coloide, ao invés de injetar o coloide depois do sêmen por dois motivos: primeiro, colocar o sêmen no fundo do tubo permite que espermatozoides não selecionados, bactérias, e assim por diante, cubram o fundo do tubo, onde o sedimento de espermatozoides irá eventualmente se depositar, contaminando assim a amostra de esperma selecionado. Segundo a seleção eficiente só é obtida se houver uma interface nítida entre o coloide e o sêmen antes da centrifugação. Injetar coloide abaixo do sêmen causa perda de integridade da interface (MORRELL et al., 2012).

Foi comprovado que a qualidade espermática em ejaculados de garanhões “normais” foi melhorada por meio de centrifugação de camada única (SLC) usando Androcoll-E, um novo colóide espécie específico comercialmente disponível para espermatozoides equinos (MORREL et al., 2008) quando comparado com relatos de processamento de sêmen de garanhão de baixa qualidade com uma camada de Percoll que resultou em uma melhora na qualidade do esperma, embora não tenha havido melhora para os ejaculados “normais” (SIEME et al., 2003).

Demonstrou-se que a centrifugação de camada única (SLC) de espermatozoides melhora a qualidade das amostras de esperma de garanhões estendendo o “prazo de validade” das doses de espermatozoides para a IA e para melhorar a sobrevivência espermática durante a criopreservação. Como os espermatozoides podem ser separados dos vírus e bactérias no sêmen, pode ser possível aumentar a biossegurança das doses de sêmen de garanhões para a IA e reduzir potencialmente o uso de antibióticos. O SLC pode melhorar a criopreservação de

espermatozoides de garanhões e, portanto, pode desempenhar um papel no banco de genes ou na criação de conservação. (MORREL, 2012).

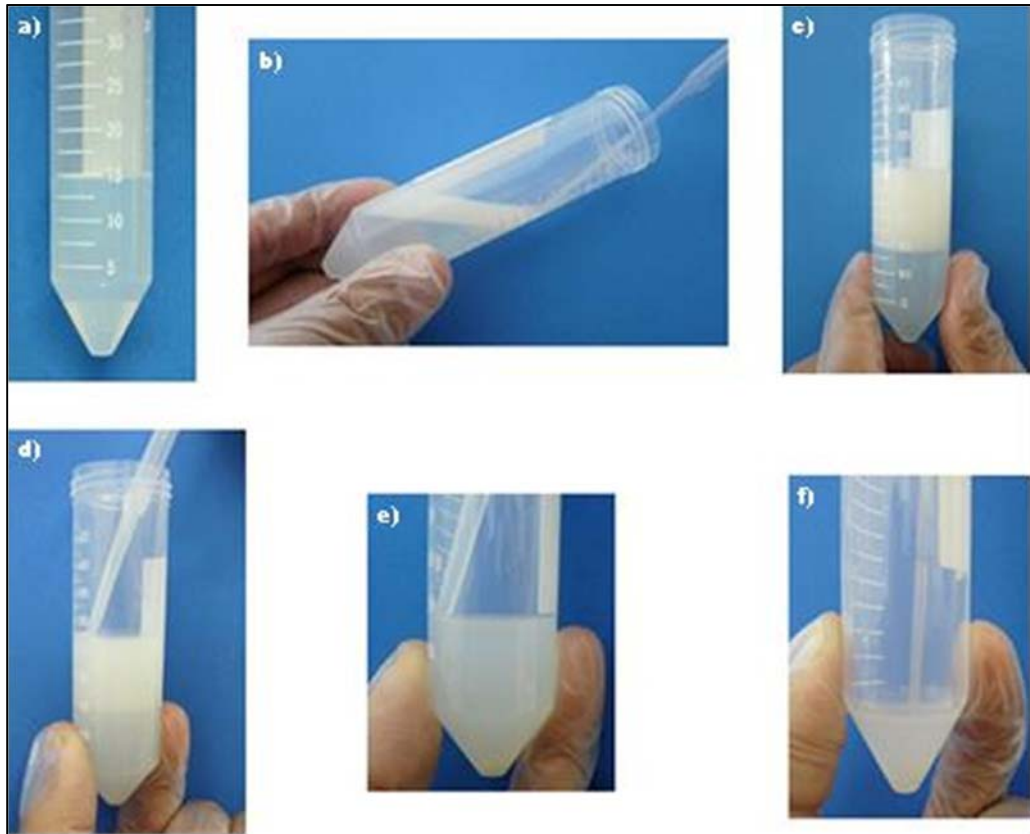
A vantagem de usar o rendimento de espermatozoides após o SLC como indicador de fertilidade potencial em relação à fertilidade subjetiva é que ele está relacionado a vários parâmetros de qualidade espermática, tais como integridade de cromatina espermática, integridade da membrana, motilidade e morfologia normal. Enquanto a motilidade subjetiva é uma estimativa de apenas um parâmetro, que varia consideravelmente entre os operadores individuais e é influenciada por outros fatores (MORRELL et al., 2014).

Quadro 1 - Vantagens da Centrifugação de Camada Única sobre a Centrifugação por Gradiente de Densidade

	SLC	DGC
Facilidade de estratificação	Sêmen no topo de uma camada de coloide	Sêmen no topo de várias camadas de coloide
Tempo de preparação	Menor que DGC	Mais longo, pois, possui mais camadas
Qualidade da preparação	Igual DGC	Boa
Aumento de escala	Mais fácil que para a DGC; mostrado ser possível para espermatozoides garanhão	Difícil por causa da estratificação de várias densidades diferentes de coloide
Taxa de recuperação	Pode ser maior que a DGC	Pode ser menor que a SLC

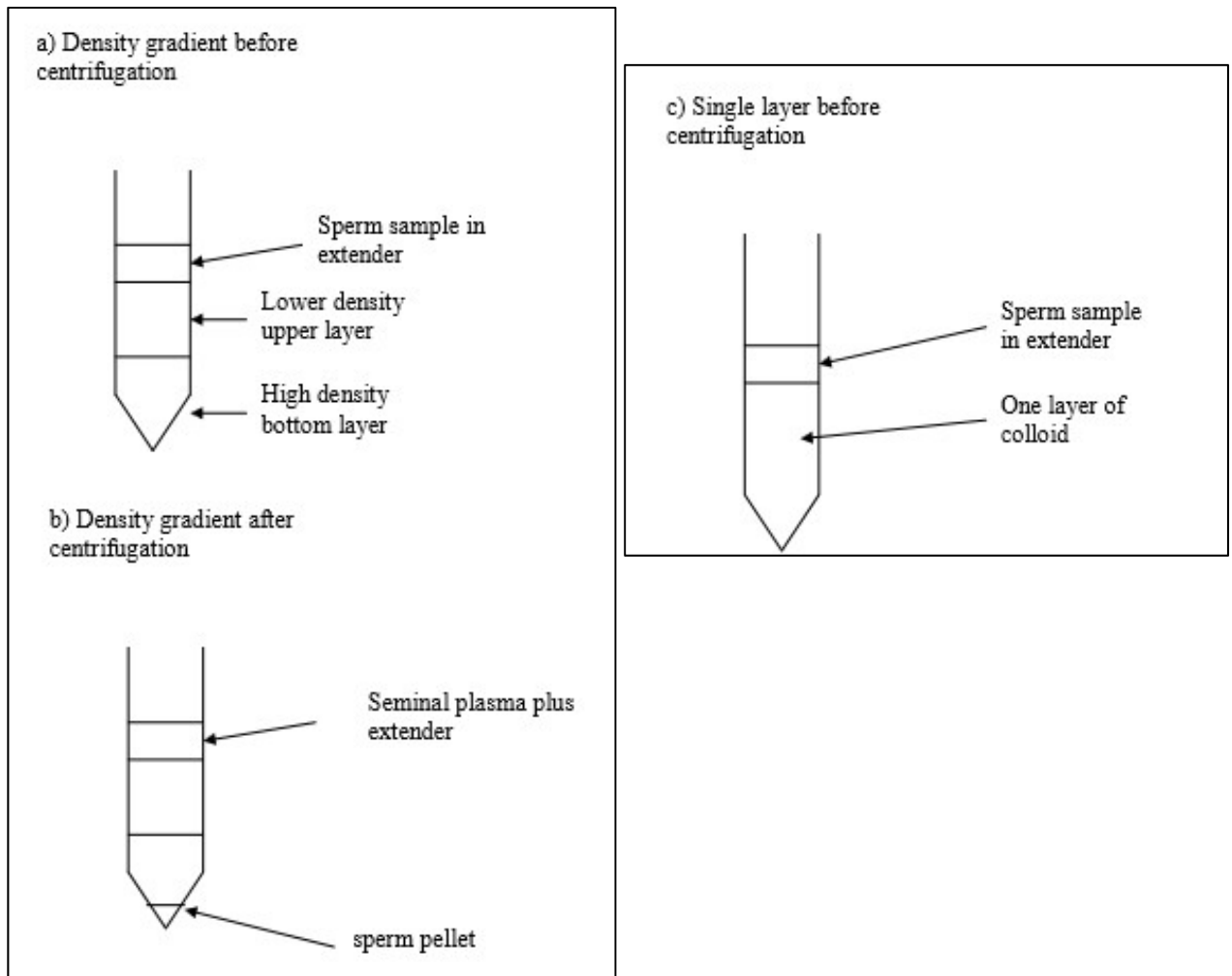
Fonte: adaptado de Morrell e Rodriguez (2009).

Figura 2 - Etapas para a realização da centrifugação de camada única



- a) Colocar 15 mL de coloide em um tubo de 50 mL;
- b) Adicionar 1 a 2 mL de sêmen diluído lentamente de uma pipeta Pasteur;
- c) Continuar adicionando o restante do sêmen lentamente, até 20 mL;
- d) Após a centrifugação, iniciar a retirada do diluente de sêmen;
- e) Quando todo diluente de sêmen e espermatozoides na interface tiverem sido removidos, se começa a aspirar o coloide;
- f) Remover o coloide até o último 1 a 2 mL; passar uma pipeta de Pasteur diretamente através do coloide remanescente para o pellet de esperma; aspirar o pellet de esperma de baixo do coloide. Fonte: Morrell e Nunes (2018).

Figura 3 - Métodos de centrifugação coloidal



Fonte: Morrell e Rodriguez-Martinez (2009).

2.2 Migração

A seleção por migração é baseada na capacidade dos espermatozoides serem móveis e, como tal, não fornece nenhuma seleção baseada na morfologia normal da cabeça, integridade da cromatina (espermatozoides com cromatina intacta), ou viabilidade e integridade acrossômica (SOMFAI *et al.*, 2002). Essa técnica consiste em centrifugar o sêmen até gerar um pellet celular, e o espermatozoide móvel migra desse pellet para o meio sobrenadante, de onde é coletado (METHA & SIGMAN, 2014). Os espermatozoides com anomalias na cauda, que impedem a sua capacidade de nadar, não migram para o meio de sobrenadante e alguns estudos mostram uma morfologia da cauda e da parte média significativamente melhor após a natação do que após a lavagem (HALLAP *et al.*, 2004). Além disso, a migração para ou através de meios contendo ácido hialurônico também pode selecionar espermatozoides com

membranas intactas (SHAMSUDDIN M, RODRIGUEZMARTINEZ H., 1994) e, portanto, a migração deve ser considerada como uma técnica de seleção em vez de uma técnica de separação.

Apesar de apresentar baixa taxa de recuperação, por exemplo: 10-20% (HALLAP *et al.*, 2004) e volume pequeno, a qualidade final do sêmen selecionado por migração será melhor pois terá mais espermatozoides morfolologicamente normais, sem outras células e detritos e menos espermatozoides mortos, aumentando assim sua viabilidade. O rendimento absoluto dos espermatozoides é baixo porque muitos espermatozoides potencialmente móveis nos níveis mais baixos do pellet nunca atingem a interface com o meio de cultura suprajacente.

Além disso, a peletização dos espermatozoides força o contato entre os espermatozoides, os detritos celulares e os leucócitos, deixando-os danificados ou anormais e produzindo assim altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem ser prejudiciais aos espermatozoides e podem contribuir para a redução da fertilidade ou problemas relacionados à preservação do sêmen. (METHA & SIGMAN, 2014).

2.2.1 Migração e sedimentação

A migração-sedimentação descrito por Tea *et al.* (1984) combina o procedimento de *swim-up* com um passo adicional de sedimentação e requer um tubo especial de vidro ou plástico com um cone interno. Os espermatozoides nadam diretamente do sêmen liquefeito para o meio sobrenadante e subsequentemente sedimentam no cone interno. A falta de um passo de centrifugação neste método reduz a exposição dos espermatozoides às ROS em comparação com o procedimento convencional de natação.

Outra vantagem da migração-sedimentação sobre o procedimento de *swim-up* é que ele seleciona espermatozoides condensados normalmente cromáticos, um parâmetro que é preditivo de fertilização *in vitro* (HAMMADEH ME *et al.*, 2001). Infelizmente, o rendimento de espermatozoides móveis é baixo, limitando a utilidade deste método, sendo assim utilizado majoritariamente em humanos (HENKEL RR & SCHILL WB, 2003).

2.3 Filtros

Os métodos de filtração dependem da propensão dos espermatozoides a aderirem às matrizes de filtração (METHA & SIGMAN, 2014). Diferentes técnicas de seleção de espermatozoides viáveis foram desenvolvidas a fim de reter espermatozoides de baixa

qualidade. Filtros de lã de vidro, Sephadex gel e membranas porosas são exemplos de técnicas de filtração em diferentes espécies (MOGAS *et al.*, 1998). A filtração em lã de vidro é a técnica de filtração mais comumente usada, na qual os espermatozoides móveis são separados das células imóveis por movimento através de fibras de lã de vidro densamente compactadas. Assim como a DGC, a filtração de lã de vidro usa todo o volume do ejaculado, proporcionando assim um bom rendimento de espermatozoides móveis (METHA & SIGMAN, 2014).

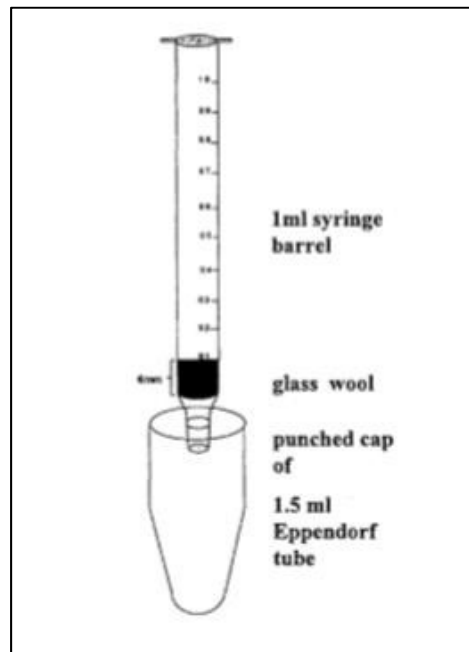
Nos ganhões pôneis, um aumento significativo dos parâmetros seminais foi mostrado ao usar o filtro de lã de vidro (PESSOA *et al.*, 2017). Este filtro liga o conteúdo corpuscular (proteínas, espermatozoides imóveis e células arredondadas de outras origens) às fibras da superfície do filtro de lã de vidro. Se a malha de fibra é muito densa, as células ainda irão aderir à superfície, mas não irão penetrar adequadamente as fibras de lã de vidro (ENGEL *et al.*, 2001).

A combinação de lã de vidro e filtração Sephadex para o sêmen congelado provou ter uma alta correlação com a fertilidade, pois as proteínas de membrana de ganhão fornecem aos espermatozoides com capacidade de se ligar ao Sephadex (SAMPER & CRABO, 1993; SAMPER *et al.*, 1995). A maior correlação de lã de vidro e Sephadex com a fertilidade é devido à capacidade dos filtros de remover células que apresentam alterações semelhantes à capacitação ou comprometimento da membrana do processo de congelamento-descongelamento (NEILD *et al.*, 2005).

Alvarenga *et al.* 2010 desenvolveram o SpermFilter que mostrou ser eficiente para a retenção e preservação da viabilidade do espermatozoide do ganhão, pois possibilita a remoção do plasma seminal de forma segura, minimizando os danos da centrifugação aos espermatozoides. O método consiste em colocar a amostra de sêmen dentro do filtro, separar o plasma em uma placa e posteriormente, os espermatozoides retidos são ressuspensos com um diluente até que a concentração de espermatozoides desejada por mililitro de sêmen seja atingida. Este filtro pode ser útil em situações em que uma centrífuga não está disponível.

Conclui-se que os filtros podem ser usados para concentrar os espermatozoides sem reduzir a motilidade e a viabilidade. Assim, a técnica é potencialmente útil, especialmente com sêmen de baixa qualidade, para separar os espermatozoides do plasma seminal e / ou diluente, concentrando os espermatozoides para congelamento e resfriamento e concentrando espermatozoides para baixa dose de IA (ALVARENGA *et al.*, 2010).

**Figura 4 - Materiais para filtração
lã de vidro**



Fonte: ENGEL *et al.*, (2001)

Figura 5 - Materiais necessários para filtração SpermFilter



Fonte: Adaptado de: <http://botupharma.com.br/produto/spermfilter/> acessado 26/11/2018 23:00

Figura 6 - Sperm Filter



Fonte: adaptado de: <http://botupharma.com.br/produto/spermfilter/> acessado: 27/11/2018 18:30

2.4 Migração/Filtração

Recentemente, um método diferente que combina o uso de uma membrana porosa e a capacidade de migração foi sugerida para o sêmen fresco. Esta técnica consiste em um dispositivo dividido ao meio por uma membrana porosa, e os espermatozoides móveis cruzam ativamente essa membrana. (LARENTIS *et al.*, 2018).

Trata-se de uma câmara diferente, com diâmetro interno de 26 mm, feita com dois cotovelos conectados por um tubo e dividido com um filtro de membrana sintética de poros de 5µm. Nela coloca-se leite desnatado a 37°C em um lado e no outro lado, uma amostra do sêmen, com número conhecido de espermatozoides, é depositada (Figura 4). Espera-se 7 ou 15 minutos e utiliza-se a amostra do lado do leite (LARENTIS *et al.*, 2018).

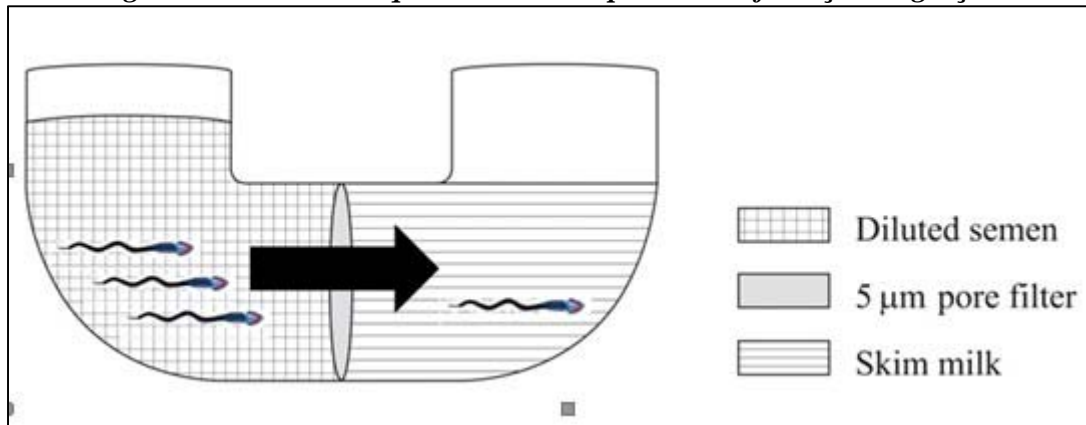
A inseminação artificial (IA) é a base para outras biotecnologias, desde a transferência de embriões até a clonagem (AURICH, 2012). Para conseguir uma prenhez bem-sucedida usando inseminação artificial, são necessários espermatozoides viáveis o suficiente para alcançar o local de fertilização. (MORRELL *et al.*, 2010). A seleção dos espermatozoides mais aptos a partir de uma amostra de sêmen cru melhora a qualidade da dose de IA e, portanto, é mais provável que atinja a fertilização (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

Nos procedimentos de seleção mencionados acima, um ou mais estágios de centrifugação são necessários para enriquecer os espermatozoides em uma amostra desejada (ENGEL *et al.*, 2001). Um dos principais problemas da centrifugação é a perda de aproximadamente 25% dos espermatozoides no líquido sobrenadante (LOOMIS, 2006). Efeitos adversos no sêmen de garanhão após a centrifugação também foram descritos (SIEME *et al.*, 2003; AURICH, 2008). Os espermatozoides danificados e anormais produzem maiores quantidades de ROS, o que pode contribuir para reduzir a fertilidade, ou problemas associados à preservação do sêmen (BALL *et al.*, 2001). As membranas espermáticas e os danos no DNA podem ser causados pelo estresse oxidativo, eventualmente convertendo o espermatozoide em um não viável. Filtros foram desenvolvidos para a remoção do plasma seminal, e a concentração de espermatozoides, na tentativa de evitar a questão dos danos da membrana plasmática que a centrifugação causa (ALVARENGA *et al.*, 2012).

Este método de seleção visa uma melhora quantitativa e qualitativa do espermatozoide quando comparado com o ejaculado nativo, e além disso, evita alterações mecânicas ou físico-químicas dos espermatozoides. Além disso como o método de seleção não precisa de centrífuga ou equipamento de laboratório, ele provou ser uma opção eficaz e viável para a seleção de espermatozoides (LARENTIS *et al.*, 2018). Integridade e funcionalidade da

membrana espermática, bem como cinética aumentada foram observadas após o uso do dispositivo de seleção (LARENTIS *et al.*, 2018).

Figura 7 - Desenho esquemático do dispositivo de filtração/migração



Fonte: modificado de Larentis *et al.* (2018).

2.5 Seleção e sexagem por nano-partículas magnéticas

Um método mais recente, que além de fazer a seleção faz a sexagem dos espermatozoides através de nano-partículas magnéticas vem ganhando força no mercado cavalo pois a predileção por sêmen sexado de garanhão é importante no ponto de vista da aplicação comercial, afetiva e da tecnologia na indústria equina (CASTEX, 2016). Nos cavalos de polo há uma demanda maior por fêmeas (PANARACE *et al.*, 2014), enquanto os machos são preferidos para corrida ou rédea. Nos leilões de cavalos de corrida pagam preços mais altos para machos do que para fêmeas. No oeste dos Estados Unidos, as fêmeas são preferidas como cavalos de sela para o gado, enquanto os machos são preferidos para cavalos de rédea. Na raça Quarto de Milha de corrida os preços pagos pelas fêmeas com um ano de idade, excedem em muito os preços dos machos (SAMPER *et al.*, 2012).

A tecnologia de separação magnética de células é um método para a preparação de espermatozoides usada recentemente na técnica de reprodução assistida. Esta tecnologia, tem mostrado que se pode separar espermatozoides com motilidade, viáveis e morfolologicamente normais que toleram significativamente a criopreservação e tem um melhor potencial de fertilização. Permite a separação de espermatozoides apoptóticos mesmo nos machos com parâmetros espermáticos normais (MAKKER *et al.*, 2008).

Segundo Chan *et al.* (20016) espermatozoides femininos possuem carga elétrica de -20 milivolts (Mv), enquanto os masculinos carregam carga de -16 Mv. A técnica baseia-se nessa

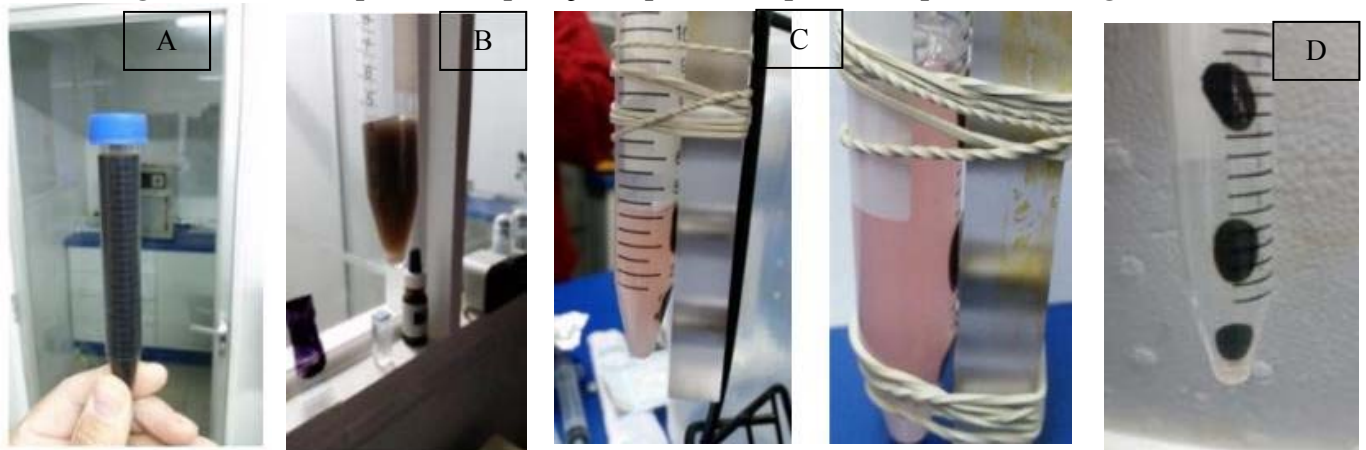
diferença de cargas entre as membranas espermáticas, utilizando nano-partículas magnéticas com carga suficiente para atrair apenas as células contendo o cromossomo Y (macho). As nanopartículas (NP) utilizadas são à base de magnetita e revestidas com sílica e possuem diâmetro de 50 nm, verifica-se se as esferas de nano-partículas magnéticas foram suspensas invertendo o tubo que as contém.

A suspensão formada por essas NPs é preta e deve ser homogeneizada antes de ser adicionada à solução espermática com meio. Uma proporção de 3: 1 (esferas: espermatozoides) deve ser usada. Coloca-se para incubar durante 4 minutos, e depois a parede do tubo é colocada em contato contra o ímã por 20 minutos. O ímã é composto por três zonas circulares magnéticas contidas numa estrutura de acrílico. NPs são carregados negativamente em meios onde o pH é de cerca de 7,0. Assim, os espermatozoides "Y" que têm uma carga positiva (menos potencial zeta negativo do que o SPZ X) no nível da membrana foram atraídos para essas esferas negativas e depois para as 3 zonas circulares magnéticas. Os espermatozoides "X" foram mantidos em suspensão sem aderir a essas áreas na parede interna do tubo. Após 20 minutos se coleta o esperma "Y" e se esvazia a solução do tubo, mesmo em suspensão, em um novo tubo de 15 ml (CASTEX, 2016).

De acordo com Castex, a sexagem por nano-partículas magnéticas garante a manutenção da qualidade do sêmen dos animais, oferecendo maior eficiência com menor custo, ao contrário de outras técnicas já disponíveis no mercado.

Naturalmente, a média de espermatozoides que carregam o cromossomo Y (macho) e o cromossomo X (fêmea) gira em torno de 50% cada. Depois do processo de sexagem do sêmen, a porcentagem de fêmeas na dose inseminante aumenta para 90%. Após o procedimento o sêmen pode ser utilizado a fresco, refrigerado por até 12 horas ou congelado para uso posterior (CASTEX,2016).

Figura 8 - Passo a passo da separação espermática por Nano-partículas magnéticas



Legenda: A) Suspensão Nano-partículas magnéticas; B) Adição Nano-partículas na suspensão e espermatozoides; C) Separação dos espermatozoides Y para o ímã; D) Áreas de nanopartículas e espermatozoides "Y" aderidas à parede do tubo posterior à coleta com o ímã.

Fonte: modificado de Castex (2016).

3 CONCLUSÃO

A técnica ideal de separação de espermatozoides foi postulada para ser rápida, fácil e econômica, isolar tantos espermatozoides móveis quanto possível, não causar danos ao sêmen, ou alterações não fisiológicas ao espermatozoide separado, eliminar espermatozoides mortos e outras células, incluindo leucócitos, eliminar substâncias tóxicas ou bioativas como fatores de decapacitação ou espécies reativas de oxigênio (ROS) e permitir o processamento de grandes volumes de ejaculados (HENKEL & SCHILL, 2003). Até o momento, nenhuma dessas técnicas descritas foi capaz de atingir todos esses objetivos e por essa razão pesquisas sobre esse assunto devem continuar sendo feitas.

Nenhum método de diagnóstico pode compensar o mal manejo dos espermatozoides, nem superar quaisquer problemas fisiológicos que a égua possa ter em ser capaz de conceber e levar a termo uma gestação. Nosso objetivo como veterinários é lidar com esses cenários, a fim de melhorar a qualidade do esperma e fertilidade dos cavalos com os quais vamos trabalhar podendo usar métodos como os descritos acima

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. *et al.* Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 424-429, 2012.
- ALVARENGA, M.; PAPA, F.; NETO, C. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Brasil reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 81-85, mar. 2017.
- AMANN, R.; HAMMERSTEDT, R. Detection of differences in fertility. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 317-325, 2002.
- AURICH, J. Artificial insemination in horses – more than a century of practice and research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 458-463, 2012.
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, v. 44, p. 871-878, 1995.
- BALL, B. *et al.* Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.
- BRISKO, S. Semen Collection Techniques and Insemination Procedures. In: McKINNON, A.; SQUIRES, E.; VAALA, W.; VARNER, D. (Eds.). Wiley-Blackwell: West Sussex. **Equine Reproduction**, 2 ed., v. 1, p. 1268-1277, 2011.
- BRISKO, S. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v. 66, p. 543-550, 2006.
- BRINSKO, S. *et al.* Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 65-71, 2007.
- BRUM, A.; SABEUR, K.; BALL, B. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density gradient centrifugation or after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 1041-1055, 2008.
- CASTEX, H. **Utilización de nano-partículas magnéticas para separar espermatozoides x de y en semen equino**. 2016. Tese (Mestrado) - Rio Cuarto, Argentina. 2016.
- CHAN, P.; JACOBSON, J.; CORSELLI, J.; PATTON, W. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 481-486, 2006.
- COLLEONI, S. *et al.* New Methods for Selecting Stallion Spermatozoa for Assisted Reproduction. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 31, p. 536-541, mar. 2011.
- EDMOND, A. *et al.* Effect of density gradient centrifugation on quality and recovery of equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, 2008.
- ENGEL, S. *et al.* An-improved method of sperm selection by glass wool filtration. **Andrologia**, v. 33, p. 223- 230, 2001.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L. *et al.* 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. *et al.* Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, p. 702-713, 2004.

HAMMADEH, M.; KUHNEN, A.; AMER A. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. **International Journal of Andrology**, v. 24, n. 6, p. 360-368, 2001.

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

LARENTIS, G. *et al.* Equine sperm selection by synthetic membrane filter. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 63, p. 69-73, 2018.

LOOMIS, P.; GRAHAM, J. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2007.

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

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. **Theriogenology**, v. 68, p. 1240-1250, 2007.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Magnetic activated cell sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 491-497, 2008.

METHA, A.; SIGMAN, M. Identification and preparation of sperm for ART. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, n. 1, p. 169-180, 2014.

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

MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 1171-1189, 1998.

MORRELL, J. Colloids: applications in sperm preparation for assisted reproduction. **Intech open**, cap. 9, p.190-208, jun./jul. 2016. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/advances-in-colloid-science/colloids-applications-in-sperm-preparation-for-assisted-reproduction>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

- MORRELL, J. Stallion sperm selection: past, present, and future trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 436-440, 2012.
- MORRELL, J. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p.1-5, 2006.
- MORRELL, J. *et al.* Effect of semen extender and density gradient centrifugation on the motility and fertility of turkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40p. 522-525, 2005.
- MORRELL, J.; DALIN, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. **Animal Reproduction**, v. 5, p. 121-126, 2008.
- MORRELL, J. *et al.* Sperm yield after single layer centrifugation with androcoll-e is related to the potential fertility of the original ejaculate. **Theriogenology**, v. 81, p. 1005–1011, 2014.
- MORRELL, J. *et al.* Techniques for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 333-334, 2008.
- MORRELL, J.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Single layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled-up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**, v. 72, p. 879-884, 2009.
- MORRELL, J.; NUNES, M. Practical guide to single layer centrifugation of stallion semen. **Equine Veterinary Education**, v. 30, n. 7, p. 392-398, 2018.
- MORRELL, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal.**, v. 1, p. 1-9, 2009.
- MORRELL, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. **Veterinary Medicine International**.
- MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 357-366, 2000.
- NEILD, D. *et al.* Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n.1-4, p. 47-56, 2005.
- NIE, G.; JOHNSON, K.; WENZEL, J. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 103-109, 2003.
- PANARACE, M. *et al.* First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a largescale embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 81, p. 520-525, 2014.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 297308, 1997.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic *swim-up* method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 61-75, 1994.

SAMPER, J.; MORRIS, L.; PEÑA, F.; PLOUGH, T. Commercial breeding with sexed stallion semen: reality or fiction? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 471-474, 2012.

SAMPER, J. *et al.* Mechanism of Sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 729-737, 1995.

SAMPER, J.; CRABO, B. Assay of capacitated, freeze-damaged and extended stallion spermatozoa by filtration. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1209-1220, 1993.

SIEME, H. *et al.* Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v. 62, p. 915-928, 2004.

SIEME, H. *et al.* Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 8, p. 134-140, 2003.

SOMFAI, T. *et al.* Effect of *swim-up* and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 285-290, 2002.

TEA, N.; JONDET, M.; SCHOLLER, R. A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: Harrison RF, Bonnar J, Thompson W, editors. **In vitro fertilization, embryo transfer and early pregnancy**. Lancaster (PA): MPT Press Ltd; 1984. p. 117-120.

VARNER, D. *et al.* Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 677-685, 2008.