

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO ESPERMÁTICA EM SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO

Niterói, RJ

2017

CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO ESPERMÁTICA EM SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador:

PROF. DR. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Coorientadores:

DR. JEFERSON FERREIRA DA FONSECA

DRA. JOANNA MARIA GONÇALVES DE SOUZA-FABJAN

Niterói, RJ

2017

O48m Olivares, Carolina Cerqueira Sarmento

Métodos de preparação espermática em sêmen ovino
criopreservado/ Carolina Cerqueira Sarmento
Olivares; orientador Felipe Zandonadi Brandão. -
2017.

133f.

Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal)-
Universidade Federal Fluminense, 2017.

Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. ovino. 2. Sêmen. 3. Criopreservação.
4. Ruminantes I. Título.

CDD 591.16

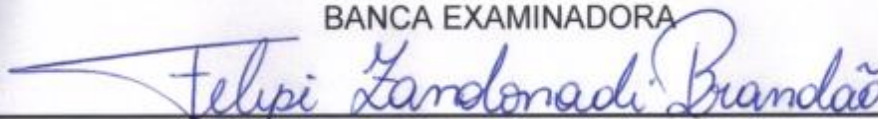
CAROLINA CERQUEIRA SARMENTO OLIVARES

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO ESPERMÁTICA EM SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO

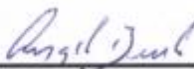
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Avaliado em 26 de maio de 2017.

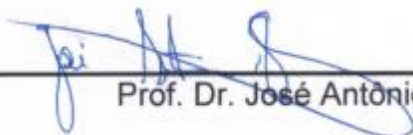
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - orientador



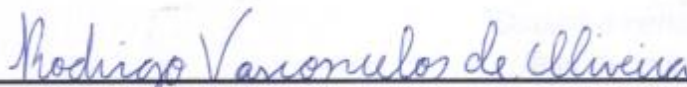
Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias – Uenf



Prof. Dr. José Antonio da Silva Ribas – UFF



Prof. Dr. André Luis Rios Rodrigues – UFF



Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira – UFRRJ

Niterói, RJ

2017

*Dedico a conclusão dessa tese e
fase de vida à Deus e todas as
forças superiores que foram únicos
em serem capazes de me reerguer
nos muitos momentos que me senti
insegura e incapaz de terminar
essa longa jornada de 6 anos.*

AGRADECIMENTOS

Não só dedico, como agradeço a Deus em primeiro lugar. Foi Ele o responsável pela conclusão dessa, nada fácil, “missão”;

Agradeço aos meus pais, meus anjos e figura de Deus na Terra. Devo-lhes, por toda minha existência, toda dedicação, amor incondicional, paciência, suporte, educação e formação do meu caráter e profissão;

À toda minha família que sempre esteve presente de um jeitinho ou de outro, dando apoio, torcendo e vibrando por cada vitória ao longo desses anos. Meu avô falecido José Maria, minha avó Anair, meu irmão Maurício, minha tia Piti, minha cunhada Luana, minha madrinha Olyntha, meus tios Edson, Denise, Moacir, Márcia e João, e meus primos irmãos companheiros;

Ao meu namorado e companheiro de vida, por todo apoio, conselhos, carinho, companhia e paciência nesse momento delicado da minha vida;

Aos amigos que a pós-graduação me deu a honra de fazer, pelo companheirismo e incentivo nos momentos de dificuldade, dentro dos experimentos e fora deles, em especial a Helena Saraiva e Vivian Alfradique, amigas que fiz nessa jornada e sei que vou poder contar para o resto da vida;

Preciso agradecer a minha linda e admirada profissão, a qual sinto muito orgulho e honra em exercer. Afinal, sem ela não teria a tão sonhada graduação de Doutora. Através da Medicina Veterinária, vivi os momentos mais fabulosos e recompensadores da minha vida;

Aos professores, doutores e orientadores Felipe Zandonadi Brandão e Jeferson Ferreira da Fonseca, que não só confiaram em mim, como puderam me oferecer toda a oportunidade, estrutura e conhecimento para execução e conclusão dessa tese;

Devo um agradecimento especial a Professora Joanna, que sempre esteve disponível seja lá qual fosse o motivo, momento, hora e dia para me ajudar em qualquer coisa, sempre de forma ética e profissional. De fato, sem sua sede de pesquisa e boa vontade, talvez grande parte disso tudo seria alcançado com muito mais dificuldade;

A todos os professores e profissionais da UFF e do Setor de Reprodução, da UENF e da Embrapa, Professor Carlos Vasconcelos, Professor José Antônio Ribas,

Dr. Ribrio Batista, Professor Rodrigo de Oliveira, os quais cederam conhecimentos e que estiveram sempre dispostos a acrescentar e ajudar. Agradeço especialmente ao Professor André Rios, por todo carinho, respeito, amizade, consideração e sabedoria que a mim foram passados nos momentos de aperto ao longo de todos esses anos;

Ao colega de profissão e turma, amigo e admirável profissional Mario Balaro, por toda prontidão e solicitude, além do carinho e torcida que foram imprescindíveis para a conclusão dos meus experimentos;

À minha Universidade que ofereceu as instalações, equipamentos e oportunidade para concluir essa trajetória;

À CNPq pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo financiamento da bolsa de estudo dos últimos 4 anos, e às instituições Faperj (projeto E-26/111.694/2013) e Finep pelo financiamento da estrutura e equipamentos que levaram à implementação do Laboratório de Produção *in vitro* de embriões e execução da pesquisa.

RESUMO

A preparação espermática é uma etapa importante para aplicação de biotécnicas reprodutivas. Nos estudos I e II, objetivou-se avaliar o efeito de métodos de seleção espermática sobre parâmetros do sêmen ovino ao longo do tempo. Em ambos os experimentos, foi utilizado sêmen descongelado de 10 carneiros da raça Santa Inês. No estudo I, os métodos de seleção testados foram: Swim-up (SU), gradiente de Percoll, mini-Percoll e lavagem por centrifugação, além do grupo controle. No estudo II, foram comparados o gradiente de Percoll convencional (controle) e quatro protocolos de mini-Percoll. Em ambos os estudos, as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h, 2 h e 3 h, após a seleção. Os parâmetros avaliados foram: taxa de recuperação, motilidade, integridade de membrana plasmática (MP), morfologia e capacitação espermática. O estudo III, teve como objetivo comparar a capacitação espermática, através da heparina, das espécies bovina, caprina e ovina após incubação. As amostras foram selecionadas pelo mini-Percoll e incubadas por 1,5 h, 3 h, 6 h e 18 h. Os parâmetros avaliados foram: motilidade, integridade de MP, aglutinação e capacitação. No estudo I, a menor ($P < 0,05$) taxa de recuperação foi após o SU e as demais técnicas não diferiram ($P > 0,05$) entre si. A maioria dos parâmetros da cinética não foi afetada ($P > 0,05$) pela seleção a 0h, somente SU obteve maiores valores ($P < 0,05$) para VSL ($41,8 \pm 11,1 \mu\text{m/s}$) e VAP ($46,9 \pm 11,2 \mu\text{m/s}$). O SU apresentou valores maiores ($P < 0,05$) para a maioria dos parâmetros de cinética avaliados ao longo da incubação e obteve uma maior recuperação ($P < 0,05$) de células intactas ($32,1 \pm 6,4\%$). Percoll, mini-Percoll e SU apresentaram mais células reagidas ($P < 0,05$) ao longo do tempo. No estudo II, a média de recuperação espermática ($9,1 \pm 1,4\%$) entre todos os tratamentos foi semelhante ($P > 0,05$), bem como a maioria dos valores de motilidade, integridade de MP e status da capacitação ($P > 0,05$). O VCL foi maior ($P < 0,05$) após alguns protocolos de mini-Percoll do que após o Percoll tradicional. No estudo III, a suplementação de heparina não resultou em benefícios ($P > 0,05$) aos parâmetros avaliados. Entretanto, houve uma menor taxa ($P < 0,05$) de aglutinação na presença de heparina na espécie ovina. Ovinos apresentaram uma taxa menor ($P < 0,05$) de células intactas e maior ($P < 0,05$) de aglutinação ao longo da incubação. Neste contexto, conclui-se que o uso de protocolos de mini gradientes abre novas perspectivas, minimizando prejuízos à célula espermática, custos e tempo de processamento. Além disso, foi observado que a heparina não apresentou efeitos na capacitação espermática, e quando associado com a seleção pelo mini-Percoll, a manipulação do sêmen descongelado de ovinos, caprinos e bovinos pode tornar-se mais prática e barata.

Palavras-chave: CASA, incubação espermática, mini-Percoll, preparação espermática, ruminantes

ABSTRACT

Sperm preparation is an important step in implementing of most reproductive biotechnologies. The goal of tests I and II, was to evaluate different methods of sperm selection and incubation in different sperm parameters of ovine semen. In both experiments, frozen/thawed commercial semen from 10 Santa Inês sheep was used. In test I, the methods of sperm selection were: SU (SU), Percoll gradient, mini-Percoll and washing by centrifugation. Parallel to the selection, a control group free from the influence of the selection was used. In test II, a comparison was made between conventional Percoll gradient (control) and four different mini-Percoll protocols. The samples were subjected to incubation at 37 °C for 1 h, 2 h and 3 h after sperm selection. The analyzed sperm parameters were: sperm recovery rate, motility, individual kinetic, plasma membrane integrity (PM), morphology and capacitation. Test III aimed to characterize the sperm capacitation, using heparin, of bovine, caprine and ovine species after incubation. Samples were thawed, selected by mini-Percoll and incubated for 1.5 h, 3 h, 6 h and 18 h. The analyzed sperm parameters were: motility, kinetic, PM integrity, agglutination and capacitation. Regarding to test I, the lowest ($P < 0.05$) recovery rate was recorded after swim-up ($1.0 \pm 0.3\%$), whilst the others were similar ($P > 0.05$). Most part of motility parameters were not affected ($P > 0.05$) by the technique at 0 h; just swim-up obtained higher ($P < 0.05$) values for VSL (41.8 ± 11.1) and VAP (46.9 ± 11.2). Overall, swim-up presented higher ($P < 0.05$) values for most of motility parameters over time of incubation. The control group led to more ($P < 0.05$) capacitated cells ($46.8 \pm 2.3\%$), whilst Percoll, mini-Percoll and swim-up were similar ($\sim 33\%$; $P > 0.05$), regardless of interval incubation. However, the latter three techniques presented more ($P < 0.05$) reacted cells. Swim-up recovered a higher ($P < 0.05$) number of intact cells ($32.1 \pm 6.4\%$). In test II, the sperm recovery rate averaged $9.1 \pm 1.4\%$, and most motility parameters were similar ($P > 0.05$) among protocols. VCL ($\mu\text{m/s}$) was higher ($P < 0.05$) after MP-II, III and IV (66.1 ± 4.5) than traditional Percoll (46.3 ± 4.9). Capacitation status and PM integrity were similar ($P > 0.05$) among treatments. Regarding to test III, heparin supplementation resulted in no extra benefits ($P > 0.05$) to the parameters evaluated. However, a lower ($P < 0.05$) rate of sperm agglutination was observed in heparin presence in ovine. Additionally, ovine showed a lower ($P < 0.05$) rate of intact cells and a higher ($P < 0.05$) agglutination rate along the incubation compared to the others species. In conclusion, the use of mini gradient protocols can bring new perspectives, decreasing harms to sperm, costs and processing time. Moreover, it has been observed heparin did not show effect on capacitation, and when it is associated with mini-Percoll, can become frozen-thaw spermatozoa manipulation of ovine, caprine and bovine more practical and cheaper.

Keywords: CASA, sperm incubation, mini-Percoll, sperm preparation, ruminant

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 Representação esquemática da velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), velocidade média (VAP) e deslocamento lateral da cabeça (ALH) da trajetória de uma célula espermática. Retirado da revisão de Mortimer, 1997; 2000, f. 39.

Figura 2 Representação esquemática demonstrando a relação entre velocidade linear (VSL) e velocidade média (VAP) em diferentes tipos de trajetórias espermáticas. Retirado da revisão de Mortimer, 2000, f. 40.

Capítulo 2

Figure 1 Capacitation status and plasma membrane (PM) integrity immediately after spermatozoa selection by different treatments in ram frozen-thawed sperm of Santa Inês breed (Mean $\pm$ SEM). Within a column, values without a common superscript (^{a,b}) differ significantly ($P < 0.05$); $n=10$, f. 83.

Capítulo 3

Figure 1 CTC patterns of ram frozen-thawed spermatozoa, under epifluorescence illumination at 1000x. (a) F pattern (noncapacitated cells); (b) B pattern (capacitated cells); (c) AR pattern (acrosome-reacted cells), f. 96.

Figure 2 Capacitation status and plasma membrane (PM) integrity after different moments of Percoll protocols in ram frozen-thawed

sperm of Santa Inês breed (Mean $\pm$ SEM). Within a column, values without a common superscript (a,b,c) differ significantly by Tukey and Student t tests ($P < 0.05$); $n = 50$ (ten replicates for each treatment). PT: Post thawing; 0 h: immediately after treatments; 1 h, 2 h and 3 h: hours of incubation after each selection technique, f. 99.

Capítulo 4

Figure 1 Agglutination rate of spermatozoa incubated in media supplemented or not with heparin. Each bar represents mean $\pm$ SEM obtained from six replicates of three animals for each species. Within a column, values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$) by paired t test. Uppercase letters is the comparison between different species and lowercase letters is the comparison between control and heparin. Control – sperm incubation in SP-TALP medium. Heparin – sperm incubation in SP-TALP medium supplemented with 5 $\mu\text{g/mL}$ of heparin, f. 125.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1 Sperm motility values immediately after spermatozoa selection by different techniques (0 h) in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM), f. 80.

Table 2 Sperm motility values after incubation intervals of selection treatments in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM), f. 81.

Capítulo 3

Table 1 Sperm motility values immediately after spermatozoa selection by different treatments in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM), f. 103.

Table 2 Sperm motility values after different assay moments of Percoll protocols in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (Mean $\pm$ SEM), f. 104.

Capítulo 4

Table 1 Motility parameters of ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm subjected to mini-Percoll treatment, f. 122.

Table 2 Capacitation status and plasma membrane integrity of ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm subjected or not to heparin supplementation overtime, f. 123.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
AR	<i>Acrosome reaction</i> (Reação acrossomal)
BCF	Frequência do batimento cruzado
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
BSA V	<i>Bovine serum albumin V</i> (Albumina sérica bovina fração V)
CASA	<i>Computer assisted semen analyser</i> (Análise computadorizada do sêmen)
CTC	Hidroclorido de clortetraciclina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HEP	Heparina
Hz	<i>Hertz</i>
IP	Iodado de propídeo
IVF	<i>In vitro</i> fertilization (Fertilização <i>in vitro</i>)
LA	Laranja de acridina
LIN	Linearidade
MP	Membrana plasmática
MP	Mini-Percoll
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PM	<i>Plasma membrane</i> (Membrana plasmática)
RA	Reação acrossomal
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da media)
SOF	<i>Synthetic Ovidutal Fluid</i> (Fluido ovidutal sintético)
SU	<i>Swim-up</i>
STR	Retilinearidade
UI	Unidade internacional
VAP	Velocidade média do percurso
VCL	Velocidade curvilínea

vs.	<i>Versus</i>
VSL	Velocidade linear
$\times g$	Força gravitacional
WOB	coeficiente de oscilação
ZP3	Glicoproteína 3 da zona pelúcida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	CAPÍTULO 1	17
2.1	Revisão de literatura	17
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
4.	JUSTIFICATIVA	59
5.	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	59
6.	OBJETIVOS	60
6.1	Objetivo geral	60
6.2	Objetivos específicos	60
7.	CAPÍTULO 2	61
8.	CAPÍTULO 3	90
9.	CAPÍTULO 4	108
10.	CONCLUSÕES	131
11.	PERSPECTIVAS	131
12.	ANEXOS	133

1. INTRODUÇÃO

No contínuo aumento da população mundial, os pequenos ruminantes apresentam um papel enfático, principalmente em países cuja economia se encontra em desenvolvimento e, em particular, nos países onde as condições climáticas são rigorosas e as terras pouco férteis (AMIRIDIS e CSEH, 2012). No Brasil, atenção especial tem sido dada à exploração das raças ovinas deslançadas dos trópicos, principalmente à raça Santa Inês, devido às suas características marcantes de apresentar produtividade em sistemas de produção a campo e a ecossistemas adversos, além da produção de produtos de elevados valores biológicos (SIMPLÍCIO, 2011).

Uma das principais alternativas para a melhoria da produtividade de qualquer espécie é o incremento da eficiência reprodutiva. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se apresenta como a terceira geração de biotécnicas reprodutivas e está sendo cada vez mais integrada a programas de melhoramento genético, como uma ferramenta complementar à inseminação artificial e à transferência de embriões (COGNÍÉ et al., 2004). Em ovinos, a PIVE comercial no Brasil avançou gradativamente nos últimos seis anos, resultando em maiores taxas de concepção, podendo vir a ser viabilizada comercialmente. (SILVA et al., 2012).

O sucesso da fecundação *in vitro* (FIV) e posterior desenvolvimento embrionário durante a PIVE, está diretamente relacionado com a qualidade do sêmen e o método de preparação espermática utilizado (WALTERS, 2004). Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidas diversas técnicas laboratoriais que possibilitam uma análise mais criteriosa da estrutura espermática, evidenciando a importância do sêmen e o aprimoramento da sua avaliação (ARRUDA et al., 2015).

Levando em consideração o comumente uso do sêmen criopreservado, existe a necessidade de se desenvolverem estratégias para o aprimoramento da preparação espermática a fim de atingir uma amostra seminal de alta qualidade por meio de uma seleção e capacitação espermática eficientes (ZÚCCARI et al., 2008), gerando uma amostra seminal de excelência a ser aplicada na pesquisa, na PIVE e nas demais biotécnicas da reprodução.

Logo, as proposições hipotéticas que o presente estudo busca avaliar são: (1) a técnica de mini-Percoll não apresenta prejuízos aos parâmetros de viabilidade espermática; (2) as variações realizadas nos protocolos da técnica de Percoll não causam efeitos negativos à qualidade espermática quando se compara à técnica tradicional de Percoll; (3) o sêmen criopreservado de ovinos sofre capacitação espermática mais rapidamente do que as espécies bovina e caprina; e (4) a capacitação espermática de sêmen criopreservado de ruminantes domésticos se comporta de maneira similar na presença ou ausência de heparina após a seleção por mini-Percoll.

2. CAPÍTULO 1

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 *Produção in vitro de embriões (PIVE)*

A PIVE apresenta potencial para a geração de grande número de descendentes para a pesquisa e para o uso de outras biotecnologias, bem como promove o melhoramento genético de espécies. Além disso, a técnica se mostra eficaz em relação a preservação de espécies raras, tendo em vista que existe a possibilidade de obtenção de gametas mesmo algumas horas após a morte do animal. Essa biotecnologia prova ser um método valioso no fornecimento de um maior número de produtos provenientes de animais superiores, por um valor mais baixo que outras técnicas mais convencionais, como a superovulação e transferência de embriões (WANI, 2002).

A técnica da PIVE possibilita um melhor custo-benefício, substitui e supera os problemas relacionados com a múltipla ovulação e transferência de embriões, e oferece embriões provenientes de animais geneticamente superiores a um custo menor (AMIRIDIS e CSEH, 2012). Além disso, o tratamento hormonal pode ser dispensado e ainda é possível a recuperação oocitária de fêmeas pré-púberes, inférteis, gestantes, lactantes, senis e de animais *post-mortem*. A utilização de fêmeas pré-púberes apresenta um grande potencial de dobrar o ganho genético de um rebanho e diminuir o intervalo de geração de produtos (revisado por PARAMIO e IZQUIERDO, 2014). Por outro lado, a técnica ainda enfrenta algumas limitações. Nos últimos anos, a biotecnologia vem avançando em ovinos, porém, alguns aspectos ainda precisam ser melhorados, como a técnica de colheita oocitária, e adaptados ao tamanho e anatomia da espécie e os próprios procedimentos *in vitro*. Outro entrave muitas vezes é a distância entre a localidade dos animais ou abatedouros e os laboratórios de PIVE. Adicionalmente, ainda há estudos encaminhando para a definição de protocolos eficientes em relação à criopreservação de embriões provenientes da técnica (MAX et al., 2012).

A PIVE consiste em várias etapas como a coleta de oócitos, maturação *in vitro* dos oócitos recuperados, FIV e desenvolvimento *in vitro* dos presumíveis zigotos até um estágio específico para, posteriormente, serem transferidos a animais receptores adequados ou até mesmo serem mantidos criopreservados para aproveitamento futuro (PARAMIO, 2010).

A FIV é uma etapa da PIVE que depende do sucesso da maturação oocitária, da seleção e da capacitação espermática e do meio utilizado durante o processo. O sêmen utilizado para a FIV pode ser fresco ou congelado e precisa ser capaz de fertilizar o oócito. Para isso, antes da FIV propriamente dita, o sêmen deve passar por um processo de preparação espermática para seleção dos espermatozoides de melhor qualidade e para sofrer a capacitação espermática (PARAMIO e IZQUIERDO, 2014), que será detalhadamente abordado no próximo tópico.

O meio mais utilizado para FIV em ovinos é o fluido ovidutal sintético (SOF; Synthetic Ovidutal Fluid; BAI et al., 2008; WAN et al., 2009; CATALA et al., 2012; WANG et al., 2013). Após a preparação espermática, são preparadas microgotas de meio para onde são transferidos grupos de 15-30 oócitos e onde serão fecundados com os espermatozoides selecionados. A concentração espermática final que é utilizada para a fertilização varia de $1-3,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (HERRICK et al., 2006; BAI et al., 2008). Os gametas são co-incubados por 16-20 h a 38–39 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (COX e ALFARO, 2007).

2.1.1.1 Preparação espermática para fertilização *in vitro*

Após a ejaculação, os espermatozoides são depositados na vagina onde competem entre si e iniciam seu trajeto ao longo do trato reprodutivo da fêmea até atingirem a ampola da tuba uterina e fertilizarem o oócito. Eventualmente, apenas 0,1% consegue chegar à tuba uterina e somente uma célula irá fertilizar o oócito. Esse evento mostra que há um rigoroso processo de seleção espermática envolvido no trato reprodutivo da fêmea, que é essencial para a fertilização e geração de crias saudáveis. Logo, *in vivo*, o processo de seleção espermática é totalmente controlado pelo trato reprodutivo feminino, que permite que células espermáticas mais aptas

cheguem à fecundação, assegurando que os descendentes recebam material genético de alta qualidade (HENKEL, 2012). A fim de se atingir uma seleção espermática baseada nos princípios naturais, pesquisadores precisam entender tais eventos e mimetizá-los na PIVE (MORRELL e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

O processo de fertilização exige que o espermatozoide se ligue e penetre na zona pelúcida e matriz extracelular do oócito. A capacidade do espermatozoide de se ligar à zona pelúcida é aumentada pela capacitação (TOPPER et al., 1999). A interação entre as moléculas da superfície da cabeça das células capacitadas e a zona pelúcida inicia a sequência de eventos que culminará na reação acrossomal (RA), outro evento indispensável para que a fertilização ocorra (YANAGIMACHI, 1994). Portanto, a interação adequada entre a membrana plasmática (MP) do espermatozoide e a zona pelúcida é crucial para o sucesso do processo de fertilização. E, para que isso ocorra, o espermatozoide precisa estar devidamente preparado e apto.

Com o advento das biotecnologias aplicadas à reprodução assistida, houve a necessidade do desenvolvimento de estratégias para a preparação espermática já que, na maioria dos casos, células criopreservadas são utilizadas, reforçando a necessidade de uma seleção rigorosa dos espermatozoides (ZÚCCARI et al., 2008). Assim, antes da FIV, o gameta masculino precisa ser preparado para se tornar apto a fecundar os oócitos.

A preparação espermática de rotina é aplicada no sêmen para FIV em muitas espécies. Essa preparação inclui métodos de seleção que elevam a motilidade espermática, qualidade do espermatozoide e remove o plasma seminal e/ou diluidores, assim como células indesejadas provenientes do ejaculado ou do sêmen descongelado (HENKEL e SCHILL, 2003). Além disso, uma boa técnica de preparação espermática não exige somente a promoção de uma amostra seminal apresentando boa motilidade, mas também leva em consideração outros parâmetros, como a capacitação e viabilidade espermática, que estão diretamente relacionados com a habilidade de fertilização do oócito (SAID et al., 2006). Logo, uma vez selecionados, os espermatozoides ainda precisam passar pela etapa de indução da capacitação espermática.

O ejaculado compreende uma mistura de plasma seminal, espermatozoides, microorganismos e debris celulares (PARAMIO e IZQUIERDO, 2014). O plasma seminal contém proteínas que se ligam ao espermatozoide e podem retardar eventos que darão início à capacitação (PÉREZ-PÉ et al., 2002). Essas proteínas são descritas como fatores decapacitantes e precisam ser removidas durante o processo de preparação espermática para que o espermatozoide possa sofrer os processos de capacitação, RA e consequente fertilização do oócito (YANAGIMACHI, 1994).

A técnica de preparação espermática deve ser rápida, simples, apresentar um bom custo-benefício, isolar a maior quantidade de espermatozoides móveis possíveis, não causar danos estruturais e morfológicos às células, eliminar espermatozoides mortos e outras células indesejadas como leucócitos e bactérias eliminar toxinas e substâncias bioativas como os fatores decapacitantes e espécies reativas de oxigênio (ROS; HENKEL e SCHILL, 2003).

2.1.1.1.1 Seleção espermática

Os três métodos de seleção mais utilizados, em ovinos, são o swim-up (SU; PUGH et al., 1991; HOLT e PALOMO, 1996; PÉREZ-PÉ et al., 2002; GRASA et al., 2006; MARTÍ et al., 2006; PEREIRA et al., 2009; PICHARDO et al., 2010; SHABANKAREH e AKHONDI 2012; WANI et al., 2012; SHIRAZI e MOTAGHI 2013; LUNA et al., 2015), centrifugação em gradiente de densidade Percoll (HOLT e PALOMO, 1996; GILLAN et al., 1997; PAPADOPOULOS et al., 2005; MARTÍ et al., 2006; LI et al., 2006; GARCIA-GARCIA et al., 2007; WAN et al., 2009; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2010; HEIDARI et al., 2013; WANG et al., 2013; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2015) e lavagem por centrifugação (PUGH et al., 1991; HOLT e PALOMO, 1996; PTAK et al., 1999; ISACHENKO et al., 2003; MARTÍ et al., 2006; COCERO et al., 2011; MARA et al., 2013).

Para todos os métodos de migração, a motilidade da célula espermática é um quesito essencial, enquanto que para as técnicas de gradiente de densidade a metodologia é baseada na combinação entre a motilidade da célula e sua retenção nas partículas do meio (HENKEL e SCHILL, 2003).

O método do SU baseia-se na tendência inata que os espermatozoides de maior motilidade possuem de migrarem para cima após incubação em um meio apropriado (SHAMSUDDIN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994). Após a incubação, os espermatozoides com maiores motilidades podem ser recolhidos na fração superior do meio, enquanto que os pouco móveis ou mortos permanecem na fração inferior (PARRISH et al., 1988). A técnica de migração ascendente possui as seguintes vantagens: recuperar amostras límpidas e com espermatozoides apresentando alta motilidade (maior que 90%); apresenta células espermáticas morfolologicamente normais; ausência de outras células e debris celulares; ser simples e de fácil execução; e ser barata (HENKEL e SCHILL, 2003). As principais desvantagens são apresentar baixa taxa de recuperação, além de provocar lesões maciças pelas ROS, levando a uma redução significativa do percentual de espermatozoides com condensação normal da cromatina (HENKEL e SCHILL, 2003).

O método de recuperação espermática pela técnica de Percoll consiste na separação dos espermatozoides em relação à sua densidade, permitindo o isolamento das células com motilidade e morfologia normais em gradientes descontínuos de densidade. Estes gradientes são compostos de soluções isotônicas feitas a partir de substâncias de partículas coloidais (partículas de sílica coloidal com 15 a 30 nm de diâmetro, recobertas com polivinil pirrolidona não-dialisável) que permitem, em uma única centrifugação, separar os espermatozoides viáveis das demais partículas. Normalmente, são utilizadas duas densidades (45% e 90%) de Percoll (MORTIMER, 1994).

Devido à grande variação no tamanho das partículas, o Percoll precisa ser devidamente centrifugado. Após a centrifugação, é formado um gradiente de densidade a partir da organização das partículas, que passam a apresentar um aumento gradual da densidade da fração superior à fração inferior. Durante a técnica, as células são deslocadas para as camadas inferiores do tubo contendo o Percoll, contudo, os espermatozoides mais móveis se movem ativamente em direção a camadas mais densas do gradiente Percoll, pois possuem maior capacidade de penetrar nas camadas de partículas coloidais quando comparados com as células com menor motilidade ou até mesmo imóveis. Com isso, as células com maior motilidade chegam mais rapidamente ao fundo, enriquecendo o *pellet* formado (HENKEL e SCHILL, 2003).

Estudos sobre os danos que o Percoll pode trazer às células espermáticas ainda são controversos. Desde 1999, o uso do Percoll foi proibido na reprodução assistida de humanos, devido aos danos causados pelas moléculas de polivinil pirrolidona que o compõem (RHO et al., 2001). Strehler et al. (1998) reportaram que essas moléculas apresentam um efeito adverso nas MP, membranas acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides. Andersen e Grinsted (1997), afirmaram que a sílica, componente do gradiente de densidade, apresenta a tendência de precipitar junto aos espermatozoides, podendo causar danos estruturais. Por outro lado, García-Álvarez et al. (2010) demonstraram que a qualidade de espermatozoides ovinos melhorou significativamente após a seleção espermática pela técnica de Percoll. Além disso, os autores encontraram relação direta com alguns parâmetros encontrados nos espermatozoides selecionados e a fertilidade *in vivo*, mostrando sua eficiência durante a preparação espermática na reprodução assistida de ovinos.

Estudos encontrados na literatura, preconizam volumes de 2 mL por gradiente de Percoll utilizado e uma centrifugação a 400 x *g*, por um período de até 30 minutos. No entanto, na busca de uma máxima recuperação de espermatozoides de boa qualidade, o método de seleção por gradientes de Percoll sofreu diversas modificações ao longo dos anos. Possivelmente, a principal variação foi a de diminuir o volume do meio de densidade utilizado e realizar a centrifugação utilizando maior força e em menor tempo. Em bovinos (MACHADO et al., 2009; VIANNA et al., 2014) e em caprinos (OLIVARES et al., 2015), foi demonstrado que a técnica de mini-Percoll não causou efeitos negativos na qualidade espermática. Desta forma, o uso do mini-Percoll aparece como uma alternativa atrativa por minimizar o custo da técnica, diminuir o contato com as moléculas do gradiente de densidade que causam toxicidade e reduzir o tempo de processamento da amostra durante a PIVE por exemplo (MACHADO et al., 2009).

Alguns estudos utilizam a lavagem dos espermatozoides por centrifugação durante a preparação espermática para PIVE, para obter uma amostra livre de crioprotetores, sem que, de fato, selecione espermatozoides de melhor qualidade. Trata-se da separação das células espermáticas do plasma seminal ou diluidores de sêmen e sua ressuspensão em meio apropriado após seguidas centrifugações, como simples lavagens (ALVAREZ et al, 1993). Esse simples processo de separação é referido como *sperm washing*. A maioria desses métodos envolve filtração (CISALE

et al., 2001) ou repetidas centrifugações (ALVAREZ et al., 1993). Esse método difere dos outros que são capazes de separar diferentes populações espermáticas de acordo com sua viabilidade e motilidade, resultando em amostras de melhor qualidade.

O método de lavagem por centrifugação é uma das formas utilizadas para uniformizar variações de volume, sem que se observe influência negativa sobre as células espermáticas. Além disso, observa-se efeitos positivos sobre a motilidade espermática (LOPES e PAPA, 1998). O contínuo metabolismo espermático produz grandes quantidades de catabólitos tóxicos, acarretando num aumento do ácido láctico extracelular. Este acúmulo pode causar a morte dos espermatozoides devido a drásticas alterações de pH. Daí a necessidade da lavagem de espermatozoides antes de entrar em contato com oócito (HOLT, 2000). Essa lavagem também é capaz de remover fatores inibidores da capacitação e prostaglandinas (CARRELL et al., 1998).

Para Centola et al. (1998), as técnicas que empregam unicamente lavagens e centrifugações como mecanismo básico de preparação espermática podem resultar, direta ou indiretamente, em danos irreversíveis aos espermatozoides, havendo, portanto, a preferência por métodos baseados na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais.

Dode et al. (2002) afirmam que mesmo que os espermatozoides não tenham sido selecionados, como na lavagem por centrifugação, um número suficiente de células capazes para fertilizar estão presentes. Os autores avaliaram o efeito de diferentes métodos de seleção espermática na taxa de penetração e clivagem em bovinos e verificaram que não houve diferença ($P > 0,05$) para a taxa de penetração entre os métodos de SU, Percoll e lavagem ($70,3 \pm 6,8\%$, $60,8 \pm 6,7\%$ e $53,8 \pm 6,8\%$, respectivamente), assim como para a taxa de clivagem, cujos valores entre os tratamentos foram semelhantes ($56,7 \pm 7,2\%$, $51,5 \pm 7,3\%$ e $47 \pm 6,5\%$, respectivamente). Os autores concluíram que é possível que a concentração espermática utilizada para a FIV possa superar as diferenças na qualidade dos espermatozoides obtidos através dos diferentes métodos de seleção espermática testados no estudo e que todos podem ser utilizados sem efeito prejudicial sobre a fertilização.

Khalifa e El-Saidy (2006) concluíram que a preparação espermática para a FIV de bovinos pôde ser simplificada pelo método de lavagem por centrifugação, a fim de

evitar os danos causados pelo efeito de diluição do SU e pela toxicidade do meio de gradiente de Percoll. Os autores afirmaram que o método de lavagem apresenta uma série de vantagens como o fato de ser rápido, simples de se executar, barato e recuperar um número suficiente de espermatozoides viáveis.

2.1.1.1.2 Capacitação espermática

Além da necessidade de selecionar os melhores espermatozoides, as células espermáticas precisam ser capazes de fertilizar o oócito. Nos mamíferos, os espermatozoides ao serem liberados do epidídimo ainda não estão prontos para fertilizar os oócitos maturados. Eles precisam passar pelo trato reprodutivo da fêmea e sofrerem algumas alterações estruturais, para adquirirem capacidade fertilizante (YANAGIMACHI, 1994).

A capacitação espermática compreende um conjunto de eventos complexos durante os quais os espermatozoides passam por uma série de modificações para se tornarem aptos à fertilização (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Trata-se de um processo que torna a célula espermática susceptível a sofrer a RA em resposta aos sinais de indução da zona pelúcida (STOREY, 1995), e assim, apta à fertilização do gameta feminino.

No plasma seminal de bovinos, existe uma família de proteínas denominadas BSP, que estão diretamente relacionadas a eventos da capacitação. Proteínas homólogas foram identificadas nas vesículas seminais e plasma seminal de garanhão, bode e carneiro. Essas proteínas se ligam a fosfolipídeos da superfície espermática acelerando processos de capacitação espermática através da ligação com indutores da capacitação localizados no trato reprodutivo da fêmea, como lipoproteínas e glicosaminoglicanos (heparina), causando aumento da concentração intracelular de cálcio, fosforilação protéica, efluxo de colesterol e desestabilização de MP (MANJUNATH et al., 2007).

A duração da capacitação varia entre as espécies, sendo estimada em 1-2 h em ovinos (AUSTIN, 1970). As alterações fisiológicas, químicas e biofísicas que ocorrem durante o processo incluem mudanças no metabolismo celular, na

concentração intracelular de íons (VISCONTI et al., 1995), na fluidez da MP, no efluxo de colesterol, na hiperpolarização de membrana (ZENG et al., 1995), no pH intracelular (ZENG et al., 1996), na concentração de cAMP (VISCONTI et al., 1998), na fosforilação protéica (VISCONTI et al., 1995) e nas concentrações de ROS (HERRERO et al., 1999). Dentre esses fatores, a fosforilação das proteínas de membrana está diretamente relacionada com o processo de capacitação espermática, que por sua vez é um processo espécie-dependente (VISCONTI et al., 1999; PÉREZ-PÉ et al., 2002; GRASA et al., 2006).

A capacitação envolve a combinação de uma sequência de processos que ocorrem tanto na cabeça do espermatozoide (preparação para RA) como no flagelo (hiperativação da motilidade). A capacitação pode ser dividida em: (1) eventos rápidos e precoces, que compreendem a ativação dos movimentos vigorosos do flagelo e que ocorrem logo quando o espermatozoide deixa o epidídimo e, (2) eventos lentos e tardios, que compreendem mudanças no padrão de movimento flagelar (hiperativação), a habilidade de sofrer a RA e a fosforilação proteica. *In vivo*, esses eventos ocorrem durante a passagem do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea. E podem ocorrer *in vitro*, através da incubação espermática em meios de cultura apropriados (SALICIONI et al., 2007; VISCONTI, 2009).

O evento rápido ocorre poucos segundos após a ejaculação e é baseado nas altas concentrações de cálcio e bicarbonato presentes no fluido seminal (VISCONTI, 2009). O aumento das concentrações de bicarbonato resulta no aumento do pH intracelular e ativação da adenilciclase. As concentrações de bicarbonato produzem um rápido colapso na assimetria dos componentes da MP, causando a ativação de enzimas que efetuam a translocação lipídica na MP (GADELLA e HARRISON, 2000), aumentando, dessa forma, a exposição de receptores de colesterol (VISCONTI, 2009). Ao mesmo tempo, há um aumento de cAMP e, conseqüentemente, há ativação das proteínas quinase. A ativação dessas proteínas modula os canais de cálcio, que por sua vez produzem alterações no potencial de membrana e nos níveis intracelulares de cálcio (WENNEMUTH et al., 2003).

O cálcio é um importante componente no processo de capacitação espermática. O pico de cálcio é crítico na capacitação durante as duas primeiras horas de exposição à heparina. Durante esse período, o acrossoma acumula cálcio,

prevenindo seu aumento no citoplasma. Quando o acrossoma está repleto de cálcio, se a célula espermática não receber estímulo de indução de capacitação, uma reação acrossomal espontânea pode ocorrer, tendo como consequência a morte celular. Esse aumento final da concentração de cálcio é de extrema importância e está relacionado à habilidade fisiológica da célula em sofrer a reação acrossomal (PARRISH et al., 1999).

O início do evento lento da capacitação é marcado pela remoção do colesterol da MP e o aumento de sua fluidez (VISCONTI et al., 1999). Ao mesmo tempo que o conteúdo de colesterol diminui, a estrutura lipídica se reorganiza. Durante essa fase, as proteínas quinase efetuam a fosforilação de diversas proteínas ativando direta ou indiretamente outras proteínas quinase (CROSS, 2004). Essas alterações vão levar à capacitação espermática, que por sua vez promoverá os seguintes eventos: (1) habilidade de o espermatozoide sofrer a RA; (2) hiperativação; (3) quimiotaxia (SALICIONI et al., 2007) e; (4) habilidade de fertilizar o oócito.

O envolvimento das proteínas quinase na capacitação espermática de ovinos e o consequente aumento da fosforilação proteica durante o processo já foram demonstrados (O'FLAHERTY et al., 2006). O bicarbonato é necessário para o processo, porém, já foi evidenciado que a albumina sérica bovina e cálcio podem não ser essenciais (GRASA et al., 2006). Anteriormente, outro estudo também sugeriu que os níveis intracelulares de cAMP devem ser muito baixos para iniciar a fosforilação das proteínas flagelares, fato que parece ocorrer devido a característica dos espermatozoides de ovinos em apresentar alto níveis de fosfodiesterases (COLAS et al., 2008).

Na tuba uterina existe um local onde os espermatozoides se mantêm ligados ao epitélio, que funciona como um sítio de reservatório espermático. Os espermatozoides se mantêm "semi capacitados" nesse local até o momento da ovulação, quando o processo de capacitação é finalizado e os espermatozoides são liberados do sítio e se deslocam ao encontro do oócito, aptos à fecundação (HARRISON, 1996).

O reservatório espermático serve como um sítio que preserva os espermatozoides e garantem que esses vão permanecer aptos a fertilizar no momento em que o oócito adentrar o oviduto. Os espermatozoides se mantêm ligados

a esses sítios através da ligação de lectinas encontradas na superfície espermática com oligossacarídeos específicos do epitélio da tuba uterina (SUAREZ et al., 1998). A perda ou alteração dessas moléculas na superfície do espermatozoide pode resultar na liberação dos espermatozoides dos sítios de ligação com o epitélio. Essa liberação também pode ocorrer por conta da hiperativação da motilidade espermática (IGNOTZ et al., 2001).

O processo de capacitação não só resulta em alterações na cabeça do espermatozoide, mas também resulta em alterações no flagelo, caracterizando a hiperativação espermática. Esse evento é um fenômeno cálcio-dependente, que altera o padrão de motilidade do espermatozoide e ocorre no sítio de fertilização, determinando uma maior amplitude de batimento flagelar, aumento da flexibilidade da região proximal da peça intermediária, batimentos flagelares vigorosos, tendo uma maior velocidade curvilínea (VCL), deslocamento lateral da cabeça (ALH), menor linearidade (LIN) e coeficiente de oscilação (WOB). Essa ativação do movimento flagelar pode fazer com que o espermatozoide apresente trajetórias circulares devido ao desenvolvimento de batimentos flagelares assimétricos. Como resultado, a célula hiperativada tende a nadar vigorosamente em círculos em uma lâmina de microscopia. Em algumas espécies, espermatozoides hiperativados completam um movimento circular em apenas dois batimentos flagelares, dando a impressão de imagens em oito (revisado por MORTIMER, 1997).

A hiperativação é crítica no processo de fertilização, uma vez que esse evento proporciona movimento progressivo ao espermatozoide, facilitando sua passagem pelo muco presente na tuba uterina, orientando-o ao local de fecundação, e orientando-o a alcançar o oócito por meio de penetração mais eficiente na zona pelúcida. Mesmo que a capacitação e a RA permitam a ligação do espermatozoide ao oócito, a hiperativação é indispensável para a penetração na zona pelúcida (DE LAMIRANDE et al., 1997). O aumento do metabolismo mitocondrial tende a produzir mais ROS que parecem participar dos eventos moleculares que implicam na capacitação e hiperativação espermáticas (FERRAMOSCA e ZARA, 2014).

O batimento vigoroso do flagelo requer altas concentrações de ATP e cAMP, bem como o cálcio, que parece ser um íon crítico no desenvolvimento da hiperativação (SUAREZ et al., 1987).

Embora a hiperativação geralmente ocorra em algum ponto durante a capacitação *in vitro*, os caminhos que levam à hiperativação e à capacitação não são completamente relacionados. Estudos demonstram que a hiperativação pode ocorrer independentemente da capacitação ou condicionada à presença de substâncias específicas como hipotaurina e penicilamina, podendo anteceder o evento da capacitação (DEMOTT et al., 1995; MUJICA et al., 1994).

A RA é um pré-requisito para a fertilização. Trata-se de um evento que envolve exocitose e fusões de MP com a membrana acrossomal externa em toda extensão da porção anterior da cabeça do espermatozoide, culminando na liberação de enzimas hidrolíticas acrossomais, principalmente a tripsina e acrosina. A MP da cabeça do espermatozoide adquire propriedades que permite a fusão do gameta masculino com o feminino. O espermatozoide se liga a zona pelúcida, ainda com sua MP intacta, através de receptores específicos localizados ao longo da porção anterior de sua cabeça (revisado por YANAGIMACHI, 1994).

O estímulo da ligação com a zona pelúcida induz o início da RA. Essa reação é estimulada pela ligação com a ZP3, uma glicoproteína componente da zona pelúcida. O espermatozoide se liga a zona pelúcida, havendo exposição de sítios de membrana essenciais para o processo de fertilização (revisado por YANAGIMACHI, 1994).

Após a interação inicial entre os receptores do espermatozoide e a ZP3, ocorrem outros eventos individuais que culminam na exocitose do conteúdo acrossomal. Um desses eventos é a abertura dos canais de cálcio por meio de uma modificação na MP que ativa esses canais a fim de aumentar as concentrações de cálcio no citoplasma. O aumento final das concentrações de cálcio é importante e está relacionado com a habilidade fisiológica do espermatozoide em sofrer a RA (PARRISH et al., 1999).

Outro evento importante na exocitose do conteúdo acrossomal é o influxo de íons de sódio que precede o influxo de cálcio e determina o aumento do pH intracelular durante a RA (FRASER, 1993).

Após a completa RA, o espermatozoide penetra na zona pelúcida, através de um processo químico que ocorre após a digestão de glicoproteínas da zona pelúcida pelas enzimas acrossomais liberadas (revisado por YANAGIMACHI, 1994).

A capacitação é lenta, ocorrendo durante um intervalo de horas, já a RA é rápida, necessitando apenas de minutos. Essa diferença ocorre dentre vários fatores e eventos diferentes, dentre eles a alteração nas concentrações de cálcio. Durante a capacitação o aumento da concentração de cálcio é modesto e gradual, enquanto na RA, esse aumento ocorre de forma mais rápida e evidente (BRUCKER e LIPFORD, 1995).

Em ovinos, a RA parece ocorrer em dois estágios. O primeiro estágio envolve fosfolipases, cujas atividades se completam dentro de três minutos, e concentrações baixas de cálcio. Logo depois ocorre a fusão das membranas e aumento das concentrações de cálcio no acrossoma (ROLDAN e HARRISON, 1989).

Produzidos em quantidades fisiológicas, diferentes tipos de ROS são extremamente importantes ao espermatozoide no controle dos eventos da fosforilação da tirosina associados com a capacitação espermática. Entretanto, quando produzidas em quantidades excessivas, as ROS induzem danos peroxidativos na MP do espermatozoide, prejudicando processos que dependem da membrana, como motilidade, exocitose acrossomal e fusão espermatozoide-ovócito (AITKEN, 1999).

Alguns glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino são responsabilizados por induzirem a capacitação espermática *in vivo*. Nos processos *in vitro*, o glicosaminoglicano mais utilizado para induzir essa reação é a heparina (GONÇALVES et al., 2001) e já foram reportados estudos confirmando sua eficiência na indução da capacitação em sêmen de ovinos (COX e ALFARO, 2007; WANI et al., 2012; HEIDARI et al., 2013; SREENIVAS et al., 2013).

O mecanismo de indução da capacitação pela heparina ocorre pelo estímulo do aumento da concentração de cálcio intracelular, do pH e das concentrações de AMPc, que parecem ser necessárias para iniciar a capacitação, além de remover as proteínas do plasma seminal adsorvidas à superfície da MP, as quais são consideradas inibidoras da capacitação (CORMIER e BAILEY, 2003). Além disso, após a ligação da heparina, há uma perda de lectina que caracteriza a perda de componentes da superfície da MP (MEDEIROS e PARRISH, 1996). Tal alteração dos componentes de superfície leva a perda de colesterol e fosfolipídeos como consequência (MANJUNATH e THERIEN, 2002). Após essas alterações, ocorre

ativação das proteínas quinases, que por sua vez modulam a célula espermática para sofrer a RA (BAILEY, 2010).

Vários outros agentes capacitantes já foram utilizados em ovinos, como soro de ovelha em estro (CATALA et al., 2011, 2012; BERLINGUER, 2012; SHABANKAREH e AKHONDI, 2012; FORCADA et al., 2013; LAHOZ, 2013; MARA et al., 2013; ROMÃO et al., 2013; SHIRAZI e MOTAGHI, 2013; WANG et al., 2013), e heparina em associação com o soro (COX e ALFARO 2007; WAN et al., 2009).

O meio de capacitação basicamente é composto por fontes de energia (piruvato, lactato e glicose),ceptor de colesterol (normalmente albumina sérica bovina; BSA), bicarbonato de sódio, NaHCO_3 , Ca_2Cl , KCl e NaCl, alguns dos reagentes que apresentam papel importante no processo de capacitação.

2.1.1.1.2.1 Criocapacitação

A temperatura é um dos principais fatores que afetam a difusão de componentes da MP celular. Pesquisas avaliando danos na estrutura celular do espermatozoide demonstram que as modificações que ocorrem durante a criopreservação são similares às aquelas que ocorrem durante o processo de capacitação espermática. É sabido que o processo de resfriamento e aquecimento da célula espermática pode causar uma série de danos aos espermatozoides e que algumas células podem se comportar como se estivessem capacitadas, apresentando vários estágios e padrões de capacitação espermática (WATSON, 1995). A criocapacitação é um dos principais eventos que diminuem a viabilidade e longevidade de células submetidas a processos de criopreservação espermática (BAILEY et al., 2000).

Os espermatozoides criopreservados acumulam altas concentrações de cálcio devido a alterações nos mecanismos de efluxo dos componentes da MP, assim como ocorre no processo de capacitação (BAILEY et al., 2000), principalmente quando se compara com o sêmen fresco (KADIRVEL et al., 2009). A perda de fosfolípidos que ocorre na membrana de espermatozoides criopreservados ocorre mais rapidamente em relação ao sêmen fresco, seguindo o padrão semelhante do evento que ocorre

durante a peroxidação lipídica (ALVAREZ e STOREY, 1992). Espermatozoides criopreservados apresentam padrões de coloração de hidróclorido de clortetraciclina (CTC) e um aumento intracelular de cálcio tipicamente semelhante a células capacitadas, se diferenciando um pouco em relação ao padrão de fosforilação proteica da tirosina (GREEN e WATSON, 2001). Devido a esse fato, o termo “criocapacitação” é utilizado (THOMAS et al., 2006).

Um aspecto interessante da estrutura das membranas espermáticas de ovinos é a baixa proporção de lipídeos:colesterol, quando compara-se com outras espécies, o que aumenta a característica de maior sensibilidade à desestabilização e fluidez da MP. Além dessa característica, a MP de ovinos ainda apresenta uma distribuição assimétrica dos fosfolipídeos (HINKOVSKA et al., 1986). Moléculas de fosfatidilcolina e esfingomielina ficam concentradas na parte externa da bicamada e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina estão concentradas na parte interna. No processo de capacitação e criopreservação dos espermatozoides, ocorre uma translocação dessas moléculas na MP, resultando na exteriorização das moléculas de fosfatidilserina e de fosfatidiletanolamina. A este processo de translocação de moléculas, dá-se o nome de *scrambling* (DE LAMIRANDE et al., 1997).

A translocação lipídica dá-se quando a membrana passa pela fase de transição gel – cristalina, a qual favorece o deslocamento das proteínas para a região mais fluída da membrana (que ainda não se cristalizou), permitindo que os lipídios dessa região invertam sua posição polar-apolar. Essa translocação de fosfolipídeos é atrelada a uma desordem lipídica tendo como consequência o aumento da fluidez da membrana e sua instabilidade. A alteração da fluidez está relacionada com a função do colesterol de manter a MP estável, impedindo o aumento da fluidez da membrana. No entanto, o efluxo de colesterol durante a capacitação aumenta a desordem da membrana resultando na formação de poros na membrana fazendo com que esta perca sua função de permeabilizar a célula, tornando-a vulnerável à perda e entrada de íons, descontrolando seu equilíbrio osmótico (PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

Tal alteração na composição lipídica também costuma ocorrer após os tratamentos de criopreservação (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989). Dessa forma, assim como na capacitação, a criopreservação leva a membrana a um maior

estado de fluidez e exposição de sítios de ligação a moléculas externas, facilitando ou requerendo menor tempo para a célula se capacitar (THOMAS et al., 2006).

A capacitação foi descrita como uma “janela de desestabilização” na qual o sêmen adquire capacidade fertilizante, mas também está susceptível a degeneração de membranas e RA espontânea. Adicionalmente, a criopreservação faz com que a organização das membranas espermáticas de ovinos se comportem de forma diferente da fisiológica, formando subpopulações cujos padrões de capacitação que distinguem-se entre si (MULLER et al., 1999). Consequentemente, há um número maior de células com membranas lesadas, resultando em células parcial ou totalmente capacitadas. Em espécies cuja a congelabilidade seminal é atingida, há um número menor de células capacitadas (HARRISON, 1996). Em resumo, pode-se afirmar que os espermatozoides criopreservados e os capacitados compartilham várias características entre si, embora a expressão das alterações durante o evento da capacitação siga caminhos celulares um pouco diferentes (GREEN e WATSON, 2001).

Pérez et al. (1996) demonstraram que os espermatozoides criopreservados ovinos sofreram capacitação mais rapidamente que os frescos após 2 h de incubação, determinada pela avaliação do CTC. Estudos comparando o sêmen fresco e congelado/descongelado de carneiros selvagens, relataram aumento significativo de células capacitadas e reagidas após o descongelamento (MEJIA et al., 2009). Pérez-Pé et al. (2002) afirmaram que o choque térmico induz alterações moleculares nas células espermáticas de ovinos, semelhantes àquelas relacionadas com a capacitação. Além disso, as proteínas do plasma seminal previnem essas alterações devido a inibição da fosforilação proteica da tirosina, o que pode explicar a diferença do status da capacitação entre o sêmen fresco e descongelado. Gillan et al. (1997) observaram que a maioria dos espermatozoides ovinos, no sêmen fresco, apresentavam padrão de coloração referente à células não capacitadas (61,3%). Após incubação de 6 h, a maioria dos espermatozoides sofreu capacitação (54%) ou RA (41%). Em contraste, a maioria dos espermatozoides descongelados apresentavam-se capacitados (65,9%), reagidos (25,9%) e com uma pequena proporção de não capacitados (6,7%) imediatamente após o descongelamento. Após a incubação, as células se apresentavam, predominantemente, reagidas (64,2%). Esses dados sugerem que tanto a criopreservação como a incubação induzem

alterações relacionadas a capacitação, em ovinos. Além dessa constatação, os autores afirmaram que a incubação de células previamente capacitadas resultou na RA.

2.1.2 Avaliação espermática

Os espermatozoides são células complexas que precisam cumprir uma série de atributos para se tornarem aptos a fertilizar o gameta feminino. Estes precisam passar pelo processo de hiperativação da motilidade, manterem seu acrossoma intacto, se capacitarem, permanecerem com seu DNA íntegro e serem capazes de se ligar a zona pelúcida do oócito (GILLAN et al., 2005). Logo, uma célula espermática precisa apresentar vários atributos desejáveis para fertilizar o oócito. Dessa forma, nenhuma técnica laboratorial é capaz de, através da avaliação de apenas um atributo do espermatozoide, classificá-lo como apto ou não à fertilização (GRAHAM, 2001).

Tradicionalmente, além de volume e aspecto, a análise do sêmen inclui a determinação de concentração, motilidade e morfologia espermática, rotineiramente realizadas por microscopia óptica convencional de campo claro. Embora as avaliações seminais de rotina sejam bons indicadores de fertilidade, elas não podem validar o potencial fertilizante de um carneiro, já que a fertilização é um evento bastante complexo. Muitos testes e avaliações seminais são propostos para avaliar os aspectos funcionais e estruturais das células espermáticas, logo, quanto mais parâmetros espermáticos puderem ser acessados e analisados, maior acurácia determinado teste apresentará (AMMAN e HAMMERSTEDT, 1993). Infelizmente, não há um único teste definitivo que permita prever o potencial fertilizante da amostra seminal (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006).

Nos animais domésticos, o impacto da infertilidade do macho é grande uma vez que o mesmo é utilizado, normalmente, em um grande número de fêmeas durante a estação reprodutiva. A fim de se estimar o potencial de fertilidade do carneiro, é realizada a avaliação do sêmen e exames clínicos complementares (FARQUHARSON, 2009). Uma avaliação espermática ideal deve ser: objetiva, excluindo os erros do julgamento humano; apresentar repetibilidade, sendo capaz de

produzir resultados semelhantes quando a avaliação é repetida; precisa; rápida e barata (AMANN, 1989).

A avaliação seminal era rotineiramente realizada através do uso da microscopia óptica convencional de campo claro. As limitações desse tipo de avaliação incluem subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e baixa correlação com o potencial fertilizante (VERSTEGEN et al., 2002). Nos últimos anos, foram desenvolvidas diversas técnicas mais específicas a fim de se acessar informações detalhadas a nível estrutural, funcional e bioquímico da célula espermática, como ocorre por meio do uso de sondas fluorescentes, citometria de fluxo e análises computadorizadas (SILVA e GADELLA, 2006).

2.1.2.1 Avaliação morfológica

Para avaliação de rotina das características morfológicas dos espermatozoides, são utilizadas duas técnicas principais: esfregaços corados e avaliados em microscópio de campo claro, e preparação úmida para análise em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não (FRENEAU, 2011). O método de preparação úmida usando microscopia de interferência diferencial ou contraste de fase é mais indicado que esfregaços corados por técnicas convencionais (CBRA, 2013).

As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu, como: cabeça, peça intermediária ou cauda. Outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários ou defeitos maiores e menores (BLOOM, 1972), de acordo com o prejuízo causado à fertilidade.

Outra classificação morfológica dos espermatozoides foi sugerida. Nesta classificação, as alterações morfológicas foram divididas como compensáveis ou não compensáveis. Essa classificação considera que os espermatozoides anormais podem reduzir a fertilidade de um macho por dois motivos principais. O primeiro deles é pela sua eventual incapacidade em alcançar o local da fertilização, muitas vezes atribuída a defeitos que influenciam negativamente no transporte espermático. Esses

defeitos causam redução da motilidade espermática e fazem com que os espermatozoides tenham menor probabilidade de transcender com sucesso o trato reprodutivo feminino. São as anomalias morfológicas denominadas de “defeitos compensáveis”, dentre as quais poderiam ser citadas defeitos de cauda, gotas citoplasmáticas e defeitos sutis no formato da cabeça. Segundo este tipo de classificação, em tese, um aumento no número de espermatozoides funcionalmente competentes poderia resolver ou mitigar o problema de fertilidade de um ejaculado ou de uma partida de sêmen (SAACKE, 2008).

Por outro lado, existem defeitos espermáticos que determinam ao espermatozoide, mesmo que este alcance normalmente o sítio de fertilização, uma incapacidade intrínseca para fertilizar o oócito ou para sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, com mais falhas acontecendo antes do reconhecimento materno da gestação. Essas anomalias espermáticas são denominadas de “defeitos não compensáveis” e, diferentemente do primeiro caso, não são passíveis de elevação da fertilidade, mesmo que haja um incremento no número de espermatozoides no ejaculado (SAACKE, 2008).

2.1.2.2 Sondas fluorescentes

2.1.2.2.1 Avaliação da Integridade de membrana plasmática

A perda da integridade de MP é considerada incompatível com a viabilidade espermática e a análise de sua integridade permite classificar o espermatozoide como viável ou não (YÁNIZ et al., 2008). A integridade da MP é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozoides a sondas fluorescentes e corantes impermeáveis à membrana. Esses, normalmente, são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (SILVA e GADELLA, 2006). Dessa forma, muitas sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas isoladamente ou em combinação visando examinar a integridade de membranas e a viabilidade espermática com o auxílio da microscopia de epifluorescência e/ou o citômetro de fluxo, podendo ser realizada com mais rapidez e acurácia para mensurar atributos espermáticos em larga escala

(GILLAN et al., 2005). Vários estudos, em ovinos, demonstram o uso de sondas fluorescentes na análise da integridade de MP, como: combinação do corante iodado de propídeo (IP) e a laranja de acridina (LA) (PALACÍN et al., 2013; YÁNIZ et al., 2013a; YÁNIZ et al., 2013b; VICENTE-FIEL et al., 2014); IP e carboxifluoresceína (PÉREZ-PÉ et al., 2002; GRASA et al., 2004; GRASA et al., 2006; MARTÍ et al., 2006; YÁNIZ et al., 2008; YÁNIZ et al., 2012; YÁNIZ et al., 2013b); IP e Hoechst (YÁNIZ et al., 2013b; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015); SYBR-14 e IP (GIL et al., 1999; YÁNIZ et al., 2013b).

Yániz et al. (2013a) propuseram o uso da combinação de LA e IP para avaliação de integridade de membrana em ovinos. Apesar de ser uma combinação pouco usual para esse tipo de análise, os autores validaram seu uso. Nesse estudo, foi demonstrado que o modo de preparo das amostras é simples, não requer incubação, já que a penetração de ambas sondas é imediata e não há necessidade de imobilização das células com formaldeído. Além disso, a técnica se torna vantajosa por ser pouco passível a erros iatrogênicos e resultados falsos, fazendo com que a avaliação da amostra se torne fidedigna em relação ao ejaculado do macho. Outros autores também utilizaram tal combinação com sucesso em ovinos (PALACÍN et al., 2013; YÁNIZ et al., 2013b; VICENTE-FIEL et al., 2014).

Além da análise da integridade de MP, o uso das sondas fluorescentes permite a avaliação de outros parâmetros espermáticos como: integridade de membrana acrossomal, potencial mitocondrial, translocação de fosfolipídios de membrana, índice de fragmentação de DNA, integridade do flagelo, lipoperoxidação, fosforilação da tirosina, RA, dentre outros parâmetros (ARRUDA et al., 2003).

2.1.2.2.1 Avaliação da capacitação espermática

O uso do antibiótico CTC se apresenta como um método rápido para avaliação de capacitação espermática (SALING e STOREY, 1979). O CTC é uma sonda fluorescente quelante de cálcio. Desta forma, a molécula de CTC possui a habilidade de indicar a localização de cálcio na membrana. Durante a capacitação, modificações na distribuição da fluorescência do CTC são observadas em resposta às alterações

de MP da cabeça do espermatozoide (SALING e STOREY, 1979), demonstrando diferentes padrões de colorações, os quais refletem diferentes estágios do processo de capacitação. Existem três padrões de fluorescência: padrão F (*full*), devido à característica da cabeça do espermatozoide apresentar-se com completa fluorescência, indicando células não capacitadas e com acrossoma intacto; padrão B (*banded*), devido à fluorescência estar distribuída de forma brilhante na região acrossomal e ausência de brilho na região pós acrossomal, indicando células capacitadas e com acrossoma intacto e padrão AR (*acrosome reaction*), que corresponde à ausência de brilho fluorescente na cabeça, indicando células que sofreram RA (CORMIER et al., 1997).

O antibiótico atravessa a MP do espermatozoide e entra nos compartimentos intracelulares contendo cálcio livre. Nesses compartimentos intracelulares, o CTC se torna negativamente carregado e se liga ao cálcio, gerando a fluorescência. O complexo CTC-cálcio se liga preferencialmente a regiões hidrofóbicas, como na membrana, resultando nos diferentes padrões de coloração citados. As observações desses padrões precisam ser avaliadas no microscópio de epifluorescência (SALING e STOREY, 1979).

Vários estudos utilizaram a técnica de CTC em ovinos com sucesso (PÉREZ et al., 1995; PÉREZ et al., 1996; GILLAN et al., 1997; GIL et al., 1999; PÉREZ-PÉ et al., 2002; GRASA et al., 2006; MARTÍ et al., 2006; CASAO et al., 2009; MEJIA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; HASSANPOUR et al., 2010; ROMÃO et al., 2013; LUNA et al., 2015).

2.1.2.3 Análise computadorizada do sêmen - CASA

Para reduzir a subjetividade das análises espermáticas, nos últimos 15 anos, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen, o CASA, vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada célula espermática e o resumo estatístico das subpopulações (VERSTEGEN et al., 2002). Este sistema pode ainda ser modificado para capturar dados para classificação morfométrica de cada célula examinada (AMANN e KATZ, 2004).

O CASA é um sistema automático utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas e precisas do movimento individual de cada célula espermática (AMANN e KATZ, 2004). Independente do fabricante, os diferentes instrumentos são baseados em princípios similares, mas diferem em termos de ótica usada e de software para a identificação do espermatozoide e a construção da trajetória, respectivamente (KRAEMER et al., 1998).

O CASA têm substituído a avaliação de sêmen por microscopia óptica convencional de campo claro também porque fornece informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria espermática (VERSTEGEN et al., 2002). A análise computadorizada possibilita a avaliação objetiva de diferentes parâmetros espermáticos como cinética, motilidade, viabilidade e morfologia. As características mais comumente avaliadas pelo CASA são: VCL (Figura 1); velocidade linear (VSL; Figura 1); velocidade média do percurso (VAP; Figura 1); ALH (Figura 1); frequência do batimento cruzado (BCF); LIN; retilinearidade (STR); e WOB (VERSTEGEN et al., 2002).

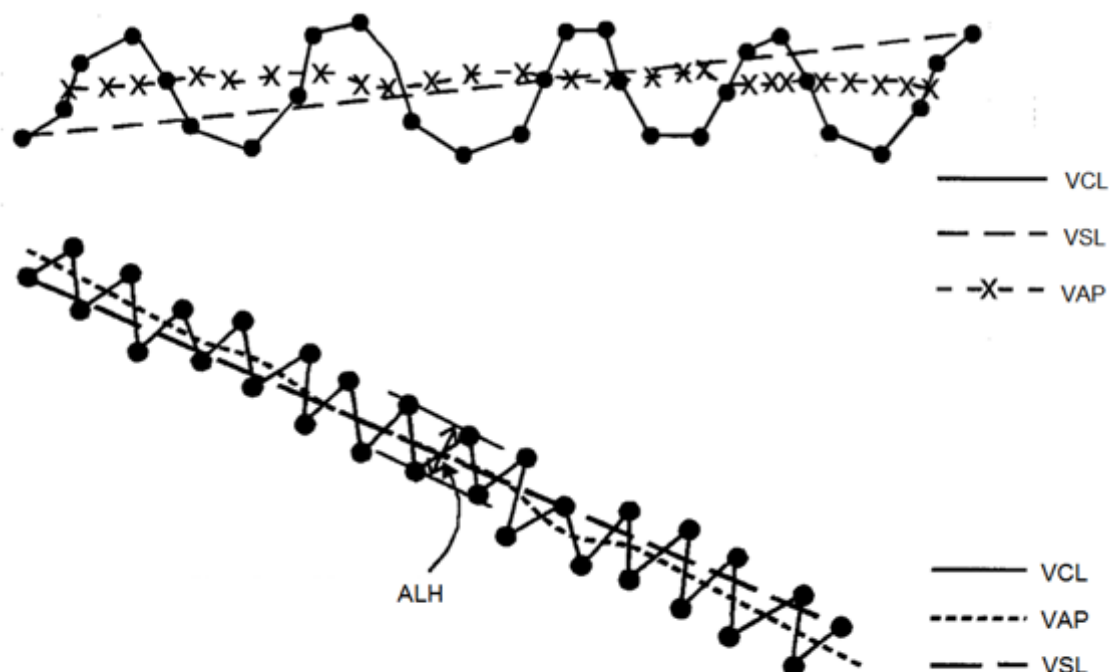


Figura 1. Representação esquemática da velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), velocidade média (VAP) e deslocamento lateral da cabeça (ALH) da trajetória de uma célula espermática. Retirado da revisão de Mortimer, 1997; 2000.

Para descrever as trajetórias espermáticas, são estudados três parâmetros que resultam da proporção entre as velocidades, são elas a LIN, STR e WOB (BOYERS et al., 1989).

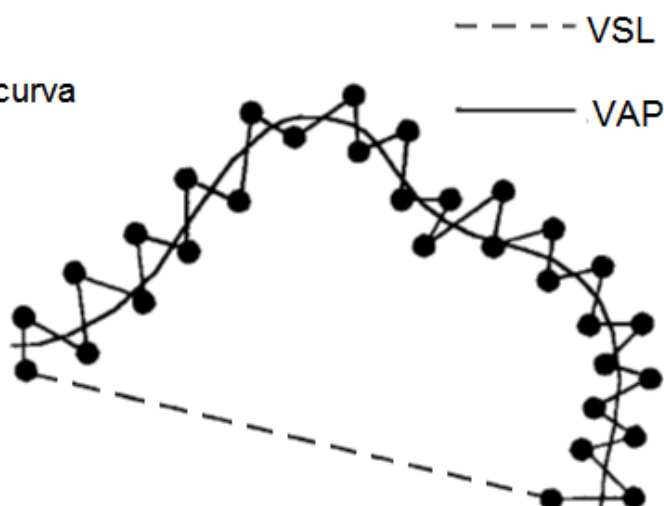
O parâmetro VCL ($\mu\text{m/s}$) é definido como a velocidade média do espermatozoide de um ponto a outro do trajeto realizado, incluindo todos os desvios do movimento de sua cabeça. Trata-se da velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade. A VSL ($\mu\text{m/s}$) é definida como a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do percurso. É sempre a mais baixa das três velocidades. A VAP ($\mu\text{m/s}$) é definida como a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula (VERSTEGEN et al., 2002). Em casos onde a

trajetória espermática é regular e linear, com pouco movimento lateral da cabeça, o valor de VAP é quase o mesmo que o de VSL. Porém, quando as trajetórias são irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de desvio lateral da cabeça em relação à direção do movimento, a VAP será maior que a VSL (Figura 2; MORTIMER, 2000).

Trajetoória regular



Trajetoória em curva



Trajetoória com alta amplitude no movimento

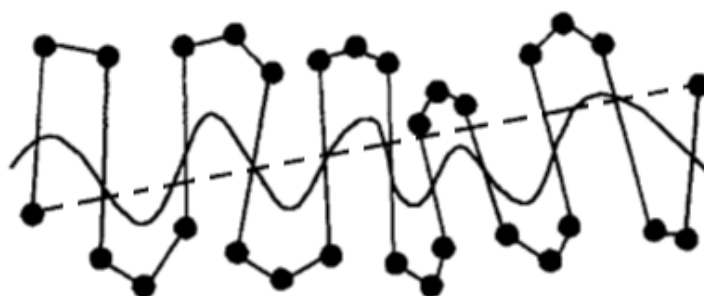


Figura 2. Representação esquemática demonstrando a relação entre velocidade linear (VSL) e velocidade média (VAP) em diferentes tipos de trajetórias espermáticas. Adaptado de Mortimer (2000).

A variável ALH (μm) é definida como o valor médio da oscilação lateral da cabeça do espermatozoide enquanto se move ou a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização. A BCF (Hz) é definida como a frequência que a cabeça do espermatozoide cruza sua trajetória média por segundo ou o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (VERSTEGEN et al., 2002). É um parâmetro útil para observar alterações no padrão do batimento flagelar. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada (MORTIMER e SWAN, 1995).

A LIN (%) é definida como o valor médio da proporção entre VSL e VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (VERSTEGEN et al., 2002; MORTIMER, 2000). A STR (%) é definida como o valor médio da proporção entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. A variável WOB (%) é definida como o valor médio da proporção entre VAP e VCL (VERSTEGEN et al., 2002).

Uma trajetória circular apresenta baixos valores de LIN uma vez que o trajeto curvilíneo (ou seja, a circunferência do círculo) é maior que o espaço percorrido (ou seja, a distância entre os dois pontos percorridos). Já a trajetória que apresenta altos valores de LIN, é aquela cujo o trajeto curvilíneo apresenta baixa amplitude lateral de cabeça e a direção do movimento se dá relativamente em linha reta (MORTIMER, 2000).

Uma trajetória que percorre pontos uniformemente espaçados e apresenta uma baixa amplitude teria um alto valor de STR, já que o caminho médio se aproximaria do trajeto em linha reta. Uma trajetória circular apresenta baixos valores de STR uma vez que o trajeto médio é a média do trajeto curvilíneo, logo, o STR será maior que a LIN, mas ainda baixo (MORTIMER, 2000).

A variável WOB seria baixa em uma trajetória extensa e ampla, com valores altos de ALH. Porém, apresentaria altos valores em um trajeto circular, já que os trajetos curvilíneo e médio são similares (MORTIMER, 2000).

O desenvolvimento do CASA e a avaliação objetiva dos parâmetros espermáticos ajudou a aumentar a precisão e confiabilidade das análises de motilidade, fornecendo mais informações sobre a qualidade do sêmen quando se compara com a avaliação subjetiva. Além disso, o CASA facilita a comparação de resultados e faz com que seja possível encontrar diferenças sutis entre machos ou tratamentos (VERSTEGEN et al., 2002). Um estudo recente validou e padronizou o uso do CASA para avaliação da motilidade do sêmen de carneiros, associando a confiabilidade do CASA com o potencial reprodutivo dessa espécie (PALACÍN et al., 2013).

A motilidade é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade do sêmen, fornecendo importantes informações sobre o status energético da célula espermática. A motilidade ativa é essencial para o espermatozoide ultrapassar o muco cervical e atingir o sítio de fertilização na tuba uterina (YÁNIZ et al., 2006). Entretanto, existem grandes variações na estimativa subjetiva da motilidade, mesmo avaliando a mesma amostra (CONTRI et al., 2010). Alguns estudos, utilizando o CASA em carneiros, associaram valores desejáveis da motilidade espermática (SMITH et al., 1998; SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999) e de VCL e VAP (ROBAYO et al., 2008) com a fertilidade e a habilidade migratória da célula espermática no muco cervical. Embora a utilização da avaliação *in vitro* de sêmen de ovinos não seja tão difundida como em outras espécies, por exemplo bovinos e suínos, vários estudos vêm aprimorando o uso do CASA nessa espécie (HOLT e PALOMO, 1996; GIL et al., 1999; SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999; ARMAN et al., 2006; ROBAYO et al., 2008; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2010; HASSANPOUR et al., 2010; YÁNIZ et al., 2012; PALACÍN et al., 2013; VICENTE-FIEL et al., 2014; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2015; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015).

A avaliação de motilidade em seus diversos parâmetros é realizada rigorosamente por um sistema estroboscópico de alta precisão totalmente controlado por computador. Utiliza-se vídeomicrografia que faz o monitoramento constante e análise sequencial do movimento do espermatozoide (AMANN e KATZ, 2004). Por meio do uso de microscópio com contraste de fase, as células espermáticas são mais claramente visualizadas no meio onde estas se encontram, o que permite a detecção e o rastreamento dessas células. O processo de detecção automática das células, denominado segmentação, é então realizado pelo sistema comparando a intensidade

da imagem adquirida com um limiar de intensidade pré-estabelecido (MORTIMER, 2000).

O tamanho mínimo e máximo aceitável para a cabeça do espermatozoide de cada espécie é padronizado pelo sistema e o computador irá reconhecer um objeto que cair dentro da faixa de tamanho de cabeça espermática pré-estabelecida. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo deste limiar serão considerados parte do fundo (MORTIMER, 2000).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. The human spermatozoon: a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, v.115, p.1-7, 1999.

ALVAREZ, J.G., LASSO, J.L., BLASCO, L., NUNEZ, R., HEYNER, S., CABALLERO, P.P., STOREY, B.T. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod*, v.8, p.1087–1092, 1993.

ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidation damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl*, v.13, p.232–241, 1992.

AMIRIDIS, G. S., CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v. 130, n. 3-4, p. 152–161, 2012.

AMMAN, R.P. Can fertility potential of a semen sample be predicted accurately? *J Androl*, v.10, p.89-98, 1989.

AMMAN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl*, v.14, p.397–406, 1993.

AMANN, R., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.

ANDERSEN, C.Y., GRINSTED, A. New method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: Polysucrose media compared to Percoll media. *J of Assist Reprod and Genet*, v.14, n. 10, 1997.

ARMAN, C., QUINTANA CASARES, P.I., SANCHEZ-PARTIDA, L.G., SETCHELL, B.P. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. *Asian J Androl*, v.8, p.411–418, 2006.

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., ALEXANDRE ROSSETO GARCIA, CARLI, G. DE, LEITE, T.G., OLIVEIRA, L.Z., LANÇONI, R., RODRIGUES, M.D.P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.39, p.47-60, 2015.

ARRUDA, R.P., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Sci Vet*, v.31, p.226-227, 2003.

AUSTIN, C.R. Ageing and reproduction: post-ovulatory deterioration of the egg. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.12, p.39–53, 1970.

AUSTIN, C.R. The capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature*, v.170, p.326-332, 1951.

BAI, J., HOU, J., GUAN, H., YAN, F., CUI, X., LIU, L., WANG, S., AN, X. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during in vitro maturation on the

developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. *Theriogenology*, v.70, p.758–764, 2008.

BAILEY, J.L. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med*, v.56, p.334–348, 2010.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl*, v.21, p.1–7, 2000.

BERLINGUER, F. Glucogenic supply increases oocyte developmental competence in sheep. *Reprod Fertil Dev*, v.24, p.1055–1062, 2012.

BLOOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383–391, 1972.

BOYERS, S.P., DAVIS, R.O., KATZ, D.F. Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil*, v.5, p.167–200, 1989.

BRUCKER, L., LIPFORD, G.B. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update*, v.1, p.57–62, 1995.

CARRELL, D.T., KUNECK, P.H., PETERSON, C.M. A randomized, prospective analysis of five sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil Steril*, v.69, p.122–126, 1998.

CASAO, A., MENDOZA, N., PÉREZ-PÉ, R., GRASA, P., ABECIA, J.A., FORCADA, F., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A., MUINO-BLANCO, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res*, v.48, p.39–46, 2009.

CATALA, M.G., IZQUIERDO, D., RODRÍGUEZ-PRADO, M., HAMMAMI, S., PARAMIO, M.T. Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil Steril*, v.97, p.1004–1008, 2012.

CENTOLA, M.C., RITA, H., ANDOLINA, E., WEISENSEL, S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril*, v.70, n.6, 1998.

CHANG, M.C. A detrimental effect of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, v.168, p.687–688, 1951.

CISALE, H., FISCHMAN, M., BLASI, C., FERNANDEZ, H., GLEDHILL, B. Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrixes. *Andrologia*, v.33, p.143–150, 2001.

COCERO, M.J., ALABART, J.L., HAMMAMI, S., MARTÍ, J.I., LAHOZ, B., SÁNCHEZ, P., ECHEGOYEN, E., BECKERS, J.F., FOLCH, J. The efficiency of in vitro ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reprod. Domest. Anim*, v.46, p.463–470, 2011.

COGNIÉ, Y., POULIN, N., LOCATELLI, Y., MERMILLOD, P. State-of-art production, conservation and transfer of in vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.437–445, 2004.

COLAS, C., JAMES, P., HOWES, L., JONES, R., CEBRIAN-PEREZ, J.A., MUINO-BLANCO, T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.649– 658, 2008.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed, Belo Horizonte, 49 p, 2013.

CONTRI, A., VALORZ, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L., CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, p.424–435, 2010.

CORMIER, N., BAILEY, J.L. A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod*, v.69, p.177–185, 2003.

CORMIER, N., SIRARD, M.A., BAILEY, J.L. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *J Androl*, v.18, p.461-468. 1997.

COX, J. F., ALFARO, V. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in domestic animals*, v. 42, n. 1, p. 83–7, 2007.

CROSS, N.L. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod*, v.71, p.1367–1373, 2004.

DE LAMIRANDE, E., LECLERC, P., GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, v. 3, n. 3, p.175- 194, 1997.

DEMOTT, R.P., LEFEBVRE, R., SUAREZ, S.S. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod*, v.52, p.1395–1403, 1995.

DODE, M.A.N., RODOVALHO, N.C., UENO, V.G., FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Scie*, v. 69, p.15–23, 2002.

FARQUHARSON, B. A whole farm approach to planned animal health and production for sheep clients in Australia. *Small Rumin Res*, v.86, p.26–29, 2009.

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

FORCADA, F., ESTAÚN, J., CASAO, A., SÁNCHEZ-PRIETO, L., PALACÍN, I., ABECIA, J.A. In vitro embryo production can be modified by the previous ovarian response to a superovulatory treatment in sheep. *Span J Agric Res*, v.11, p.366–370, 2013.

FRASER, L.R. Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev*, v.36, p.368-379, 1993.

FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.2, p.160-170, 2011.

GADELLA, B.M., HARRISON, R.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the plasma membrane. *Development*, v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O., 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. 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.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., JIMÉNEZ-RABADÁN, P., RAMÓN, M., DEL OLMO, E., INIESTA-CUERDA, M., ANEL-LÓPEZ, L., FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R., GARDE, J.J., SOLER, A.J. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*, v.84, p.948–955, 2015.

GARCIA-GARCIA, R.M., WARD, F., FAIR, S., O'MEARA, C.M., WAD, M., DUFFY, P., LONERGAN, P. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/ G2.3 sequential media. *Anim Reprod Sci* v.98, p.233–240, 2007.

GIL, J., SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, v.54, p.93–108, 1999.

GILLAN, L., EVANS, A. G., MAXWELL, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* v.9, p.481–487, 1997.

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

GONÇALVES, P.B.D., VISINTIN, J.A., OLIVEIRA, M.A.L., MONTANGER, M.M., COSTA, L.F.S. *In: Produção in vitro de embriões. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. Livraria Varela, 1 ed, São Paulo, p.195-226, 2001.*

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci*, v.68, p.239–247, 2001.

GRASA, P., CEBRIAN-PEREZ, J. A., MUINO-BLANCO, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*, v. 132, n. 5, p. 721–732, 2006.

GRASA, P., PÉREZ-PÉ, R., BÁGUENA, O., FORCADA, F., ABECIA, A, CEBRIÁN-PÉREZ, J. A, MUIÑO-BLANCO, T. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl*, v.25, p.982–990, 2004.

GREEN, C. E., WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, v.122, p.889–898, 2001.

HARRISON, R.A.P. Capacitation mechanism, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.581–594, 1996.

HASSANPOUR, H., MIRSHOKRAEI, P., TAJIK, P., HAGHPARAST, A. In vitro effects of pentoxifylline on kinematic parameters, capacitation, and acrosome reaction of ram epididymal sperm. *Comp Clin Path*, v.19, p.377–381, 2010.

HEIDARI, B., SHIRAZI, A., NADERI, M.M., AKHONDI, M.M., HASSANPOUR, H., SARVARI, A., BORJIAN, S. Effect of various co-culture systemson embryo development in ovine.*Czech J Anim Sci*, v.58, p.443–452, 2013.

HENKEL, R.R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal of Andrology*, v. 14, n. 2, p. 260–269, 2012.

HENKEL, R.R., SCHILL, W.B. Sperm preparation for art. *Reprod Biol Endocrinol*, v.14, n.1, p.108, 2003.

HERRERO, M.B., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation *in vitro*. *Biol of Reprod*, v.61, p.575–581, 1999.

HERRICK, J.R., LANE, M., GARDNER, D.K., BEHBOODI, E., MEMILI, E., BLASH, S., ECHELARD, Y., KRISHER, R.L. Metabolism, protein content, and in vitro embryonic development of goat cumulus–oocyte complexes matured with physiological concentrations of glucose and L-lactate. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.256–266, 2006.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V., PETKOVA, D., KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, v.26, p.70–75, 1989.

HINKOVSKA, V., DIMITROV, G., KOUMANOV, K. Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes. *Znt. J. Biochem*, v.18, p.1115–1121, 1986.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3–22, 2000.

HOLT, W.V., PALOMO, M.J. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.219–230, 1996.

IGNOTZ, G.G., LO, M.C., PEREZ, C.L., GWATHMEY, T.M., SUAREZ, S.S. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, v. 64, p.1806–1811, 2001.

ISACHENKO, V., ALABART, J.L., DATTENA, M., NAWROTH, F., CAPPAL, P., ISACHENKO, E., COCERO, M.J., OLIVERA, J., ROCHE, A., ACCARDO, C., KRIVOKHARCHENKO, A., FOLCH, J. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1209–1218, 2003.

KADIRVEL, G., KUMAR, S., KUMARESAN, A., KATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim. Reprod. Sci*, v.116, p.244–253, 2009.

KHALIFA, A.A., EL-SAIDY, B. pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim Reprod Scie*, v.93, p.303–315, 2006.

KRAEMER, M., FILLION, C., MARTIN-PONT, B., AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measuring by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod*, v.13, p.611-619, 1998.

LAHOZ, B. Influence of the FecX+R++ allele in heterozygous ewes on follicular population and outcomes of IVP and ET using LOPU-derived oocytes. *Reprod Dom Anim*, v.48, p.717–723, 2013.

LI, F., PI, W.H., ZHU, H.Z., ZHANG, S.S., LIU, S.R., XUE, J.L. The effect of estrous ewe serum and heparin on in vitro fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Rumin. Res*, v.63, p.226–232, 2006.

LOPES, M.D., PAPA, F.O. Effects of different diluents and method of centrifugation for freeze canine semen *In: CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23., 1998, Buenos Aires. Proceedings... Buenos Aires*, p.799, 1998.

LUNA, C., COLÁS, C., CASAO, A., SERRANO, E., DOMINGO, J., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A., MUIÑO-BLANCO, T. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. *Theriogenology*, v.83, p.670–678, 2015.

MACHADO, G.M., CARVALHO, J.O., FILHO, E.S., 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.

MANJUNATH, P., BERGERON, A., LEFEBVRE, J., FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.65, p.217-228, 2007.

MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.

MARA, L., SANNA, D., CASU, S., DATTENA, M., MUÑOZ, I.M.M. Blastocyst rate of in vitro embryo production in sheep is affected by season. *Zygote* v.22, p.366–371, 2013.

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, p. 746–753, 2006.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C., ALVAREZ, M., LÓPEZ-URUEÑA, E., GOMES-ALVES, S., ANEL-LÓPEZ, L., CHAMORRO, C.A., ANEL, L., DE PAZ, P. Ram spermatozoa migrating through artificial mucus in vitro have reduced mitochondrial membrane potential but retain their viability. *Reprod Fertil Dev*, v.27, p.852–864, 2015.

MAX, M.C., SANTOS, G.M.G., MELO-STERZA, F. A., SILVA-SANTOS, K.C., MOROTTI, F., BASSO, A. C., PONTES, J.H.F., BALDASSARRE, H., SENEDA, M.M. In vitro embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo transport. *Small Rumin. Res.* 105, 286–289, 2012.

MEDEIROS, C.M.O., PARRISH, J.J. Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Molec Reprod Develop*, v.44, p.525-532, 1996.

MEJIA, M., MEDRANO, A., GONZALEZ-REBELES, C., MEJIA, O. Capacitation status of frozen-thawed spermatozoa from wild ruminant species. *Eur. J. Wildl. Res.*, v.55, p.1–6, 2009.

MORRELL, J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Androl J*, v.1, p.1–9, 2009.

MORTIMER, D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.25-31, 1994.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Upd*, v.3, n.5, p. 403-439, 1997.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. *J Androl*, p.515-524, 2000.

MORTIMER, S.T., SWAN, M.A. Variable kinematics of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.10, p.3178–3182, 1995.

MUJICA, A., NERI-BAZAN, L., TASH, J., URIBE, S. Mechanism for procaine-mediated hyperactivated motility in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Develop*, v.38, p.285–292, 1994.

MÜLLER, K., POMORSKI, T., MÜLLER, P., HERRMANN, A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell Sci*, v.112, p.11–20, 1999.

O'FLAHERTY, C.M., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*, v.41, p.528-540, 2006.

OLIVARES, C.C.S., FONSECA, J.F., CAMARGO, L.S.A., SOUZA-FABJAN, J.M.G., RODRIGUES, A.L.R., BRANDÃO, F.Z. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rum Res*, v.127, p.44-49, 2015.

PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S., SANTOLARIA, P., YÁNIZ, J.L. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Rumin Res*, v.112, p.128–135, 2013.

PAPADOPOULOS, S., HANRAHAN, J.P., DONOVAN, A., DUFFY, P., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology*, v.63, p.150–159, 2005.

PARAMIO, M. T. In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, v. 89, n. 2-3, p. 144–148, 2010.

PARAMIO, M. T., IZQUIERDO, D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in domestic animals*, v. 49 Suppl 4, p. 37–48, 2014.

PARKS, J. E., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222,1992.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology*, v.51, p.461–472, 1999.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A., FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PEREIRA, R. M., BAPTISTA, M.C., BARBAS, J.P., PIMENTA J., SANTOS, I.C., MARQUES, M.R., VASQUES, M.I., PEREIRA, M.S., SILVA, F.S., M.C., SOUSA, M.C.O., FONTES, C.M.G., HORTA, A.E.M., PRATES, J.A.M., MARQUES, C.C. Doppel gene polymorphisms in Portuguese sheep breeds: insights on ram fertility. *Anim Reprod Sci*, v. 114, n. 1-3, p. 157–166, 2009.

PÉREZ, L.J., VALCARCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram

spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, v.45, p.1037–1046, 1995.

PÉREZ, L.J., VALCARCEL, A., HERAS, M.A., MOSES, D., BALDASARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by *Chlortetracycline* assay. *Theriogenol*, v.46, p.131-140, 1996.

PÉREZ-PÉ, R., GRASA, P., FERNÁNDEZ-JUAN, M., PELEATO, M.L., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., MUIÑO-BLANCO, T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 2, p. 226–233, 2002.

PICHARDO, A.I., ARAGÓN-MARTÍNEZ, A., AYALA-ESCOBAR, M.E., DOMÍNGUEZ-VARA, I.A. Viability tests, active caspase-3 and -7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *J. Androl.* v.31, p.169–176, 2010.

PTAK, G., LOI, P., DATTENA, M., TISCHNER, M., CAPPAL, P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod*, v.61, p.1568–1574, 1999.

PUGH, P.A., FUKUI, Y., TERVIT, H.R., THOMPSON, J.C. Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. *Theriogenology*, v.36, n.5, p.771-778, 1991.

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. *Theriogenol*, v.56, p.503-516, 2001.

ROBAYO, I., MONTENEGRO, V., VALDÉS, C., COX, J. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.393–399, 2008.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod. Domest. Anim.* 41, 2–10, 2006.

ROLDAN, E.R.S., HARRISON, R.A.P. Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca²⁺ ionophore induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochem J*, v.259, p.397-406, 1989.

ROMÃO, R., MARQUES, C.C., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., BARBAS, J.P., HORTA, A. E.M., CAROLINO, N., BETTENCOURT, E., PLANCHA, C., RODRIGUES,

P., PEREIRA, R.M. Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Rumin. Res.* v.110, p.36–41, 2013.

SAACKE, R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, v.70, p.473-478, 2008.

SAID, T., AGARWAL, A., GRUNEWALD, S., RASCH, M., BAUMANN, T., KRIEGLER, C., LI, L., GLANDER, H., THOMAS, A.J., PAASCH, U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod*, v.74, p.530–537, 2006.

SALICIONI, A.M., PLATT, M.D., WERTHEIMER, E.V., ARCELAY, E., ALLAIRE, A., SOSNIK, J., VISCONTI, P.E. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.65, p.245–259, 2007.

SALING, P.M., STOREY, B.T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol*, v.83, p.544–55, 1979.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G., WINDSOR, D.P., EPPLESTON, J., SETCHELL, B.P., MAXWELL, W.M. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen–thawed ram semen. *J. Androl.* v.20, p.280–288, 1999.

SHABANKAREH, H.K., AKHONDI, M. Effect of glucose levels and MEM vitamins during the first step of IVC in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of ovine zygotes. *Small Rumin Res*, v.106, p.54–58, 2012.

SHAMSUDDIN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic Swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Anim Reprod Scie*, v.36, p.61-75, 1994.

SHIRAZI, A., MOTAGHI, E. The in vitro fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development. *J. Reprod. Infertil.* v.14, p. 8–16, 2013.

SIMPLÍCIO, A. A. Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária – Brasília – DF.* n.52, p.27-35, 2011.

SILVA, J.C.B., OKABE, W.K., TRALDI, A.S. Do bovino ao ovino: uma visão das dificuldades e sucessos da produção comercial de embriões *in vitro* de ovinos. *Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.95-100, 2012.

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

SMITH, J.F., PARR, J., MURRAY, G.R., CLARKE, A.G., MCDONALD, R.M., DUGANZICH, D.M. Relationship between laboratory measures of ram sperm competence and field fertility. *Proc New Zealand Soc Anim Prod*, vol. 58, p. 181–185, 1998.

SREENIVAS, D., THOMAS. V.M., KALADHAR, D.S.V.G.K., YARLA, N.S., PALNI SAMY, A., VARAHALARAO, V., PREETHI, R. In vitro production of sheep embryos in CR1aa medium supplemented with L-ascorbic acid: effects on morula and blastocyst development. *J Bioanal Biomed*, v.5, p.187–193, 2013.

STOREY, B.T. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev*, v.7, p.927–942, 1995.

STREHLER, E., BACCETTI, B., STERZIK, K. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum Reprod*, v.13, p.120-123, 1998.

SUAREZ, S.S., REVAH, I., LO, M., KOELLE, S. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca²⁺-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis trisaccharide. *Biol Reprod*, v.59, p.39–44, 1998.

SUAREZ, S.S., VINCENTI, L. CEGLIA, M.W. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J Exp Zool*, v.244, p.331–336, 1987.

THOMAS, A.D., MEYERS, S.A, BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenol*, v.65, n.8, p.1531-1550, 2006.

TOPPER, E.K., KILLIAN, G.J., WAY, A., ENGEL, B., WOELDERS, H. Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.115, p.175–183, 1999.

VERSTEGEN, J.P., IGUER-OUADA, M., ONKLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenol*, v.57, p.149-179, 2002.

VIANNA, L.L., PRADIEÉ, J., SANTOS, E.C.S., GONÇALVES, A.O., PFEIFER, L.F.M., RHEINGANTZ, M.G.T., DODE, M.A.N., VIEIRA, A.D., LIMA, V.F.H., CORREA, M.N., PEGORARO, L.M.C. Isolate[®] and Optiprep[®] minigradients as alternatives for sperm selection in bovine in vitro embryo production. *Can. J. Anim. Sci*, v.94, p.35–42, 2014.

VICENTE-FIEL, S., PALACÍN, I., SANTOLARIA, P., FANTOVA, E., QUINTÍN-CASORRÁN, F.J., SEVILLA-MUR, E., YÁNIZ, J.L. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim Reprod Sci*, v.146, p.15–20, 2014.

VISCONTI, P.E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.106, p.667–668, 2009.

VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G. D., PAN, D., OLDS-CLARK, P., KOPF, S. Capacitation of mouse spermatozoa I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, v.121, p.1129–1137, 1995.

VISCONTI, P.E., GALANTINO-HOMER, H., MOORE, G.D., BAILEY, J.L., NING, X., FORNES, M., KOPF, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, v.19, p.242–248, 1998.

VISCONTI, P.E., GALANTINO-HOMER, H., NING, X., MOORE, G.D., VALENZUELA, J.P., JORGEZ, C.J., ALVAREZ, J.G., KOPF, G.S. Cholesterol efflux mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, v.274, p.3235–3242, 1999.

WALTERS, A. H. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *J Androl*, v.25, p.554–563, 2004.

WAN, P.C., HAO, Z.D., ZHOU, P., WU, Y., YANG, L., CUI, M.S., LIU, S.R., ZENG, S.M. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine in vitro fertilization embryos. *Anim Reprod Sci*, v.114, p. 279–288, 2009.

WANI, A.R., KHAN, M.Z., SOFI, K.A., LONE, F.A., MALIK, A.A., BHAT, F.A. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Rumin Res*, v.106, p.160–164, 2012.

WANI, N. A. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, v. 44, p. 89–95, 2002.

WANG, Z., LIN, P., YU, S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. *Theriogenology*, v.79, p.695–701, 2013.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, p. 871-891, 1995.

WENNEMUTH, G., CARLSON, A.E., HARPER, A.J., BABCOCK, D.F. Bicarbonate actions on flagellar and Ca^{2+} -channel responses: initial events in sperm activation. *Development*, v.130, p.1317–1326, 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization, Eds E Knobil & JD Neill. *New York: Raven Press Ltd*, 1994.

YÁÑIZ, J.L., LOPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R.H. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol*, v.35, p.28–34, 2006.

YÁÑIZ, J.L., PALACÍN, I., GOSALVEZ, J. Short communication . Evaluation of a commercial kit based on acridine orange / propidium iodide to assess the plasma membrane integrity of ram sperm. *Span J Agric Res*, v.11, p.362–365, 2013a.

YÁÑIZ, J., PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S., GOSALVEZ, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., SANTOLARIA, P. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.598–603, 2013b.

YÁÑIZ, J.L., SANTOLARIA, P., MARCO-AGUADO, M. A., LÓPEZ-GATIUS, F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*, v.70, p.192–198, 2008.

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

ZENG, Y., CLARK, E. N., FLORMAN. H. M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol*, v.171, p.554–63, 1995.

ZENG, Y., OBERDORF, J.A., FLORMAN, H.M. pH regulation in mouse sperm. Identification of Na , Cl^- and HCO_3^- -dependent and arylaminobenzoate dependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. *Dcv Biol*, v.173, p.510-520, 1996.

ZÚCCARI, C.E.S.N., CARRIJO, P.R., LEITE, P.A., SCALDELA, P.R.R., RODOVALHO, N.C.M., ZANENGA, C.A., KIEFER, C., SILVA, E.V.C. Seleção em

gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado.
Rev Bras Saúde Prod An, v.9, n.2, p. 358-366, 2008.

4. JUSTIFICATIVA

Na ovinocultura atual, há uma preocupação cada vez maior com a eficiência reprodutiva e adequação às biotécnicas. Diante da importância econômica que a atividade pecuária possui no Brasil e, dentro desse contexto, a crescente exploração da espécie ovina, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias relacionadas à reprodução que possam ser aplicadas de forma prática e eficiente, acelerando o ganho genético de ovinos.

No Brasil, a PIVE em ovinos ainda não é largamente praticada de forma comercial. Há relatos de casos experimentais que evidenciando vários obstáculos, dentre eles, a carência de protocolos padronizados e eficientes de preparo do sêmen. O uso em larga escala de sêmen criopreservado e os prejuízos que a criopreservação pode causar à célula espermática, torna o aperfeiçoamento de técnicas relacionadas à manipulação de amostras criopreservadas imprescindíveis no que concerne o uso do gameta masculino para a PIVE.

A proposta da presente pesquisa é estudar de forma criteriosa, e comparando com outras espécies que apresentam PIVE comercial e padronizada, tal obstáculo citado da técnica e adaptar protocolos de preparação de gametas masculinos à espécie ovina.

5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto até o presente tópico, as seguintes hipóteses científicas foram desenvolvidas: (1) a técnica de mini-Percoll não apresenta prejuízos aos parâmetros de viabilidade da célula espermática quando comparada a outras técnicas usualmente utilizadas durante a seleção; (2) o uso do mini-Percoll aparece como uma alternativa atrativa por minimizar o custo da etapa de preparação espermática e torná-la mais prática e eficiente; (3) o sêmen criopreservado de ovinos sofre capacitação espermática mais facilmente do que as espécies bovina e caprina nas mesmas condições de capacitação; (4) a heparina não apresenta efeitos na indução da capacitação de sêmen criopreservado de ruminantes domésticos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Estudar a etapa de preparação espermática na espécie ovina, aprimorando a seleção de espermatozoides de melhor qualidade para posterior aplicação em biotecnologias, e avaliar o evento de capacitação espermática no sêmen descongelado de ovinos, comparando-o com outras espécies de ruminantes, a fim de demonstrar sua maior facilidade de capacitação.

6.2 Objetivos específicos

Testar diferentes métodos de seleção espermática em sêmen descongelado de carneiros da raça Santa Inês e sua influência sobre a taxa de recuperação espermática, motilidade, cinética, integridade de MP, morfologia e capacitação espermática.

Testar diferentes forças e tempos de centrifugação de protocolos de mini-Percoll em sêmen descongelado de carneiros da raça Santa Inês e verificar como as alterações do procedimento influenciam positivamente os parâmetros espermáticos, quando comparado com a técnica tradicional de Percoll.

Avaliar e comparar o processo de capacitação espermática das espécies bovina, caprina e ovina após a seleção e ao longo de intervalos de incubação.

Avaliar o processo de capacitação espermática em sêmen descongelado de ovinos, comparando-o com outras espécies de ruminantes em meios capacitantes e não capacitantes.

7. CAPÍTULO 2

Comparison of different sperm selection techniques in ram frozen–thawed sperm

Comparação de diferentes técnicas de seleção espermática em sêmen congelado/descongelado de carneiros

Artigo publicado no periódico: Acta Scientiae Veterinariae

Em: Abril de 2017, v. 45: p.1431-1442.

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Comparison of different sperm selection techniques in ram frozen–thawed sperm

Carolina Cerqueira Sarmiento Olivares¹, Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan^{1,2}, Jeferson Ferreira da Fonseca³, Mario Felipe Alvarez Balaro¹, Vicente José de Figueirêdo Freitas⁴, Rodrigo Vasconcelos de Oliveira⁵ & Felipe Zandonadi Brandão¹

^a Faculty of Veterinary Medicine, Fluminense Federal University, Av. Vital Brasil Filho, 64, 24230-340 Niterói, RJ, Brazil; ^b Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, 25071-202, Duque de Caxias, RJ, Brazil; ^c Embrapa Goats and Sheep, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, CP 145, 62010-970 Sobral, CE, Brazil; ^d Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Veterinary School, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^e Department of Animal Production, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 07, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil.

ABSTRACT

Background: The success of fertilization is directly associated with semen quality and the sperm preparation. Considering the common use of cryopreserved spermatozoa, there is a need to develop strategies for sperm preparation in order to achieve a sperm sample of high quality through a rigorous selection of sperm. Thus, sperm cells are being more extensively investigate. This study aimed evaluating the influence of different sperm selection techniques on ram sperm parameters in semen preparation.

Materials, Methods & Results: Frozen-thawed commercial semen from 10 Santa Inês rams was subjected to either: swim-up, Percoll, mini-Percoll, sperm washing by centrifugation or a control group. After each technique, samples were incubated at 37 °C for 1 h, 2 h and 3 h. At post-selection moment (0 h) and at each interval, sperm recovery rate, motility, capacitation and plasma membrane (PM) integrity were analyzed. The lowest ($P < 0.05$) recovery rate was recorded after swim-up ($1.0 \pm 0.3\%$), whilst the others were similar ($P > 0.05$). Most part of motility parameters were not affected ($P > 0.05$) by the technique at 0 h; just swim-up obtained higher ($P < 0.05$)

values for VSL (41.8 ± 11.1) and VAP (46.9 ± 11.2). Overall, swim-up presented higher ($P < 0.05$) values for most of motility parameters over time of incubation. The control group led to more ($P < 0.05$) capacitated cells ($46.8 \pm 2.3\%$), whilst Percoll, mini-Percoll and swim-up were similar ($\sim 33\%$; $P > 0.05$), regardless of interval incubation. However, the latter three techniques presented more ($P < 0.05$) reacted cells. Swim-up recovered a higher ($P < 0.05$) number of intact cells ($32.1 \pm 6.4\%$), and Percoll, mini-Percoll and control group were similar ($P > 0.05$).

Discussion: The present study evaluated the sperm cell and its preparation for receiving the oocyte under optimal conditions. Although the swim-up technique promoted higher rates for some of the sperm parameters evaluated, Percoll protocols are the most widely used procedures for selection during the sperm preparation in many species, possibly because of its greater speed, practical method and convenience compared to the swim-up technique. Percoll and mini-Percoll recovered approximately 10 times more cells than swim-up, which is an important feature to be considered during sperm preparation for *in vitro* fertilization (IVF), being possible to use only one semen straw. The high capacitated and acrosome reaction rates observed after the treatments in the current study, are probably reinforced by changes in sperm cells caused by the cryopreservation process. In order to strength the evidence that frozen-thawed sperm, even after selection, is sensible and reactive to capacitation-like events, we demonstrated the capacitated and acrosome-reacted cell values immediately after the selection treatments behaved differently than when authors used ram fresh sperm. Possibly, this capacitation-like changes observed in frozen-thawed sperm occurs regardless of the selection treatment used. Analyzing the motility parameters immediately after the selection, all treatments maintained or increased the rates compared to the control group. The swim-up, mini-Percoll and

Percoll did not differ in any parameters. Given that Percoll and mini-Percoll did not show differences in relation to swim-up for motility parameters, such techniques can be used to replace the latter, obtaining similar sperm samples with good quality. However, swim-up technique involves a procedure that recovers a clean fraction without debris and other types of cells, with high rate of mobile sperm with excellent quality, reason why it can justify the higher recovery of intact spermatozoa after the technique.

Keywords: ovine; sperm preparation; sperm capacitation; CASA; CTC; plasma membrane integrity

INTRODUCTION

The ability to assess the fertilizing potential of a sperm sample is still considered a very difficult task and, unfortunately, there is not a single definitive and effective test that can predict such capacity. Thus, sperm cells are being more extensively investigated and their importance has been emphasized [32]. Considering the common use of cryopreserved spermatozoa, there is a need to develop strategies for sperm preparation in order to achieve a sperm sample of high quality through a rigorous selection of sperm [39]. To be effective, the sperm preparation method aims the selection of high quality sperm, with good rates of motility and viability [33].

In vivo, the sperm selection process is controlled by the female reproductive tract to ensure that the descendants receive high quality genetic material from the male gamete [11]. In order to achieve a sperm selection based on natural principles, researchers need to understand these events and reproduce them [21], through the development of a sperm preparation of excellence.

The sperm selection methods used in sheep are: swim-up [34, 15], Percoll density gradients [38, 9] and sperm washing by centrifugation [4, 18]. The use of mini-Percoll technique appears as an attractive alternative to minimize the cost and reduce the contact with the density gradient molecules. Thus, the aim of the present study was to compare the efficacy of different sperm selection techniques: (i) Percoll density gradient; (ii) mini-Percoll density gradient; (iii) swim-up; (iv) sperm washing by centrifugation, on the recovery of high-quality frozen-thawed ram spermatozoa for further assisted reproductive biotechnologies.

MATERIALS AND METHODS

All the experiments were carried out at Fluminense Federal University (UFF), Niterói (Brazil, latitude 22°53'S, longitude 43°06'W). The procedures were approved by the local ethic committee.

Reagents

All chemicals were from Sigma Chemical¹. Exceptions were acridine orange and propidium iodide of VitalTest kit obtained from Halotech DNA².

Experimental design

Commercial semen straws (0.25 mL) of the same batch from 10 Santa Inês rams aging 2–5 years old, sexually matured and of proved fertility were used. All straws were maintained frozen in liquid nitrogen until their use. The straws were thawed at 37 °C for 30 s. A pool of five straws of the same ram was thawed and

homogenized in a warmed 1.5 mL microtube³. At post-thawing (PT), a sample of the pool was removed to evaluate rates of sperm concentration and motility. Then, the semen was divided into 0.15 mL aliquots and each one was submitted to either: Percoll density gradient, mini-Percoll density gradient, swim-up or sperm washing by centrifugation. At the same moment, another 0.15 mL aliquot was also transferred to a 300 x *g* centrifugation for 8 min, in a 15 mL conical tube containing 4 mL SP-TALP (supplemented with 3 mg/mL BSA V, 2.2 mg/ mL sodium pyruvate, 50,000UI/ mL penicillin and 50 mg/ mL streptomycin), featuring the control group, free of any sperm selection technique influence. At the end of all treatments, aliquots (post-selection = 0 h) were taken to quantify the rates of sperm recovery, motility, capacitation and plasma membrane (PM) integrity. Afterwards, samples of all treatments were submitted to incubation at 37 °C, for 1 h, 2 h and 3 h and the same parameters mentioned were assessed among the intervals, except the recovery rate.

Traditional Percoll technique

The sperm selection by Percoll technique was established based on the method described by Papadopoulos et al. [26], with slight modifications. A total of 2 mL-gradient (90/45% density) of Percoll solution was prepared in a 15 mL conical centrifuge tube⁴. A 0.15 mL aliquot of semen described above was poured into the Percoll gradient tube and it was subjected to a 700 x *g* centrifugation for 10 min. At the end of this centrifugation, an aliquot was removed to assess the motility and the sample was subjected to another centrifugation at 200 x *g* for 5 min. After the second centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 0.25 mL of SP-TALP.

Mini-Percoll technique

The gradient was formed by pipetting 0.4 mL of 90% Percoll solution into a 2 mL microtube and then overlaying it with 0.4 mL of 45% Percoll solution. A 0.15 mL aliquot of the pool was placed onto the top of the 45% layer and then centrifuged twice by 5000 x *g* for 5 min [16]. At the end of the centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was suspended in 0.4 mL of SP-TALP, and then, the sample was submitted to another centrifugation. After last centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was suspended in 0.25 mL of SP-TALP.

Swim-up

Swim-up procedure was previously described by Morton et al. [23], but some modifications were performed in the present study. A 0.15 mL aliquot of the pool of thawed sperm was carefully placed in the bottom of a 15 mL conical tube containing 1 mL SP-TALP, supplemented with 3 mg/mL BSA V, 2.2 mg/mL sodium pyruvate, 50,000 IU/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin. Sperm cells were allowed to swim-up in a 45° position for 45 min, at 38.5 °C in a humidified 5% CO₂ (in air) atmosphere. After this incubation, the supernatant with the spermatozoa was harvested and the motility was assessed. Then, the spermatozoa were transferred to another tube containing 1 mL SP-TALP and centrifuged at 300 x *g* for 8 min. Finally, the pellet was resuspended in 0.25 mL of SP-TALP.

Sperm washing by centrifugation

This technique was performed following the method described by Mara et al. [18], with some modifications. A 0.15 mL aliquot of the thawed sperm pool was placed in a 15 mL conical tube containing 6 mL of SP-TALP and washed twice by centrifugation at $200 \times g$ for 5 min. Before the second centrifugation, the pellet was suspended with 6 mL of SP-TALP and an aliquot was pipetted to assess the motility. After the last centrifugation, the supernatant was discarded and the spermatozoa pellet was resuspended in 0.25 mL of SP-TALP.

Sperm assays

Sperm recovery rate

This rate was obtained after each treatment by the use of a Neubauer counting chamber after spermatozoa dilution (1:200). The rate was calculated by the formula: $[\text{final concentration} \times \text{final volume}] \times [\text{initial concentration} \times \text{initial volume}] - 1 \times 100$.

Sperm Capacitation

The capacitation status was assessed by chlortetracycline (CTC) test and was based at the technique described by Pérez-Pé et al. [29], with slight modifications. A 0.75 mM CTC solution was daily prepared in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 mM cysteine, pH 7.8. For staining, 0.01 mL of sperm sample were mixed with 0.01 mL of CTC solution onto a glass slide. Finally, a drop of an antifading solution (0.22 M 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane, DABCO, Sigma) was mixed to retard the fading of CTC fluorescence. For the evaluation of CTC patterns, the samples were

observed in a microscope (Nikon Eclipse Ci⁵) under epifluorescence illumination, in 1000x magnification with oil immersion. One hundred spermatozoa per slide were scored [3] and classified into three groups, as described by Cormier et al. [5]: bright fluorescence over the whole head (noncapacitated cells, F pattern); fluorescence-free band in the postacrosomal region (capacitated cells, B pattern); and full fluorescence over the whole head except for a thin, bright band of fluorescence along the equatorial region (acrosome-reacted cells, AR pattern).

Sperm motility

Sperm motility parameters were analyzed by computer-assisted semen analysis (CASA) using the SCA[®] system (Sperm Class Analyzer Microptic⁶), connected to a microscope and the following settings were applied: image collection speed: 25 images per second; magnifying power of microscope: x100; measurements were performed in a 24 x 24 mm coverslide with a 10 μ L sample drop volume. Sperm movement was observed under negative phase contrast optics and videotape recorded in three different fields, at least, or 500 spermatozoa were captured for analyzing. Software settings were adjusted to ram spermatozoa. The main software settings were as follows: the sperm head dimensions detected by the system were between 18 and 60 μ m². Spermatozoa were identified as immotile by curvilinear velocity (VCL) below 10 μ m/s; between 10 and 45 μ m/s were classified as slow; between 45 and 75 μ m/s were classified as medium; and above 75 μ m/s were classified as rapid. The sperm cells presenting straightness (STR) above 80% were featured as progressive. The following motility patterns were analyzed: total motility (%), progressive motility (%), fast progressive (%), fast sperm (%), , average path

velocity (VAP; mm/s), VCL (mm/s), straight line velocity (VSL; mm/s), straightness (STR: VSL/VAP; %), linearity (LIN: VSL/ VCL; %), wobble (WOB: VAP/ VCL; %), lateral head displacement (ALH; mm) and beat cross frequency (BCF; Hz).

PM integrity

This assessment was carried out by VitalTest kit and followed the manufacturer instructions. At least 100 spermatozoa per slide were analyzed. The test was performed by CASA system connected to a microscope under epifluorescence illumination, using 100x magnification. This procedure resulted in selective labelling of either damage or normal cells visualized in red or green colors, respectively.

Statistical analysis

All quantitative variables were subjected to normality (Lilliefors test) and homoscedasticity tests and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with Tukey or Fisher-LSD tests for means comparisons. The non-normal variables were subjected to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using the 9.0 SAEG® program⁷.

RESULTS

Sperm recovery rate was similar ($P > 0.05$) among sperm washing, Percoll and mini-Percoll ($7.4 \pm 2.3\%$; average of these techniques). Swim-up resulted in the lowest ($1.0 \pm 0.3\%$; $P < 0.05$) whilst the control group, in the highest ($31.2 \pm 4.6\%$; $P < 0.05$)

rate. The majority of sperm motility parameters assessed were not affected ($P > 0.05$) by the technique, immediately after the selection (0 h). The only exceptions were VSL, VAP and ALH parameters, as shown in Table 1.

When we compared the intervals of incubation among the treatments on motility parameters, swim-up obtained higher ($P < 0.05$) values at most intervals assessed (Table 2). On the other hand, there was no difference ($P > 0.05$) among the incubation intervals after each selection technique for all parameters studied, exception for BCF.

Overall, when we pool the data regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), there was difference ($P > 0.05$) among the treatments for the majority of the motility parameters assessed. For total motility, swim-up ($32.4 \pm 2.2\%$), mini-Percoll ($28.1 \pm 2.9\%$), Percoll ($28.0 \pm 2.2\%$) and control group ($28.0 \pm 3.0\%$) did not differ ($P > 0.05$), but swim-up was higher ($P < 0.05$) than sperm washing ($24.6 \pm 2.1\%$). For progressive sperm, swim-up ($9.3 \pm 1.6\%$), mini-Percoll ($6.0 \pm 1.9\%$) and Percoll ($4.5 \pm 1.2\%$) were not different ($P > 0.05$) among each other, but swim-up was higher ($P < 0.05$) than sperm washing ($3.6 \pm 1.1\%$) and control group ($3.9 \pm 1.3\%$). Swim-up presented the highest value for fast sperm ($7.2 \pm 1.4\%$; $P < 0.05$), but it did not differ ($P > 0.05$) to mini-Percoll ($4.6 \pm 1.5\%$).

Mini-Percoll and Percoll were similar ($P > 0.05$), regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), for all velocities studied (VCL: 40.1 ± 4.6 vs. 39.1 ± 5.1 ; VSL: 20.1 ± 3.8 vs. 21.4 ± 4.1 ; and VAP: 26.3 ± 4.1 vs. $26.8 \pm 4.4 \mu\text{m/s}$). For VAP and VSL, swim-up presented higher values ($P < 0.05$; 33.9 ± 4.9 vs. $29.4 \pm 4.7 \mu\text{m/s}$) than the other treatments, but was similar ($P > 0.05$) to mini-Percoll, Percoll and control group for VCL (swim-up: 44.0 ± 5.2 ; mini-Percoll: 40.1 ± 4.6 ; Percoll: 39.1 ± 5.1 ; control

group: $40.8 \pm 4.4 \mu\text{m/s}$). Control group presented the highest value for ALH ($1.8 \pm 0.1\mu\text{m}$) and it was not different from swim-up ($1.7 \pm 0.1\mu\text{m}$), that was similar ($P > 0.05$) to Percoll and mini-Percoll. For BCF, swim-up value was higher ($P < 0.05$; $6.6 \pm 0.4 \text{ Hz}$) than the others. LIN and WOB values for swim-up technique were higher ($P < 0.05$; 52.9 ± 4.6 vs. $64.9 \pm 4.0\%$) than the other treatments. There was no difference ($P > 0.05$) between Percoll (39.2 ± 4.1 vs. $54.5 \pm 3.8\%$) and mini-Percoll (38.0 ± 4.2 vs. $54.4 \pm 3.7\%$) for these parameters, and values were higher ($P < 0.05$) than sperm washing (31.4 ± 4.2 vs. $47.0 \pm 3.9\%$) and control group (29.0 ± 3.2 vs. $47.8 \pm 2.9\%$), that were similar ($P > 0.05$) between each other.

Regarding to capacitation status immediately after the selection (0 h), control group and sperm washing by centrifugation obtained more ($P < 0.05$) capacitated cells, and swim-up and mini-Percoll recovered less ($P < 0.05$) cells. Control group and sperm washing recovered the lowest ($P < 0.05$) percentages of acrosome-reacted cells, whereas swim-up obtained the highest ($P < 0.05$). When we studied the PM integrity at 0 h, intact cell rate was higher ($P < 0.05$) after swim-up technique ($P < 0.05$). There was no difference ($P > 0.05$) among the other treatments for PM integrity (Figure 1).

Overall, when we pool the data regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), there was no difference ($P > 0.05$) for sperm washing, Percoll, mini-Percoll and swim-up, respectively, for: capacitated (41.8 ± 2.0 , 35.6 ± 2.3 , 33.9 ± 2.1 and $30.3 \pm 2.4\%$) and noncapacitated (5.3 ± 1.0 , 4.6 ± 0.8 , 5.5 ± 1.1 and $4.9 \pm 0.8\%$). When the sperm selections were compared with the control group, the last was higher ($P < 0.05$; $46.8 \pm 2.3\%$), than all treatments for capacitated. Regarding to acrosome-reacted rate, Percoll, mini-Percoll and swim-up had highest rates ($P < 0.05$; 59.8 ± 2.4 , 60.6 ± 2.3 and $57.5 \pm 2.6\%$, respectively), but swim-up was no different ($P > 0.05$) of

sperm washing ($53.6 \pm 2.4 \%$). Control group rate was lower ($P < 0.05$; $48.6 \pm 2.6 \%$) than all treatments and was similar ($P > 0.05$) to sperm washing.

Regarding to PM integrity, when we compared the intervals of incubation among the treatments, swim-up obtained higher ($P < 0.05$) rates of intact cells at 2 h of incubation (control group: 4.5 ± 0.7 ; sperm washing: 4.2 ± 0.5 ; Percoll: 5.0 ± 1.7 ; mini-Percoll: 7.4 ± 2.2 ; swim-up: $13.3 \pm 3.7\%$). On the other hand, there was no difference ($P > 0.05$) among the incubation intervals after each selection technique.

When we pool the data regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), the intact cell rate was higher ($P < 0.05$) at swim-up ($17.4 \pm 2.8\%$). No differences ($P > 0.05$) were found among all the other treatments for either intact (Control: 8.0 ± 1.7 ; sperm washing: 7.1 ± 1.0 ; Percoll: 9.4 ± 1.8 ; and mini-Percoll: $7.3 \pm 1.1\%$) or damaged (Control: 91.9 ± 1.7 ; sperm washing: 92.8 ± 1.0 ; Percoll: 90.6 ± 1.8 ; and mini-Percoll: $92.7 \pm 1.1\%$) cells.

DISCUSSION

Different sperm selection techniques have been developed to obtain a procedure efficient to produce a final sample with great sperm parameters so fertilization may occur successfully. The sperm physiology and biochemistry are complex and a lot of studies are designed to evaluate the sperm cell and its preparation for receiving the oocyte under optimal conditions. Although the swim-up technique promoted higher rates for some of the sperm parameters evaluated, Percoll protocols are the most widely used procedures for selection during the sperm preparation for *in vitro* fertilization (IVF) in many species, possibly because of its greater speed, practical method and convenience compared to the swim-up technique.

Lower recovery rate was obtained after swim-up, which is relatively low and corroborate with several other studies comparing different sperm selection techniques on bovine, ovine and caprine [27, 30, 37, 36, 24]. In this study, Percoll and mini-Percoll recovered approximately 10 times more cells than swim-up, which is an important feature to be considered during sperm preparation for IVF, being possible to use only one semen straw. The swim-up technique is based on the ability of mobile sperm migrate to the upper levels of the culture media, in a determinate interval [12]. On the other hand, the swim-down techniques, such as washing by centrifugation and density gradient methods, are based on the recovery of sperm by forced migration to the bottom of the tube, which is assigned to the gravitational force during centrifugation [36], which explains the difference between recovery rates among the sperm selection techniques obtained in this study.

Capacitated cells and acrosome-reacted rates were higher after each selection technique, when compared to the control group. These observations corroborate with Martí et al. [19] who reported that sperm selected by Percoll demonstrated greater hyperactivation ability and thus, greater ability to undergo capacitation, when compared to nonselected cells. The processing of the selection techniques is more time consuming and involves more than one centrifugation. The centrifugation processes generate mechanical stress, favoring damage to sperm cells and their PM during the selection techniques [7]. This fact probably holds up the destabilization of sperm PM, facilitating the occurrence of capacitation events and acrosome reaction. Furthermore, it is known that oxidative stress caused by the presence of reactive oxygen species (ROS) increased during centrifugations [1]. The presence of ROS induce lipid peroxidation causing considerable PM damage [22]. Beyond the stress of the centrifugation, extended incubation intervals, as in swim-up procedure, generate

further oxidative stress [6]. Lastly, the incubation interval of the technique tends to make the incubated spermatozoa more sensitive to damage caused by the centrifugation [37], which explains the PM greater sensitivity of the selected sperm and occurrence of capacitation and acrosome reaction.

García-Álvarez et al. [9] observed that both capacitation or noncapacitation media in PT moment and after incubation showed high rates of PM fluidity in ram frozen-thawed sperm. In this same study, cells subjected to noncapacitation media underwent premature acrosome reaction. The authors attributed these facts to the cryopreservation process and described that after this process, the sperm present defects in calcium regulation, being more susceptible to PM destabilization and capacitation. Similarly, the high capacitated and acrosome reaction rates observed after treatments in the current study are probably reinforced by changes in sperm cells caused by the cryopreservation process.

A low percentage of noncapacitated cells was observed at 0 h in the present study. When incubated, these cells seem to start the capacitation process immediately, and after 1 h this rate decreased drastically. The continuing decreased of this pattern can be explained due to the capacitation event and consequent acrosome reaction, which makes the rate of noncapacitated to greatly reduce after 3 h of incubation and the capacitated and acrosome-reacted rates high. A similar study, after selection of frozen-thawed sperm by Percoll, Gillan et al. [10] found approximately 8% of noncapacitated cells. In addition, after 6 h incubation, noncapacitated cells were not found, and they found approximately 38% of capacitated cells and 68% of acrosome-reacted cells.

In order to strength the evidence that frozen-thawed sperm, even after selection, is sensible and reactive to capacitation-like events, we demonstrated the capacitated and acrosome-reacted cell values immediately after the selection treatments behaved differently than when authors used ram fresh sperm [19]. The authors observed low capacitated and acrosome-reacted rates after swim-up ($12.5 \pm 4.2\%$ and $15.2 \pm 3.3\%$). This difference can be due to cryocapacitation event that frozen sperm suffers, and thus is not observed in fresh semen [14]. Possibly, this capacitation-like changes observed in frozen-thawed sperm occurs regardless of the selection treatment used.

The capacitated rate remained constant up to 2 h and declined after 3 h, which coincided with the increase of the acrosome-reacted rate. This behavior may suggest that the capacitation event in ram is time dependent and lasts around 2 h [2], once the sperm remained capacitated to 2 h, initiating the process of acrosome reaction. These results corroborate with Pérez et al. [28]. The authors demonstrated, also using CTC fluorescence, that the ram frozen-thawed sperm underwent capacitation (90%) faster than fresh sperm after 2 h of incubation.

Analyzing the motility parameters immediately after the selection, all treatments maintained or increased the rates compared to the control group. The swim-up, mini-Percoll and Percoll did not differ in any parameters. These results are important since the processing of selection techniques did not infer damages to spermatozoa. The sperm recovered by swim-up are considered excellent about biochemical, kinematics, motility and morphological patterns [12, 35]. Given that Percoll and mini-Percoll did not show differences in relation to swim-up for motility parameters, such techniques can be used to replace the latter, obtaining similar sperm samples with good quality.

Regarding ALH immediately after selection, swim-up and sperm washing by centrifugation obtained samples with low rates. Holt and Palomo [13] observed this same behavior after ram sperm selection by swim-up. The authors suggest that this is due to a cleaner culture media promoted by the technique, free of debris and cytoplasmic droplets, improving route and sperm quality. This result is positive since high ALH values are associated with low quality sperm that moves in aleatory tracks with low linearity and progressivity, which is unwanted [13].

The VSL parameter was the only velocity that got improvement in relation to control group, and just after swim-up. Holt and Palomo [13] affirmed VSL is the parameter that most strongly characterizes the quality of ram selected sperm. However, immediately after treatments and regardless of the incubation interval, the selected sperm by swim-up, showed higher values for VSL and also for VAP, corroborating with other studies [13, 7]. In ovine, there are still some discrepancies in relation to the motility parameters that can be well correlated with fertility. Robayo et al. [31] reported VAP was positively correlated with sperm migration in the cervical mucus, and thus, a parameter more strongly correlated with fertility.

Swim-up technique, after incubation, also showed better results for several sperm parameters, including LIN, enhancing that the incubated cells recovered by this technique presents better quality [12]. According to García-Álvarez et al. [8], high values of LIN indicate sperm motility patterns sperm related with most progressive sperm and acquisition of fertilizing ability.

When assessing the motility parameters after treatment and incubation, swim-up showed superiority in relation to total progressive and fast cell percentages. These results are consistent with other studies that also found superiority in various motility

parameters after swim-up [13, 20]. The fact the swim-up technique select more mobile cells which feature progressive movement and ability to reach the top of the media [27], explains the greater amount of such subpopulations in the final sample.

Regarding to PM integrity of selected and incubated sperm, the only treatment that was superior to the control and the others was swim-up, corroborating with other studies in buffalos [20], bucks [25] and bulls [27]. Swim-up involves a procedure that recovers a clean fraction without debris and other types of cells, with high rate of mobile sperm with excellent quality [35], reason why it can justify the higher recovery of intact spermatozoa after the technique.

CONCLUSIONS

Spermatozoa selected by swim-up presents higher sperm parameters values throughout the incubation intervals, indicating a more long-lived sample and an advantage for IVF. However, Percoll protocols recover 10 times more cells than the swim-up, suggesting these protocols represent a great economical advantage for ram frozen–thawed sperm selection. Moreover, Percoll and mini-Percoll techniques did not show sperm injuries in comparison with the control group, thus, not affecting sperm cells along time.

MANUFACTURERS

¹Sigma Chemical. St. Louis, USA.

²Halotech DNA. Madrid, Spain.

³Eppendorf Brasil. São Paulo, Brazil.

⁴Corning Incorporated. São Paulo, Brazil.

⁵Nikon Corporation. Tokyo, Japan.

⁶Automatic Diagnostic Systems. Barcelona, Spain.

⁷Viçosa Federal University. Viçosa, Brazil.

Acknowledgments. This research was supported by Finep and Faperj. JFF, FZB and CCSO were supported by CNPq and JMGSF, by CAPES.

Funding. The research reported was funded by different Brazilian Institutes that were all cited in the Acknowledgments: Finep and Faperj (E-26/111.694/2013).

Ethical approval. All procedures and treatments care were in compliance with Ethics Committee in the use of animals of Fluminense Federal University (protocol approval: 374/13).

Declaration of interest. This manuscript has never been published. The authors are in agreement with statements and requirements for publication. None of the authors have any conflict of interest to declare.

TABLES

Table 1. Sperm motility values immediately after spermatozoa selection by different techniques (0 h) in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM).

Within a column, values without a common superscript (^{a,b}) differ significantly by Tukey test ($P < 0.05$); $n = 10$; VCL: curvilinear velocity;

Treatment/ Parameter	Total motility (%)	Progressive sperm (%)	Fast sperm (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	WOB (%)
Control	61.3 $\pm$ 5.4 ^a	8.1 $\pm$ 1.3 ^a	4.4 $\pm$ 0.9 ^a	54.8 $\pm$ 9.5 ^a	29.7 $\pm$ 7.2 ^b	38.5 $\pm$ 8.1 ^{a,b}	2.5 $\pm$ 0.1 ^a	7.6 $\pm$ 0.3 ^a	47.8 $\pm$ 5.1 ^a	65.3 $\pm$ 4.1 ^a
Sperm washing	44.2 $\pm$ 5.2 ^a	2.8 $\pm$ 1.1 ^a	1.5 $\pm$ 1.4 ^a	49.7 $\pm$ 9.9 ^a	30.4 $\pm$ 7.9 ^b	36.4 $\pm$ 8.5 ^b	1.9 $\pm$ 0.1 ^b	8.0 $\pm$ 0.5 ^a	52.4 $\pm$ 7.7 ^a	66.0 $\pm$ 6.2 ^a
Percoll	36.4 $\pm$ 5.4 ^a	6.5 $\pm$ 1.4 ^a	3.7 $\pm$ 1.0 ^a	55.2 $\pm$ 10.3 ^a	35.4 $\pm$ 8.9 ^{a,b}	41.8 $\pm$ 9.3 ^{a,b}	2.2 $\pm$ 0.1 ^{a,b}	8.0 $\pm$ 0.4 ^a	55.5 $\pm$ 6.3 ^a	69.6 $\pm$ 4.7 ^a
Mini-Percoll	35.4 $\pm$ 4.6 ^a	4.4 $\pm$ 1.3 ^a	2.5 $\pm$ 0.8 ^a	57.6 $\pm$ 10.5 ^a	37.5 $\pm$ 9.5 ^{a,b}	44.5 $\pm$ 9.9 ^{a,b}	2.4 $\pm$ 0.1 ^a	7.6 $\pm$ 0.2 ^a	55.0 $\pm$ 7.1 ^a	69.6 $\pm$ 5.5 ^a
Swim-up	55.4 $\pm$ 3.8 ^a	13.1 $\pm$ 1.5 ^a	11.5 $\pm$ 1.1 ^a	57.4 $\pm$ 11.7 ^a	41.8 $\pm$ 11.1 ^a	46.9 $\pm$ 11.2 ^a	1.8 $\pm$ 0.2 ^b	7.8 $\pm$ 0.5 ^a	61.6 $\pm$ 9.4 ^a	72.5 $\pm$ 7.7 ^a
Mean	46.6 $\pm$ 3.6	7.0 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 1.3	54.9 $\pm$ 10.2	33.1 $\pm$ 8.3	40.1 $\pm$ 8.9	2.5 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.7	53.1 $\pm$ 6.3	67.7 $\pm$ 5.0

VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; LIN: linearity;

WOB: wobble.

Table 2. Sperm motility values after incubation intervals of selection treatments in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM).

Treatment/ Parameter		Total motility (%)	Progressive sperm (%)	Fast sperm (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	WOB (%)
Control	1 h	20.9 $\pm$ 1.7 ^a	0.6 $\pm$ 0.2 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	36.5 $\pm$ 4.2 ^a	9.6 $\pm$ 1.7 ^b	16.5 $\pm$ 2.1 ^b	1.7 $\pm$ 0.3 ^a	3.1 $\pm$ 0.6 ^b	21.8 $\pm$ 2.8 ^b	39.3 $\pm$ 3.0 ^b
	2 h	18.9 $\pm$ 1.5 ^a	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	38.2 $\pm$ 3.4 ^a	12.0 $\pm$ 5.5 ^b	19.4 $\pm$ 6.2 ^b	1.6 $\pm$ 0.3 ^a	4.0 $\pm$ 1.0 ^a	25.0 $\pm$ 3.9 ^b	44.8 $\pm$ 3.2 ^b
	3 h	19.1 $\pm$ 1.2 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.1 ^a	33.5 $\pm$ 3.4 ^a	8.9 $\pm$ 3.4 ^a	16.0 $\pm$ 4.5 ^a	1.5 $\pm$ 0.2 ^a	3.6 $\pm$ 0.8 ^a	21.3 $\pm$ 5.2 ^b	41.3 $\pm$ 5.4 ^a
Sperm washing	1 h	20.6 $\pm$ 2.1 ^a	2.0 $\pm$ 0.7 ^a	1.7 $\pm$ 0.6 ^a	32.7 $\pm$ 6.0 ^a	11.6 $\pm$ 3.8 ^b	17.2 $\pm$ 4.3 ^b	1.0 $\pm$ 0.3 ^a	2.8 $\pm$ 1.0 ^b	21.9 $\pm$ 5.5 ^b	38.8 $\pm$ 5.7 ^b
	2 h	18.6 $\pm$ 2.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.2 ^a	0.5 $\pm$ 0.2 ^a	26.0 $\pm$ 5.7 ^a	10.6 $\pm$ 5.0 ^b	14.8 $\pm$ 5.9 ^b	1.2 $\pm$ 0.4 ^a	4.8 $\pm$ 1.4 ^a	27.9 $\pm$ 4.2 ^b	42.5 $\pm$ 4.1 ^b
	3 h	19.6 $\pm$ 2.1 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	26.7 $\pm$ 4.5 ^a	8.5 $\pm$ 3.7 ^a	13.7 $\pm$ 4.3 ^a	0.9 $\pm$ 0.2 ^a	2.9 $\pm$ 0.9 ^a	23.4 $\pm$ 7.3 ^b	40.7 $\pm$ 7.4 ^a
Percoll	1 h	24.1 $\pm$ 2.7 ^a	1.8 $\pm$ 0.7 ^a	1.0 $\pm$ 0.3 ^a	35.6 $\pm$ 6.1 ^a	16.8 $\pm$ 4.1 ^b	22.3 $\pm$ 4.4 ^b	1.5 $\pm$ 0.4 ^a	4.8 $\pm$ 1.1 ^{a,b}	31.4 $\pm$ 5.9 ^b	48.0 $\pm$ 5.7 ^b
	2 h	22.3 $\pm$ 2.1 ^a	1.6 $\pm$ 0.6 ^a	0.9 $\pm$ 0.3 ^a	36.2 $\pm$ 5.8 ^a	18.8 $\pm$ 8.4 ^{a,b}	23.9 $\pm$ 9.0 ^{a,b}	1.2 $\pm$ 0.3 ^a	4.9 $\pm$ 1.2 ^a	34.1 $\pm$ 6.8 ^b	48.7 $\pm$ 6.2 ^b
	3 h	21.2 $\pm$ 2.1 ^a	1.3 $\pm$ 0.5 ^a	0.6 $\pm$ 0.2 ^a	29.3 $\pm$ 5.5 ^a	14.6 $\pm$ 6.2 ^a	19.2 $\pm$ 6.8 ^a	1.1 $\pm$ 0.3 ^a	4.1 $\pm$ 1.0 ^a	35.9 $\pm$ 8.6 ^{a,b}	51.7 $\pm$ 8.2 ^a
Mini- Percoll	1 h	18.7 $\pm$ 1.2 ^a	1.1 $\pm$ 0.2 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	31.5 $\pm$ 4.8 ^a	11.3 $\pm$ 3.1 ^b	17.2 $\pm$ 3.2 ^b	0.9 $\pm$ 0.2 ^a	3.5 $\pm$ 1.0 ^b	28.2 $\pm$ 6.8 ^b	44.8 $\pm$ 6.4 ^b
	2 h	20.9 $\pm$ 1.5 ^a	2.0 $\pm$ 0.6 ^a	1.2 $\pm$ 0.3 ^a	36.6 $\pm$ 5.2 ^a	17.9 $\pm$ 7.1 ^{a,b}	23.9 $\pm$ 7.8 ^{a,b}	1.3 $\pm$ 0.2 ^a	5.1 $\pm$ 1.1 ^a	35.8 $\pm$ 6.1 ^b	52.7 $\pm$ 4.9 ^b
	3 h	18.8 $\pm$ 1.4 ^a	1.0 $\pm$ 0.2 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	33.3 $\pm$ 3.9 ^a	12.4 $\pm$ 4.7 ^a	18.4 $\pm$ 5.1 ^a	1.2 $\pm$ 0.3 ^a	3.4 $\pm$ 0.9 ^a	31.6 $\pm$ 7.6 ^{a,b}	49.0 $\pm$ 7.0 ^a
	1 h	27.5 $\pm$ 2.7 ^b	7.1 $\pm$ 2.0 ^b	5.7 $\pm$ 1.8 ^b	43.1 $\pm$ 6.0 ^a	30.8 $\pm$ 4.5 ^a	32.7 $\pm$ 4.4 ^a	2.0 $\pm$ 0.3 ^a	7.0 $\pm$ 0.7 ^a	56.1 $\pm$ 5.5 ^a	66.5 $\pm$ 4.7 ^a

Swim-up	2 h	26.9 ± 2.9 ^b	6.3 ± 2.2 ^b	4.7 ± 1.7 ^b	41.0 ± 5.8 ^a	28.1 ± 8.8 ^a	32.2 ± 9.4 ^a	1.7 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.6 ^a	56.8 ± 3.8 ^a	66.9 ± 3.6 ^a
	3 h	25.2 ± 2.0 ^b	3.5 ± 0.7 ^b	1.7 ± 0.4 ^b	33.8 ± 4.9 ^a	19.0 ± 6.5 ^a	23.5 ± 7.1 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	5.8 ± 0.8 ^a	43.8 ± 9.0 ^a	57.3 ± 8.6 ^a
Mean		21.6 ± 2.1	2.1 ± 1.0	1.4 ± 0.8	34.7 ± 8.7	15.0 ± 6.5	20.7 ± 7.1	1.2 ± 0.3	3.6 ± 1.0	34.1 ± 8.3	50.4 ± 7.6

Within a column, values without a common superscript (^{a,b}) in the same incubation interval among the treatments, differ significantly by Tukey test ($P > 0.05$); n=10; VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; LIN: linearity; WOB: wobble.

FIGURE AND LEGEND

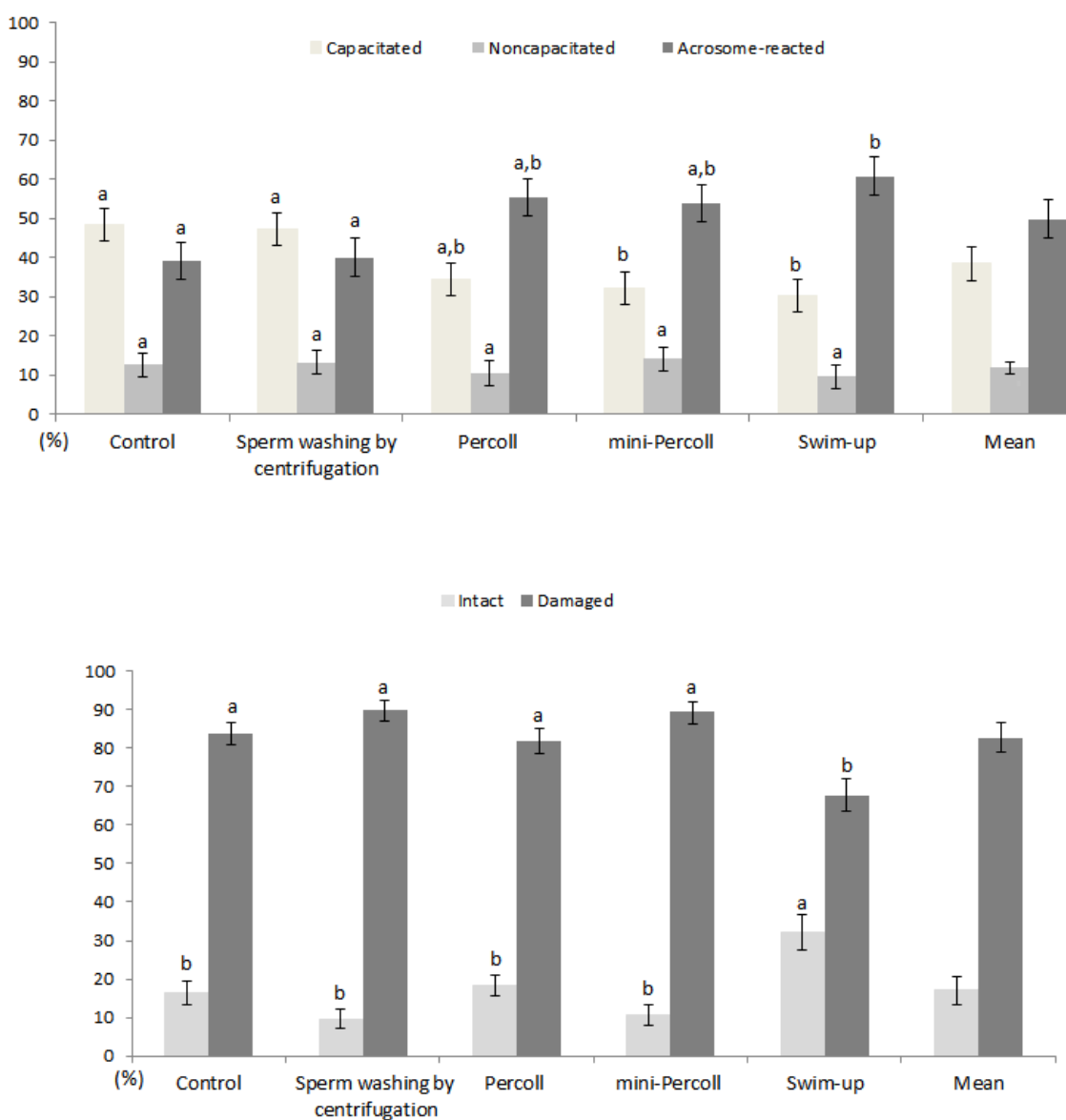


Figure 1. Capacitation status and plasma membrane (PM) integrity immediately after spermatozoa selection by different treatments in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (Mean ± SEM). Within a column, values without a common superscript (^{a,b}) differ significantly ($P < 0.05$); $n=10$.

REFERENCES

- 1 Aitken R.J. & Clarson J.S. 1988.** Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*. 9: 367-376.
- 2 Austin C.R. 1970.** Ageing and reproduction: post-ovulatory deterioration of the egg. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl)*. 12: 39–53.
- 3 Chamberland A., Fournier I.V., Tardff S., Sirard I.M.A., Sulhvan I.R. & Badey J.L. 2001.** The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*. 55: 823-835.
- 4 Cocero M.J., Alabart J.L., Hammami S., Martí J.I., Lahoz B., Sánchez P., Echegoyen E., Beckers J.F. & Folch J. 2011.** The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*. 46: 463–470.
- 5 Cormier N., Sirard M.A. & Bailey J.L. 1997.** Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *Journal of Andrology*. 18: 461-468.
- 6 Correa J.R. & Zavos P.M. 1996.** Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*. 46: 1225-1232.
- 7 García-Álvarez O., 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.

8 García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Ramón M., Del Olmo E., Jiménez-Rabadán P., Fernández-Santos M.R., Anel-López L., Garde J.J. & Soler A.J. 2014. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*. 26: 725-732.

9 García-Álvarez O., Maroto-Morales A., Jiménez-Rabadán P., Ramón M., Del Olmo E., Iniesta-Cuerda M., Anel-López L., Fernández-Santos M.R., Garde J.J. & Soler A.J. 2015. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*. 84: 948–955.

10 Gillan L., Evans A.G. & Maxwell W.M.C. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 9: 481–487.

11 Henkel R.R. 2012. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian Journal of Andrology*. 14: 260–269.

12 Henkel R.R. & Schill W.B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 108-129.

- 13 Holt W.V. & Palomo M.J. 1996.** Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reproduction, Fertility and Development*. 8: 219-230.
- 14 Kadirvel G., Kumar S., Kumaresan A. & Kathiravan P. 2009.** Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal Reproduction Science*. 116: 244–253.
- 15 Luna C., Colás C., Casao A., Serrano E., Domingo J., Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J.A. & Muiño-Blanco T. 2015.** Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. *Theriogenology*. 83: 670–678.
- 16 Machado G.M., Carvalho J.O., Filho E.S., 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.
- 17 Maia M.S., Bicudo S.D., Azevedo H.C., Sicherle C.C., De Sousa D.B. & Rodello L. 2009.** Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*. 85: 85–90.
- 18 Mara L., Sanna D., Casu S., Dattena M. & Muñoz I.M.M. 2013.** Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season. *Zygote*. 22: 366–371.
- 19 Martí E., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T. & Cebrián-Pérez J.A. 2006.** Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 27:746–753.
- 20 Mehmood A., Anwar M. & Naqvi S.M.S. 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.

21 Morrell J.M. & Rodríguez-Martínez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Andrology Journal*. 1: 1–9.

22 Mortimer D. 1991. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of *in vitro* fertilization. *Human Reproduction*. 6: 173-176.

23 Morton K., Maxwell W. & Evans G. 2008. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 106-110.

24 Olivares C.C.S., Fonseca J.F., Camargo L.S.A., Souza-Fabjan J.M.G., Rodrigues A.L.R. & Brandão F.Z. 2015. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Ruminant Research*. 127: 44-49.

25. Palomo M.J., Izquierdo D., Mogas T. & Paramio M.T. 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 51: 927–940.

26 Papadopoulos S., Hanrahan J.P., Donovan A., Duffy P., Boland M.P. & Lonergan P. 2005. *In vitro* fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology*. 63: 150–159.

27 Parrish J.J., Krogenaes A. & Susko-parrish J.L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 44: 859-869.

28 Pérez L.J., Valcarcel A., Heras M.A., Moses D. & Baldasarre H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by Chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46: 131-140.

29 Pérez-Pé R., Grasa P., Fernández-Juan M., Peleato M.L., Cebrián-Pérez J.A. & Muiño-Blanco T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 226–233.

30 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.

31 Robayo I., Montenegro V., Valdés C. & Cox J. 2008. CASA Assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 393–399.

32 Rodríguez-Martínez H. 2006. Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 2–10.

33 Said T., Agarwal A., Grunewald S., Rasch M., Baumann T., Kriegel C., Li L., Glander H., Thomas A.J. & Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: An *in vitro* model. *Biology of Reproduction*. 74: 530–537.

34 Shirazi A. & Motaghi E. 2013. The *in vitro* fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction and Infertility*. 14: 8–16.

- 35 Shojaei H., Kroetsch T., Wilde R., Blondin P., Kastelic J.P. & Thundathil J.C. 2012.** Moribund sperm in frozen–thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*. 77: 940–951.
- 36 Shokrollahi E., Barati F. & Gooraninejad S. 2014.** Efficacy of Histoprep ® gradient for isolating ovine epididymal sperm. *Small Ruminant Research*. 119: 96–99.
- 37 Somfai T. 2002.** Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 37: 285-290.
- 38 Wang Z., Lin P. & Yu S. 2013.** Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized ovine embryos. *Theriogenology*. 79: 695–701.
- 39 Zúccari C.E.S.N., Carrijo P.R., Leite P.A., Scaldelai P.R.R., Rodovalho N.C.M., Zanenga C.A., Kiefer C. & Silva E.V.C. 2008.** Seleção em gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 9: 358-366.

8. CAPÍTULO 3

Mini-percoll gradient may be used for frozen–thawed sperm selection in sheep

Técnica de mini-Percoll pode ser apresentada como alternativa para a seleção espermática de sêmen congelado/descongelado de carneiros

Artigo submetido ao periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Em: Março de 2017

Qualis: A2 – Medicina Veterinária

Mini-percoll gradient may be used for frozen–thawed sperm selection in sheep

(Gradiente de mini-Percoll pode ser utilizado na seleção espermática de sêmen congelado de ovinos)

Carolina Cerqueira Sarmiento Olivares^a, Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan^b, Jeferson Ferreira da Fonseca^c, Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva^a, Luana Rangel Côrtes^a, Vivian Angélico Pereira Alfradique^a, Mario Felipe Alvarez Balaro^a, Rodrigo Vasconcelos de Oliveira^d, Felipe Zandonadi Brandão^a

^a Faculty of Veterinary Medicine, Fluminense Federal University, Av. Vital Brasil Filho, 64, CEP 24230-340 Niterói, RJ, Brazil

^b Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, 25071-202, Duque de Caxias, RJ, Brazil

^c Embrapa Goats and Sheep, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, CP 145, 62010-970 Sobral, CE, Brazil

^d Department of Animal Production, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 07, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito do aumento da força de centrifugação, bem como a redução do tempo de centrifugação e o volume do gradiente de Percoll em diferentes protocolos nos parâmetros espermáticos de ovinos. Foi utilizado sêmen comercial de carneiros da raça Santa Inês e cinco tratamentos foram realizados: Percoll tradicional e quatro técnicas de mini-Percoll (I- 5000 x *g*, 5 min; II- 2500 x *g*, 5 min; III- 1250 x *g*, 5 min; IV- 700 x *g*, 10 min). Após o descongelamento e após a seleção espermática em cada técnica utilizada (0h), amostras foram avaliadas quanto a taxa de recuperação espermática, motilidade, integridade de membrana plasmática, capacitação e morfologia.

Ao final, foram incubados a 37 °C por 1, 2 e 3 h. A taxa de recuperação média ($9,1 \pm 1,4\%$) e a maioria dos parâmetros de motilidade foram similares ($P > 0,05$) entre os tratamentos. VCL foi maior ($P < 0,05$) após MP-II, III e IV ($66,1 \pm 4,5$) quando comparados ao Percoll tradicional ($46,3 \pm 4,9$). O status da capacitação e a integridade de membrana foram similares ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Pela primeira vez, foi demonstrado que a redução do volume do gradiente utilizado e do tempo de centrifugação associados com o aumento da força de centrifugação no protocolos de Percoll podem ser usados com sucesso na seleção espermática de sêmen congelado de ovinos. O mini-Percoll pode ser utilizado em alternativa a técnica de Percoll tradicional, diminuindo custos e tempo de manipulação do sêmen durante a técnica.

Palavras-chave: CASA; capacitação espermática; sêmen congelado; ovino; protocolos de Percoll.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of increasing centrifugal force and reducing centrifugation time and volume in Percoll protocols on ram sperm parameters. Commercial semen of Santa Inês rams were used and five treatments were performed: traditional Percoll and mini-Percoll (MP) techniques (I- 5000 x *g*, 5 min; II- 2500 x *g*, 5 min; III- 1250 x *g*, 5 min; IV- 700 x *g*, 10 min). At post-thawing (PT) and post-selection protocols (0 h), samples were assessed for spermatozoa recovery rate, motility, plasma membrane (PM) integrity, sperm capacitation and morphology and incubated at 37 °C for 1, 2 and 3 h. The sperm recovery rate averaged $9.1 \pm 1.4\%$, and most motility parameters were similar ($P > 0.05$) among protocols. VCL ($\mu\text{m/s}$) was higher ($P < 0.05$) after MP-II, III and IV (66.1 ± 4.5) than traditional Percoll (46.3 ± 4.9). Capacitation status and PM integrity were similar ($P > 0.05$) among treatments. For the first time, we have demonstrated the reduction of the gradient volume and centrifugation time associated with an increase on centrifugation force at Percoll can be successfully used for frozen-thawed ram sperm selection. MP may be used instead of traditional Percoll, decreasing costs and semen handling time.

Keywords: CASA; sperm capacitation; frozen-thawed sperm; ovine; Percoll protocols.

1. Introduction

The success of *in vitro* fertilization (IVF) and subsequent development during *in vitro* production of embryos (IVP) are directly related to oocyte quality and maturation, the selection of good quality spermatozoa. With the advent of biotechnology applied to assisted reproduction, there was a need to develop strategies for rigorous sperm preparation since, in most cases, cryopreserved cells are required (Souza-Fabjan *et al.*, 2014).

In order to achieve a sperm preparation based on natural principles, sperm selection events are mimicked to the success of IVP. Therefore, it is very important to develop high-quality procedures, providing a normal and healthy selection. The sperm selection methods used in sheep are: swim-up (Shirazi and Motaghi, 2013; Luna *et al.*, 2015), Percoll density gradients (Wang *et al.*, 2013; García-Álvarez *et al.*, 2015) and sperm washing by centrifugation (Cocero *et al.*, 2011; Mara *et al.*, 2013).

Studies commonly describe a 2 mL-Percoll gradient centrifugation technique, prepared at 700 x *g* for a period of 10-20 minutes (Machado *et al.*, 2009; García-Álvarez *et al.*, 2015). However, the search for a maximum recovery of good quality sperm, led to several changes over the years in this technique. Possibly, the main change was a decrease in the volume of the density gradient, using a higher centrifugation force and shorter time of procedure, characterizing the mini-Percoll (MP) protocols. In cattle (Machado *et al.*, 2009) and goat (Olivares *et al.*, 2015) species, it was demonstrated that the mini-Percoll technique could be applied for sperm selection. Machado *et al.* (2009) reported that decreasing Percoll volume, reducing the duration of centrifugation, and using a higher centrifugation force had no adversely effect on bovine sperm quality and embryo development. Moreover, the authors obtained higher cleavage and blastocysts rates for mini-Percoll when compared to traditional Percoll.

The use of MP technique appears as an attractive alternative to minimize the cost, reduce the contact with the density gradient molecules that cause toxicity in humans (Strehler *et al.*, 1998) and, thus, to decrease sample processing time during IVP (Machado *et al.*, 2009). However, the number of studies about the effect of MP techniques in small ruminants (Pegoraro *et al.*, 2013; Olivares *et al.*, 2015) is still very limited in

comparison with bovine. As such, the aims of this study were to compare the effectiveness and influence of four different MP techniques with the traditional Percoll in several parameters of Santa Inês ram frozen-thawed sperm.

2. Materials and methods

The procedures were approved by the local ethic committee (protocol approval: 374/13). All chemicals used were from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Exceptions were acridine orange and propidium iodide obtained from Halotech DNA (Madrid, Spain).

Commercial frozen semen straws (0.25 mL; initial concentration: $226.7 \pm 15.9 \times 10^6$ spz/ mL) of the same batch from 10 Santa Inês rams aging 2–5 years old, sexually matured and of proved fertility were used. The straws were thawed at 37 °C for 30 s. A pool of five straws of the same ram was thawed and homogenized in a warmed 1.5 mL microtube (Eppendorf Brasil, São Paulo, Brazil). At post-thawing (PT), we evaluated sperm concentration, motility, plasma membrane (PM) integrity and morphology. The semen was divided and submitted to either: traditional Percoll or four different MP techniques for sperm selection. Similarly, at the end of all treatments (post-selection protocols = 0 h) sperm recovery, motility, PM integrity, sperm capacitation and morphology were accessed. Afterwards, samples of all treatments were submitted to incubation at 37 °C, for 1 h, 2 h and 3 h and the same parameters mentioned were assessed among the intervals, except the recovery rate.

The sperm selection by Percoll technique was established based on the method by Papadopoulos *et al.* (2005), with slight modifications. A total of 2 mL-gradient (90/45% density) of Percoll solution was prepared and a 0.15 mL aliquot of semen was poured into the Percoll gradient tube and it was subjected to a 700 x *g* centrifugation for 10 min. At the end of centrifugation, the supernatant was removed and the sample was again subjected to another centrifugation in SP-TALP (supplemented with 3 mg/ mL BSA V, 2.2 mg/ mL sodium pyruvate, 50,000UI/ mL penicillin and 50 mg/ mL streptomycin), at 200 x *g* for 5 min. After the second centrifugation, the pellet was resuspended in 0.4 mL of SP-TALP.

The mini-Percoll protocols were performed: (i) mini-Percoll I (MP-I): two centrifugations of 5000 x *g* for 5 min (Machado *et al.*, 2009); (ii) mini-Percoll II (MP-II): two centrifugations of 2500 x *g* for 5 min; (iii) mini-Percoll III (MP-III): two centrifugations of 1250 x *g* for 5 min; (iv) mini-Percoll IV (MP-IV): 700 x *g* for 10 min (following the same force and time of centrifugation of the traditional Percoll technique), followed by another centrifugation in SP-TALP, at 200 x *g* for 5 min. For all protocols, the gradient was formed by pipetting 0.4 mL of 90% Percoll and then overlaying it with 0.4 mL of 45% Percoll solution. A 0.15 mL aliquot of semen was placed onto the top of the 45% layer and then centrifuged. After the second centrifugation, the pellet was resuspended in 0.4 mL of SP-TALP.

The sperm concentration rate was obtained after each treatment by using a Neubauer counting chamber after spermatozoa dilution (1:200). The rate was calculated by the formula: $(\text{final concentration} \times \text{final volume}) \times (\text{initial concentration} \times \text{initial volume})^{-1} \times 100$. The morphology evaluation was carried out by the preparation of wet smears previously diluted in formol saline solution. Using 1000x magnification with oil immersion under phase contrast microscopy, sperm cells were evaluated to establish the percentage of sperm cells with normal morphology (Bloom, 1973). The capacitation status was assessed by chlortetracycline (CTC) test and was based at the technique described by Pérez-Pé *et al.* (2002), with slight modifications. A 0.75 mM CTC solution was daily prepared in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 mM cysteine, pH 7.8. For staining, 0.01 mL of sperm sample were mixed with 0.01 mL of CTC solution onto a glass slide. Finally, a drop of an antifade solution (0.22 M 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane, DABCO) was mixed to retard the fading of CTC fluorescence. The samples were observed in a microscope (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) under epifluorescence illumination, in 1000x magnification with oil immersion. One hundred spermatozoa per slide were scored (Chamberland *et al.*, 2001) and classified as described by Cormier *et al.* (1997): bright fluorescence over the whole head (noncapacitated cells, F pattern); fluorescence-free band in the postacrosomal region (capacitated cells, B pattern); and full fluorescence over the whole head except for a thin, bright band of fluorescence along the equatorial region (acrosome-reacted cells, AR pattern; Fig. 1).

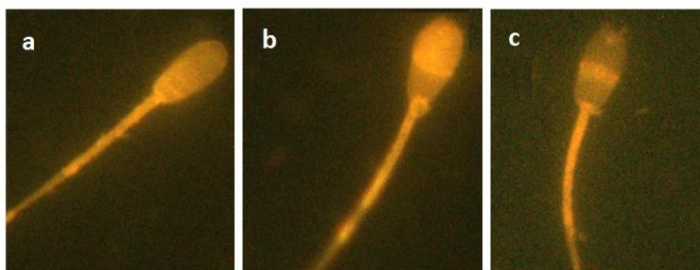


Figure 1. CTC patterns of ram frozen-thawed spermatozoa, under epifluorescence illumination at 1000x. (a) F pattern (noncapacitated cells); (b) B pattern (capacitated cells); (c) AR pattern (acrosome-reacted cells).

Sperm motility parameters were analyzed by computer-assisted semen analysis (CASA) using the SCA[®] system (Sperm Class Analyzer – Microptic, Automatic Diagnostic Systems - Barcelona, Spain) connected to a microscope and the following settings were applied: image collection speed: 25 images per second; magnifying power of microscope: x100; measurements were performed in a 24x24 mm coverslide with a 10 μ L sample drop volume. Sperm movement was observed under negative phase contrast optics and videotape recorded in three different fields, at least. Software settings were adjusted to ram spermatozoa. The main software settings were as follows: the sperm head dimensions detected by the system were between 18 and 60 μ m². Spermatozoa were identified as immotile by curvilinear velocity (VCL) below 10 μ m/ s; between 10 and 45 μ m/ s were classified as slow; between 45 and 75 μ m/ s were classified as medium; and above 75 μ m/ s were classified as rapid. The sperm cells presenting straightness (STR) above 80% were featured as progressive. The following motility patterns were analyzed: total motility (%), progressive motility (%), fast sperm (%), average path velocity (VAP; mm/s), VCL (mm/s), straight line velocity (VSL; mm/s), straightness (STR: VSL/VAP; %), linearity (LIN: VSL/ VCL; %), wobble (WOB: VAP/ VCL; %), lateral head displacement (ALH; mm) and beat cross frequency (BCF; Hz).

The PM integrity was carried out by VitalTest kit, based on acridine orange and propidium iodide labelling and followed manufacturer instructions. At least 100

spermatozoa per slide were analyzed. An epifluorescence microscope were using, at 100x magnification. This procedure resulted in selective labelling of either damage or normal cells visualized in red or green colors, respectively.

All quantitative variables were subjected to normality (Lilliefors test) and homoscedasticity tests and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with Tukey or Fisher-LSD tests for means comparisons. The non-normal variables were subjected to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using the 9.0 SAEG® program.

3. Results

The final sperm concentrations did not vary ($P > 0.05$) after the sperm selection techniques (Percoll: 15.1 ± 1.9 ; MP-I: 23.2 ± 3.2 ; MP-II: 19.6 ± 2.6 ; MP-III: 21.9 ± 3.5 ; MP-IV: $23.5 \pm 3.1 \times 10^6$ spz/ mL), resulting in a similar ($P > 0.05$) sperm recovery rate between traditional Percoll and any MP treatment (Percoll: 6.5 ± 1.5 ; MP-I: 10.8 ± 1.7 ; MP-II: 8.8 ± 1.4 ; MP-III: 9.3 ± 1.0 ; MP-IV: $10.1 \pm 1.2\%$). The majority of sperm parameters assessed were not affected ($P > 0.05$) by the selection technique motility at 0 h, as listed in Tab. 1. The only exception was VCL parameter that was higher ($P < 0.05$) after the MP techniques II, III and IV when compared to traditional Percoll (Tab. 1). Regardless to the treatment, high rates of acrosome-reacted and capacitated cells were verified in the current study and it they were not different among the treatments tested. The PM integrity was also similar ($P > 0.05$) among treatments. Spermatozoa defects did not differ among treatments ($P > 0.05$).

Overall, when we pool the data regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), there was no difference ($P > 0.05$) for Percoll, MP-I, MP-II, MP-III and MP-IV, respectively, for: total motility (29.6 ± 3.4 , 32.5 ± 3.3 , 34.7 ± 3.4 , 32.9 ± 3.6 , and $33.0 \pm 3.6\%$), progressive sperm (6.3 ± 1.6 , 7.0 ± 1.6 , 8.7 ± 1.9 , 8.8 ± 1.9 and $9.0 \pm 1.9\%$), fast sperm (7.0 ± 1.7 , 7.0 ± 1.7 , 9.0 ± 2.0 , 9.0 ± 2.0 and $10.0 \pm 2.1\%$) and slow sperm (21.7 ± 2.2 , 23.5 ± 2.1 , 23.9 ± 2.0 , 21.8 ± 1.9 and $21.4 \pm 1.9\%$). Similarly, no

differences ($P > 0.05$) were found for all the other motility parameters, such as VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, LIN, STR and WOB (data not shown). There was no difference ($P > 0.05$) among the treatments when the intervals of incubation were compared, for all motility parameters described.

When we pool the data regardless of the treatment, considering only the moment of evaluation (average of all treatments), there were significant differences in motility parameters, as shown in Tab. 2. The rate of motility, progressive sperm and fast sperm, was higher ($P < 0.05$) in PT compared to other moments. These parameters were also higher ($P < 0.05$) immediately after the protocols (0 h) in relation to any incubation interval. After 1 h of incubation, these parameters decreased ($P < 0.05$) dramatically. As expected, the slow sperm rate was higher ($P < 0.05$) at all incubation intervals than at PT (data not shown). For VCL, VSL, VAP and ALH, the PT values were higher ($P < 0.05$) than all other moments. For all variables, 0 h was higher ($P < 0.05$) than all incubation intervals. After evaluating VCL, VSL, VAP, LIN, STR and ALH there was no difference ($P > 0.05$) between the intervals of 1 h and 2 h and between 2 h and 3 h, but the values were higher ($P < 0.05$) at 1 h in comparison with 3 h. For WOB and BCF, values were higher ($P < 0.05$) at 1 h when compared to 2 h or 3 h of incubation.

Overall, when we pool the data regardless of the interval of incubation (average from 0 to 3 h), there was no difference ($P > 0.05$) for Percoll, MP-I, MP-II, MP-III and MP-IV, respectively, for: capacitated (24.0 ± 2.2 , 25.4 ± 1.7 , 24.4 ± 1.6 , 27.5 ± 2.0 and $26.6 \pm 2.2\%$), noncapacitated (5.1 ± 0.9 , 3.6 ± 1.0 , 4.4 ± 0.9 , 4.1 ± 0.9 and $3.2 \pm 0.6\%$), acrosome-reacted (70.8 ± 2.5 , 71.0 ± 1.9 , 71.2 ± 2.0 , 68.4 ± 1.9 and $70.3 \pm 2.2\%$), major (2.8 ± 1.9 , 2.8 ± 1.6 , 2.5 ± 2.0 , 3.6 ± 4.4 and $3.8 \pm 5.5\%$) and minor (7.4 ± 6.2 , 9.1 ± 5.9 , 8.3 ± 5.9 , 8.4 ± 6.1 and $8.4 \pm 5.4\%$) defects. Similarly, no differences ($P > 0.05$) were found regarding PM integrity for either intact (9.0 ± 1.8 , 10.0 ± 1.5 , 12.0 ± 2.1 , 11.0 ± 2.2 and $13.0 \pm 2.6\%$) or damaged (91.0 ± 1.8 , 90.0 ± 1.5 , 88.0 ± 2.1 , 89.0 ± 2.2 and $86.0 \pm 2.6\%$) cells. There was no difference ($P > 0.05$) among the treatments when the intervals of incubation were compared, for capacitation status and PM integrity.

When we pool the data regardless of the treatment, considering only the moment of evaluation (average of all treatments), there were significant differences in the

capacitation status, PM integrity (Fig. 2) and more ($P < 0.05$) minor defects were observed at PT ($14.9 \pm 5.4\%$) than at 0 h ($9.1 \pm 6.1\%$). On the other hand, the major defects were similar at PT ($2.7 \pm 1.6\%$) and 0 h ($3.9 \pm 6.8\%$). No significant differences were observed in spermatozoa defects over time (data not shown). When analyzing just intact cells, the PT and post-selection protocols values were greater ($P < 0.05$) than any incubation interval.

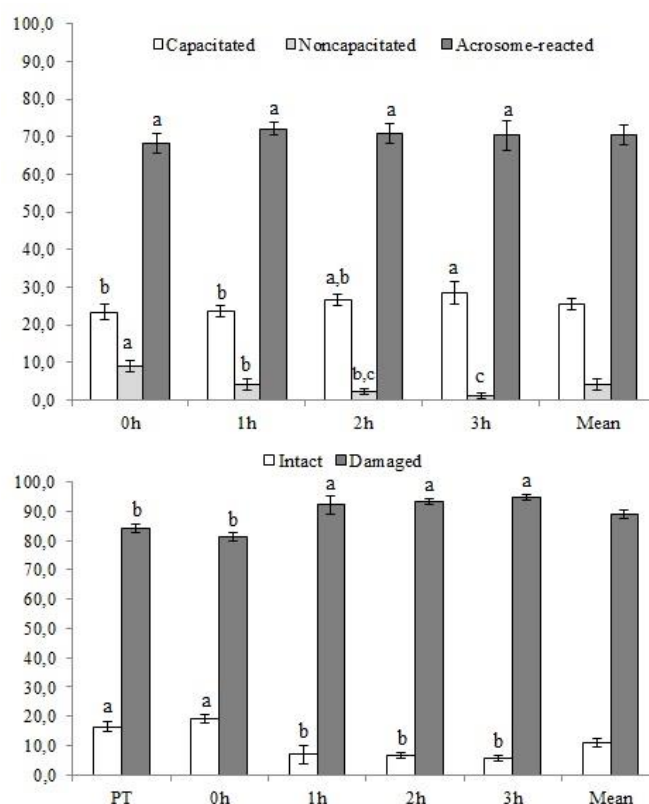


Figure 2. Capacitation status and plasma membrane (PM) integrity after different moments of Percoll protocols in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (Mean $\pm$ SEM). Within a column, values without a common superscript (^{a,b,c}) differ significantly by Tukey and Student t tests ($P < 0.05$); $n = 50$ (ten replicates for each treatment). PT: Post thawing; 0 h: immediately after treatments; 1 h, 2 h and 3 h: hours of incubation after each selection technique.

4. Discussion

In this study, different Percoll protocols were tested in order to determine whether changes in the technique could bring any damage to ram frozen-thawed sperm. MP techniques and traditional Percoll were compared and there were no significant differences among them for most variables. This lack of difference corroborates with Machado *et al.* (2009), in cattle. Moreover, these authors showed that MP gradients had no adverse effect on cleavage rate or could even increase the blastocyst formation. The only study performed in sheep, but using fresh semen, reported no difference between MP and the swim-up technique in the parameters (Pegoraro *et al.*, 2013). All together, these data lead to the possibility of reducing the volume of the gradient used and centrifugation time can open perspectives for the use of new technical protocols, reducing costs and semen processing time.

In the present study, all MP techniques showed higher values of VCL in comparison with traditional Percoll (Tab. 1). In sheep, the literature is not unanimous about which motility and kinematics parameters can reliably predict sperm fertility. However, in previous study, the authors observed that VCL and VAP presented a high correlation with ovine sperm migration, inferring these parameters are related with fertility (Robayo *et al.*, 2008). García-Álvarez *et al.* (2014) also determined that they may correspond to hyperactivated spermatozoa, an essential event to spermatozoa be able to fertilize the oocyte.

No significant difference was detected in sperm recovery rates among treatments, corroborating other studies that tested different technical protocols, mostly in cattle (Machado *et al.*, 2009; Folchini *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2014). Even when applying the same force and centrifugation time of traditional Percoll in a MP gradient (IV), the sperm recovery rate was unchanged, indicating a worthy replacement of the traditional Percoll. These reductions are offset by the increased centrifugal force assigned to protocols (Machado *et al.*, 2009).

We observed a high rate of capacitated and acrosome-reacted cells at PT and after the protocols (0 h; Fig. 2), even considering the medium does not provide evidence to induce sperm capacitation in sheep. These high rates can be attributed to changes in

sperm cell caused by the cryopreservation process. In a previous study, the authors reported that the passage of sperm by the particles of the Percoll gradient causes great destabilization of PM and facilitates the promotion of premature acrosome reaction in sheep (Cesari *et al.*, 2006). It must be considered that the ovine sperm PM are probably more sensitive to destabilization when subjected to centrifugation (Gil *et al.*, 1999). The current behavior of noncapacitated cells rate was similar to that reported by Gillan *et al.* (1997). The decrease noncapacitated in this rate was evident after 3 h, due to the start of the capacitation event and, in turn coinciding with the increase of capacitated cells in the same interval. As the process of sheep sperm capacitation lasts around 2 h (Austin, 1970), perhaps a longer incubation interval would be needed to ascertain the onset of acrosome reaction. This may explain why the acrosome-reacted cell rates have remained constant during incubation.

PT velocities values were higher than after the sperm selection protocols (0 h; Tab. 2). This may be due to the fact that mitochondria are damaged during the process of freezing and thawing, causing a reduction in the flagellar activity (Muiño *et al.*, 2008) and, possibly, after the processing of sperm selection techniques. In addition to this fact, the decline of these parameters after the selection can be due to centrifugation process. The mechanical and oxidative stress of the centrifugation induce lipid peroxidation causing considerable damage to sperm functions, including, motility (Mortimer, 1991). A study in sheep have shown that even after the sperm selection, the cellular chromatin integrity, PM integrity and DNA fragmentation may change (García-Álvarez *et al.*, 2010).

Low values were found in intact PM sperm cells rate, similar to a previous study (Folchini *et al.*, 2012) in cattle. It is known that the process of freezing and thawing affects much less cell motility as compared with the damages of the PM integrity (Gil *et al.*, 1999). Conversely, increasing the centrifugation force did not reduce the quality and integrity of ovine sperm PM on the results obtained in this study. Guimarães *et al.* (2014) observed that the 9000 x g centrifugation of MP, did not differ with respect to functional PM and morphology, still higher in the recovery of motile cells in relation to the protocols using lower forces. The similarity of the intact PM values in PT and after the treatments obtained in our study suggest the particles of the gradient are not harmful to ram sperm.

There is great evidence that Percoll gradients reduce the recovery of cells with morphological changes (Folchini *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2014). The reduction in the recovery of sperm presenting any pathologies appears as a further advantage of Percoll protocols, which in turn not only prevented damage to the sperm cells, but also improved the quality of the samples.

This study showed the reduction of the gradient volume and time of the centrifugation, and the increase of its force at Percoll density gradient technique, may be successfully applied for ram frozen–thawed sperm selection since all the MP treatments tested were similar to the traditional Percoll. In conclusion, MP may be a great alternative to traditional Percoll technique, decreasing costs and time of sperm handling, without cell damages in ram frozen–thawed sperm.

Table 1. Sperm motility values immediately after spermatozoa selection by different treatments in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (mean $\pm$ SEM)

Treatment/ Parameter	Total motility (%)	Progressive sperm (%)	Fast sperm (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
Percoll	32.4 $\pm$ 3.6	8.2 $\pm$ 1.7	7.8 $\pm$ 1.4	46.3 $\pm$ 4.9 ^b	33.8 $\pm$ 4.8	38.6 $\pm$ 5.0	1.3 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.8	69.1 $\pm$ 5.2	84.8 $\pm$ 3.3	80.3 $\pm$ 4.0
mini-Percoll I	35.2 $\pm$ 5.6	10.5 $\pm$ 1.9	10.4 $\pm$ 1.8	58.5 $\pm$ 3.6 ^{a,b}	42.7 $\pm$ 4.6	48.9 $\pm$ 4.5	1.8 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.3	71.7 $\pm$ 3.7	86.3 $\pm$ 2.1	82.6 $\pm$ 2.7
mini-Percoll II	45.3 $\pm$ 5.8	17.5 $\pm$ 3.3	17.8 $\pm$ 3.6	64.5 $\pm$ 6.0 ^a	47.3 $\pm$ 5.6	55.1 $\pm$ 6.4	1.8 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.3	71.3 $\pm$ 3.5	85.4 $\pm$ 1.6	83.2 $\pm$ 3.1
mini-Percoll III	45.7 $\pm$ 6.8	17.1 $\pm$ 3.7	17.4 $\pm$ 3.9	66.2 $\pm$ 5.5 ^a	49.4 $\pm$ 5.3	57.3 $\pm$ 5.5	1.8 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.2	73.5 $\pm$ 3.4	85.5 $\pm$ 2.1	85.6 $\pm$ 2.3
mini-Percoll IV	45.6 $\pm$ 5.7	18.1 $\pm$ 3.5	18.5 $\pm$ 4.3	67.4 $\pm$ 5.2 ^a	52.6 $\pm$ 5.0	59.7 $\pm$ 5.5	1.7 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.2	77.2 $\pm$ 2.5	87.8 $\pm$ 1.3	87.8 $\pm$ 1.7
Mean	40.8 $\pm$ 5.7	14.3 $\pm$ 3.1	14.4 $\pm$ 3.4	60.6 $\pm$ 5.5	45.2 $\pm$ 5.3	51.9 $\pm$ 5.7	1.7 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.4	72.6 $\pm$ 3.7	85.9 $\pm$ 2.1	83.9 $\pm$ 2.8

($P > 0.05$); $n=10$; ^{a,b} Within a column, values without a common superscript differ significantly; Percoll: 700 x g for 10 min followed by 200 x g for 5 min; mini-Percoll I: 5000 x g for 5 min twice; mini-Percoll II: 2500 x g for 5 min twice; mini-Percoll III: 1250 x g for 5 min twice; mini-Percoll IV: 700 x g for 10 min followed by 200 x g for 5 min; VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; LIN: linearity; STR: straightness; WOB:

Table 2. Sperm motility values after different assay moments of Percoll protocols in ram frozen–thawed sperm of Santa Inês breed (Mean $\pm$ SEM)

Moment/ Parameter	Total motility (%)	Progressive sperm (%)	Fast sperm (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
PT*	52.3 $\pm$ 2.1 ^a	19.7 $\pm$ 1.5 ^a	22.0 $\pm$ 1.2 ^a	73.1 $\pm$ 2.5 ^a	53.2 $\pm$ 2.8 ^a	62.0 $\pm$ 2.8 ^a	2.5 $\pm$ 0.07 ^a	7.8 $\pm$ 0.1 ^a	71.0 $\pm$ 1.5 ^a	84.5 $\pm$ 1.0 ^a	83.5 $\pm$ 1.0 ^a
0 h	41.0 $\pm$ 2.5 ^b	14.3 $\pm$ 1.6 ^b	14.4 $\pm$ 1.5 ^b	60.6 $\pm$ 2.4 ^b	45.2 $\pm$ 2.4 ^b	51.9 $\pm$ 2.5 ^b	1.7 $\pm$ 0.07 ^b	6.8 $\pm$ 0.2 ^a	72.6 $\pm$ 1.7 ^a	86.0 $\pm$ 0.9 ^a	83.9 $\pm$ 1.3 ^a
1 h	24.2 $\pm$ 1.9 ^c	3.1 $\pm$ 1.3 ^c	2.7 $\pm$ 0.5 ^c	28.0 $\pm$ 1.6 ^c	15.4 $\pm$ 1.6 ^c	19.4 $\pm$ 1.7 ^c	1.1 $\pm$ 0.1 ^c	4.3 $\pm$ 0.4 ^b	49.7 $\pm$ 2.9 ^b	73.5 $\pm$ 2.3 ^b	64.2 $\pm$ 2.6 ^b
2 h	22.0 $\pm$ 1.6 ^c	1.6 $\pm$ 0.9 ^c	1.5 $\pm$ 0.3 ^c	22.5 $\pm$ 1.3 ^{c,d}	10.4 $\pm$ 1.4 ^{c,d}	13.7 $\pm$ 1.4 ^{c,d}	0.7 $\pm$ 0.1 ^{c,d}	2.7 $\pm$ 0.4 ^c	39.7 $\pm$ 3.2 ^{b,c}	66.0 $\pm$ 2.8 ^{b,c}	55.1 $\pm$ 2.9 ^c
3 h	24.0 $\pm$ 2.1 ^c	1.1 $\pm$ 0.8 ^c	0.8 $\pm$ 0.2 ^c	18.5 $\pm$ 0.7 ^d	7.3 $\pm$ 0.8 ^d	10.1 $\pm$ 0.9 ^d	0.5 $\pm$ 0.1 ^d	2.3 $\pm$ 0.4 ^c	34.7 $\pm$ 3.1 ^c	62.3 $\pm$ 2.3 ^c	49.9 $\pm$ 3.0 ^c
Mean	32.0 $\pm$ 2.7	8.0 $\pm$ 1.5	8.3 $\pm$ 1.5	40.6 $\pm$ 3.6	26.3 $\pm$ 3.3	31.4 $\pm$ 3.6	1.3 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.4	53.5 $\pm$ 3.4	74.5 $\pm$ 2.9	67.3 $\pm$ 3.0

Within a column, values without a common superscript (^{a,b,c,d}) differ significantly by Tukey test ($P < 0.05$); n=50 (ten replicates for each treatment); *PT: Post thawing; 0 h: immediately after treatments; 1 h, 2 h and 3 h: hours of incubation after each selection technique; VCL: curvilinear velocity; VSL: straight line velocity; VAP: average path velocity; ALH: lateral head displacement; BCF: beat cross frequency; LIN: linearity; STR: straightness; WOB: wobble

Acknowledgments

This research received a grant from Finep and Faperj (E-26/111.694/2013). JFF, CCSO and FZB are CNPq fellows and JMGSF was supported by CAPES.

References

- AUSTIN, C.R. Ageing and reproduction: post-ovulatory deterioration of the egg. *J. Reprod. Fertil.*, n.12, p.39–53, 1970.
- BLOOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, n.25, p.383-391, 1973.
- CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production *in vitro*. *Theriogenology*, n.66, 1185–1193, 2006.
- CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, I.V.; TARDIFF, S. et al. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, n.55, p.823-835, 2001.
- COCERO, M.J.; ALABART, J.L.; HAMMAMI, S. et al. The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reprod. Dom. An.* n.46, v.463–470, 2011.
- CORMIER, N.; SIRARD, M.A; BAILEY, J.L. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *J. Androl.* v.18, p.461-468, 1997.
- FOLCHINI, N.; LEIVAS, F.; SANTOS, F. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev. Bras. Reprod. An.*, n.36, p.239–244, 2012.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P. et al. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*, n.84, p.948–955, 2015.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M. et al. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. *Reprod. Fertil. Devel.*, n.26, p.725-732, 2014.

- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M. et al. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, n.74, p.979–988, 2010.
- GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, n.54, p.93–108, 1999.
- GILLAN, L.; EVANS, A.G.; MAXWELL, W.M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Devel.* n.9, p.481–487, 1997.
- GUIMARÃES, A.C.G.; LEIVAS, F.G.; SANTOS, F.W. et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *An. Reprod. Sci.*, n.146, p.103–110, 2014.
- LUNA, C.; COLÁS, C.; CASAO, A. et al. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. *Theriogenology*, n.83, p.670–678, 2015.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, n.71, p.1289–1297, 2009.
- MARA, L.; SANNA, D.; CASU, S. et al. Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season. *Zygote*, n.22, p.366–371, 2013.
- MORTIMER, D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, n.6, p.173-176, 1991.
- MUIÑO, R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T. et al. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *An. Reprod. Sci.* n.109, p.50–64, 2008.
- OLIVARES, C.C.S.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A, et al. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rum. Res.*, n.127, p.44-49, 2015.
- PAPADOPOULOS, S.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A. et al. *In vitro* fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology*, n.63, p.150–159, 2005.

- PEGORARO, L.M.C.; SILVA, J.F.; CURTINAZ, A. et al. Different sperm selection methods used for ovine *in vitro* embryo production. In: Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2013, (Abstract).
- PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Devel.* n.61, p.226–233, 2002.
- ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, et al. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. *Reprod. Dom. An.* n.43, p.393–399, 2008.
- SHIRAZI, A; MOTAGHI, E. The *in vitro* fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development. *J. Reprod. Infertil.* n.14, p.8–16, 2013.
- SOUZA-FABJAN, J.M.G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N. et al. *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research. *Theriogenology*, n.81, p.1149–62, 2014.
- STREHLER, E.; BACCETTI, B.; STERZIK, K. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. *Hum. Reprod.* n.13, p.120-123, 1998.
- WANG, Z.; LIN, P.; YU, S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized ovine embryos. *Theriogenology*, n.79, p.695–701, 2013.
- YÁNIZ, J.L.; PALACÍN, I.; GOSÁLVEZ, J. Short communication. Evaluation of a commercial kit based on acridine orange / propidium iodide to assess the plasma membrane integrity of ram sperm. *Span. J. Agric. Res.* n.11, p.362–365, 2013.

9. CAPÍTULO 4

Mini-Percoll technique induces similar capacitation features in domestic ruminant frozen-thawed spermatozoa regardless the presence of heparin

A técnica de mini-Percoll induz a ocorrência de características similares à capacitação espermática em sêmen congelado/descongelado de ruminantes domésticos independentemente da presença da heparina

Artigo submetido ao periódico: Reproductive Biology

Em: Setembro de 2017

Qualis: B1 – Medicina Veterinária

Mini-Percoll technique induces similar capacitation features in domestic ruminant frozen-thawed spermatozoa regardless the presence of heparin

Carolina Cerqueira Sarmiento Olivares^{a*}, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^a, Jeferson Ferreira da Fonseca^b, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista^a, Mario Felipe Alvarez Balaro^a, Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva^a, Vivian Angélico Pereira Alfradique^a, Luana Rangel Côrtes^a, Felipe Zandonadi Brandão^a

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Av. Vital Brasil Filho, 64, CEP 24230-340 Niterói, RJ, Brazil

^b Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, CP 145, 62010-970 Sobral, CE, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 21 2629 2595; fax: +55 21 2629 2433.

E-mail address: ccs.olivares@gmail.com

ABSTRACT

Sperm capacitation is a prerequisite for mammal successful fertilization. Evidences suggest that cryopreservation and Percoll technique induce spontaneous capacitation. This study aimed to compare ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm after mini-Percoll processing on sperm parameters, either receiving or not heparin within incubation medium. Commercial semen of all species was used. After thawing, motility and capacitation status were evaluated. Sperm samples were selected by mini-Percoll,

evaluated and received or not heparin within incubation medium for 18 h. Sperm parameters were assessed in different intervals. In comparison with post-thawing analysis, after mini-Percoll, ovine, caprine and bovine species, respectively, demonstrated: a reduction in progressive motility ($P < 0.05$; 20.3, 4.5 and 12.1%) and an increase in both capacitation ($P < 0.05$; 11.4, 15.1 and 8.1%) and acrosome-reacted cells rate ($P > 0.05$; 4.7, 1.8 and 6.4%). Among species, ovine presented higher acrosome-reacted cells rate both post-thawing and after mini-Percoll analyses. Heparin supplementation did not affect ($P > 0.05$) most of the parameters evaluated. In ovine species, a lower ($P < 0.05$) rate of sperm agglutination throughout the incubation period was observed in the presence of heparin. In the absence of heparin, ovine showed a higher ($P < 0.05$) agglutination rate throughout the incubation compared to other species. In conclusion, frozen-thawed ovine, caprine and bovine sperm selected by mini-Percoll technique demonstrate similar capacitation status, regardless the presence of heparin during in vitro incubation.

Keywords: sperm capacitation, ovine, caprine, bovine, CTC

1. Introduction

The sperm capacitation in mammalian is a prerequisite for successful fertilization [1]. This process consists of a series of functional, biochemical and biophysical modifications that render the ejaculated sperm competent for oocyte fertilization. These fundamental processes normally take place into the female genital tract during the migration of sperm to the site of fertilization [2]. Few seconds after ejaculation, the concentrations of calcium and bicarbonate in sperm increase. Increased bicarbonate concentrations result in enhanced intracellular pH and activation of adenylyl cyclase.

Bicarbonate levels produce a rapid collapse in the asymmetry of the plasma membrane (PM) components, causing the activation of lipid translocation enzymes, thus increasing the exposure of cholesterol receptors. Simultaneously, there is an increase in cAMP and, consequently, activation of the kinase proteins, that modulate calcium channels, leading to changes in membrane potential and intracellular calcium levels [3]. The onset of a slow capacitation step is marked by cholesterol removal from the PM and the increase in its fluidity [4]. At the same time as the cholesterol decreases, the lipid structure reorganizes. During this phase, the kinase proteins affect the phosphorylation of several proteins directly or indirectly activating other kinase proteins [5]. These changes will lead to sperm capacitation, promoting the following events: ability of the sperm to undergo acrosome reaction (AR), hyperactivation, chemotaxis and ability to fertilize the oocyte.

It is well documented in the literature that glycosaminoglycan such as heparin plays a crucial role in the capacitation process in vitro [6, 7]. Secreted by the female reproductive tract epithelium, heparin promotes capacitation by binding to and removing seminal plasma proteins which are adsorbed to the sperm PM and would inhibit capacitation [8]. In ruminants, such as ovine, caprine and bovine, heparin also produces an increase of sperm intracellular pH and Ca^{2+} concentration, protein phosphorylation and modification of motility parameters [9].

Reproductive biotechnologies such as semen cryopreservation and sperm processing with the Percoll gradient, routinely used in in vitro embryo production laboratory for in vitro fertilization, induce modifications in the sperm PM that trigger the premature capacitation. There is substantial evidence that cryopreservation promotes capacitation-like changes on bull [10-12], ram [13, 14] and buck [15] sperm. As the sperm are cooled, membrane phospholipids undergo a high rotational of the lipids, generating an increase in PM fluidity [16], and in reactive oxygen species that cause release of

cholesterol and tyrosine phosphorylation of proteins [12], the marker of sperm cryocapacitation. Indeed, there is an accumulation of Ca^{+2} as a result of poor efflux mechanisms. Consequently, the sperm population becomes partially capacitated and AR [17].

Although sperm cryocapacitation occurs in all ruminant species, it is known that ram sperm, which have a very low cholesterol/phospholipid ratio, is more sensitive to cooling and cold-shock stress than other species [18]. Thus, there is a lot of effort to minimize the detrimental effects of cryopreservation and thawing on ram sperm membrane [19]. To our knowledge, there are no studies comparing the capacitation status in frozen-thawed semen between ram and other ruminant species. Our general hypotheses were: (a) cryopreserved sperm of ram suffer capacitation more quickly than buck and bull under the same conditions; (b) capacitation status of ruminant cryopreserved semen behaves similarly regardless the presence of heparin after mini-Percoll technique; (c) ruminant frozen-thawed semen selected by mini-Percoll and incubated within a media without heparin supplementation is not impaired regarding capacitation status and sperm parameters. Therefore, the aim of this study was to compare ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm after mini-Percoll selection on sperm motility parameters, agglutination rate and capacitation status, either receiving or not heparin supplementation within the medium throughout in vitro incubation.

2. Material and Methods

All the experiments were carried out at Fluminense Federal University (UFF), Niteroi (Brazil, latitude 22°53'S, longitude 43°06'W). The procedures were approved by the local ethic committee (protocol approval: 374/13).

2.1. Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

2.2. Experimental design

To evaluate sperm motility and capacitation parameters in caprine (n = 3; Alpine), ovine (n = 3; Santa Inês) and bovine (n = 3; Holstein) species, commercial frozen-thawed semen of nine animals of proven fertility were used. Semen 0.25 mL straws from each animal were maintained in liquid N₂ until analysis. Six replicates were performed. For each replicate, two straws of each animal per species were thawed in the water bath at 37 °C for 30 s, totaling six straws for each species. This pool was placed into a 15 mL conical centrifuge tube (Corning Incorporated, São Paulo, Brazil), from which a sample was obtained (after thawing) to determine motility and capacitation status. The remainder of the pool was divided into five aliquots of 0.15 mL and submitted to sperm selection with mini-Percoll gradient (item 2.3). After this procedure, an aliquot of each species was used for motility rate and capacitating status (after mini-Percoll). Samples of each remaining aliquot (n = 4, for each species) were divided into two parts for incubation in the SP-TALP medium (supplemented with 1 mg/ mL BSA V, 2.2 mg/mL sodium pyruvate, 50,000 IU/ mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin) with 5 µg/mL of heparin (Heparin group) [20, 21] or SP-TALP medium without heparin (Control group). Incubation occurred at 38.5 °C under humidified atmosphere with 5% CO₂ for 18 h. Samples of each species and treatment were obtained at intervals (1.5 h, 3 h, 6 h or 18 h) during incubation and analysis of agglutination rate, motility and capacitation status were performed.

2.3. Mini-Percoll technique

The sperm selection by Mini-Percoll technique was made based on the method we have previously established in sheep [22]. The gradient was formed by pipetting 0.4 mL of 90% Percoll solution into a 1.5 mL microtube and then overlaying it with 0.4 mL of 45% Percoll solution. A 0.15 mL aliquot of semen was placed onto the top of the 45% layer and then subjected to a 5000 x g centrifugation for 5 min. After the centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 0.4 mL of SP-TALP. Then, another centrifugation was performed with the same force and time. After the second centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 0.25 mL of SP-TALP.

2.4. Incubation media

Immediately post-selection, the content of the four mini-Percoll microtubes per species was verted to a 15 mL conical centrifugal tube and was completed until 1 mL with SP-TALP. The total content was divided into either: (a) SP-TALP medium without heparin (Control group); or (b) SP-TALP in the presence of 5 µg/mL heparin (Heparin group). The treatments comprised a total content of 1 mL, which was divided into four 0.25 mL aliquots. These aliquots were verted into four microtubes and the samples were completed with 0.5 mL SP-TALP. The microtubes proceeded to incubation and samples were assessed in the different incubation intervals.

2.5. Sperm assays

2.5.1. Sperm Capacitation status

The capacitation status was assessed by chlortetracycline (CTC) test and was based at the technique described by Olivares et al. [23]. A 0.75 mM CTC solution was daily prepared in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 mM cysteine, pH 7.8. For staining, 0.01 mL of sperm sample were mixed with 0.01 mL of CTC solution onto a glass slide. Finally, a drop of an antifade solution (0.22 M 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane, DABCO, Sigma) was mixed to retard the fading of CTC fluorescence. For the evaluation of CTC patterns, the samples were observed in a microscope (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) under epifluorescence illumination, in 1000x magnification with oil immersion. Two hundred sperm per slide were scored [9] and classified into three groups, as described by Cormier et al. [12]: bright fluorescence over the whole head (noncapacitated cells, F pattern); fluorescence-free band in the post-acrosomal region (capacitated cells, B pattern); and full fluorescence over the whole head except for a thin, bright band of fluorescence along the equatorial region (acrosome-reacted cells, AR pattern).

Particularly for CTC assay at post-thawing (PT), a sperm washing was necessary to remove the semen extenders particles that bind to CTC and harms the evaluation. On the top of semen, 4 mL of phosphate-buffered saline was layered within a 15 mL conical centrifuge tube. The tube was centrifuged at 200 x g for 6 min twice. After aspiration of the supernatant, the sperm were resuspended in 500 µL of phosphate-buffered saline again. Then, the washed sperm were finally subjected to CTC staining assay, as described above.

2.5.2. Sperm motility

Sperm motility parameters were analyzed by computer-assisted semen analysis (CASA) using the SCA® system (Sperm Class Analyzer – Microptic, Automatic

Diagnostic Systems - Barcelona, Spain) connected to a microscope and the following settings were applied, for all species studied: image collection speed: 25 images per second; magnifying power of microscope: x100; measurements were performed in a 24x24 mm coverslide with a 10 μ L sample drop volume. Sperm movement was observed under negative phase contrast optics and videotape recorded in three to five different fields, with at least 500 sperm captured for analysis. Software settings were adjusted to each evaluated species sperm. The main software settings were as follows: the sperm head dimensions detected by the system were between 18-60 μ m² for ovine and caprine, and 25-60 μ m² for bovine. Sperm were identified as immotile by curvilinear velocity (VCL) below 10 μ m/ s; between 10 and 45 μ m/ s were classified as slow; between 45 and 75 μ m/ s were classified as medium; and above 75 μ m/ s were classified as rapid. The sperm cells presenting straightness (STR) above 80% were featured as progressive. The following motility patterns were analyzed: total motility (%), progressive motility (%), average path velocity (VAP; mm/s), VCL (mm/s), straight line velocity (VSL; mm/s), straightness (STR: VSL/VAP; %), linearity (LIN: VSL/ VCL; %), wobble (WOB: VAP/ VCL; %), lateral head displacement (ALH; mm) and beat cross frequency (BCF; Hz).

2.5.3. Agglutination rate

To determine the agglutination rate, the evaluation was performed during the motility assessment. Approximately 50 motile sperm cells were visually examined in each one of four different fields, totaling 250 counted cells. The percentage of head-to-head agglutinated sperm was defined as the number of sperm agglutinated to at least one other sperm per total motile sperm [24].

2.6. Statistical analysis

All quantitative variables were subjected to normality (Lilliefors test) and homoscedasticity tests and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with Tukey or Fisher-LSD tests for means comparisons. The non-normal variables were subjected to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using the 9.0 SAEG® program [25].

3. Results

3.1. Sperm motility and capacitation status before and after mini-Percoll processing

Sperm motility parameters of the three species after thawing and mini-Percoll processing are presented in Table 1. After mini-Percoll selection, a reduction ($P < 0.05$) in all sperm motility parameters was observed in the three species. Conversely, an increase ($P < 0.05$) was observed in all the parameters associated with sperm capacitation after processing with mini-Percoll (Table 1).

Higher ($P < 0.05$) total motility rate and progressive motility after thawing was observed in caprine compared to ovine and bovine species, which did not differ between themselves. This difference persisted after sperm processing with mini-Percoll, but a reduction ($P < 0.05$) in total motility was observed in ovine compared to bovine. Concerning capacitation status, higher percentage of capacitated cells after thawing was observed in the bovine species. However, after processing semen with mini-Percoll, the results of bovine were similar to caprine species. Regarding the acrosome-reacted cells, ovine species presented the highest rates, both after thawing and after processing with mini-Percoll.

3.2. Sperm motility and capacitation status after incubation in the presence of heparin

Regardless of the species and the moment of evaluation (1.5, 3, 6 and 18 h), heparin supplementation in the sperm incubation medium resulted in no extra benefits ($P > 0.05$) to the parameters associated with sperm motility. Similarly, heparin did not affect ($P > 0.05$) the rate of capacitated and acrosome-reacted cells in comparison to control groups, except for caprine species ($P < 0.05$). There was a species effect ($P < 0.05$) when acrosome-reacted cells were observed, given that heparin group resulted in higher values at 1.5 h and 18 h (Table 2). However, a lower ($P < 0.05$) rate of sperm agglutination was observed in the group supplemented with heparin compared to the control group in ovine species (Figure 1), in all moments of evaluation tested. Additionally, in the absence of heparin, ovine presented higher ($P < 0.05$) agglutination compared to the bovine and caprine species throughout the incubation period (Figure 1).

4. Discussion

Three general hypotheses were postulated: (a) cryopreserved sperm of ram suffer capacitation more quickly than buck and bull under the same conditions; (b) capacitation status of ruminant cryopreserved semen behaves similarly regardless the presence of heparin after mini-Percoll technique; (c) ruminant frozen-thawed semen selected by mini-Percoll and incubated within a media without heparin supplementation do not result in damage during capacitation status and sperm parameters.

The first hypothesis was not supported by the present study, once we observed that all species studied seemed to behave the same way regarding capacitation status overtime. Cryopreserved samples lose phospholipids faster [26] and present higher

proportion of sperm cells with high intracellular Ca^{+2} [27], making the frozen-thawed sperm more susceptible to capacitating process, no matter the species. This is in accordance with the maintenance of the B pattern throughout the incubation time in all species and demonstrated in the present study. The capacitation event that occurs in frozen-thawed semen, cryocapacitation, is often reported in literature. Studies using ruminant sperm, reported that fresh semen needs 3 h of incubation to reach 50% of capacitated cells, whereas frozen-thawed semen presents higher rates of capacitated cells immediately after thawing [28], as also demonstrated in the present study. Pons-Rejraji et al. [11] affirmed that, upon thawing, bull sperm bind to CTC in a manner very similar to freshly ejaculated sperm that have been incubated for 5 h. The authors suggested that immediately after thawing, frozen sperm are in an advanced capacitating state similar to fresh sperm incubated in the presence of a capacitation inducer, similar to that observed in the current study.

Regarding the second hypothesis, data obtained in the present study showed there was no difference, at most of the evaluated parameters, between the group in the presence or not of heparin, in all species tested. These data are similar to values found by other studies immediately after thawing [bull:10, 11; ram: 13, 14; buck: 15]. The results indicate ruminant frozen-thawed sperm undergo an easier premature capacitation, regardless the presence of heparin, making the use of frozen-thawed semen more practical and economic. The absence of heparin effect may be since non-intact acrosome sperm, coming from capacitating event, do not react with heparin and it is not possible for heparin to fix in external acrosome membrane [29].

The third hypothesis was also supported by the results of the current study. Thus, Mini-Percoll technique without heparin can be a useful alternative for frozen-thawed semen preparation, dispensing the use of expensive capacitating inducers. Percoll

gradient is one of the main techniques used in the laboratories of in vitro embryo production for the separation of sperm from seminal plasma and/or cryoprotectant in mammals. Although we have observed reduced rates of sperm motility in all species after Percoll, its effect on the capacitated cells rate was also observed in all species. Percoll particles can induce the capacitation process, due its adherence to the sperm membranes and might alter them by removing some coating glycoproteins [30]. Moreover, after the selection step, this technique involves one more washing step. Our results are in accordance with the fact that Percoll technique and repeated washing removes decapacitating component present in the PM [31] and could alter Ca^{+2} distribution [32], yielding capacitating cells.

Lower rates of motility were found in ovine species in the present study. These data can be supported since a species with sperm membranes characterized by a high degree of saturation in the phospholipid-bound acyl moieties [33] and a high sterol to phospholipid ratio [34] presents more resistance for cold-shock damages. Sperm membrane cholesterol/phospholipid ratios differ among species: goat (0.59), bull (0.45) and ram (0.37) [18]. Thus, ram sperm are more sensitive to cooling and cold-shock stress than other species, which can explain the lower motility rates found.

A motility pattern was observed in all frozen-thawed samples and after mini-Percoll processing in all species assessed in the present study, similar to that described by Muiño et al. [35]. According to the authors, sperm with relatively low velocity (VCL and VAP) and with high progressiveness (LIN %, STR % and WOB %) comprised a slow but progressive sperm population. This motility pattern is a result of PT thermal stress, as some of the sperm may reduce their flagella activity, probably due to sublethal cryoinjury, although their movement is still forward [35].

The precise relationship between sperm agglutination and its *in vivo* fertilizing ability remains unclear [24]. Sperm head-to-head agglutination during *in vitro* incubation could stimulate capacitation and it was believed that sperm agglutination was one of the events associated with fertilizing ability [36; 37]. In the present study, the absence of heparin led to higher agglutination rates in ovine and caprine species. This fact can also explain the higher capacitating rates found, and the presence of the agglutination could contribute to the cell fertilizing ability as well as a positive feature of the sample.

5. Conclusion

The present study observed similar capacitation features in domestic ruminant frozen-thawed sperm among species and their sperm maintained similar capacitation, motility and agglutination patterns along incubation intervals. Immediately after thawing, after mini-Percoll selection and up to 18 h, the frozen-thawed sperm had a high percentage of capacitated cells, even in the absence of heparin. It suggests that ruminant frozen-thawed semen preparation by mini-Percoll selection and incubated in a media without heparin supplementation, can be an efficient technique and an alternative to dispense the use of expensive capacitating inducers, making the sperm preparation easier, cheaper and more practical.

Acknowledgments and Funding

This work was supported by Finep and Faperj (E-26/111.694/2013). CCSO, JFF and FZB are CNPq fellows and JMGSF and RITPB were supported by CAPES.

Table 1: Motility parameters of ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm subjected to mini-Percoll treatment

Species	Time	TM (%)	PM (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Ovine	AT*	46 $\pm$ 6 ^{a,B}	23 $\pm$ 3 ^{a,B}	103 $\pm$ 7 ^{a,A}	86 $\pm$ 6 ^{a,A}	95 $\pm$ 7 ^{a,A}	83 $\pm$ 2 ^{a,A,B}	90 $\pm$ 1 ^{a,A}	91 $\pm$ 1 ^{a,A,B}	2 $\pm$ 0 ^{a,A}	7 $\pm$ 0 ^{a,B}
	AMP**	14 $\pm$ 2 ^{b,C}	3 $\pm$ 1 ^{b,C}	44 $\pm$ 3 ^{b,C}	33 $\pm$ 3 ^{b,B}	37 $\pm$ 3 ^{b,B}	74 $\pm$ 1 ^{b,A}	88 $\pm$ 1 ^{a,A}	83 $\pm$ 1 ^{b,A,B}	1 $\pm$ 0 ^{b,C}	6 $\pm$ 0 ^{a,C}
Caprine	AT*	58 $\pm$ 8 ^{a,A}	27 $\pm$ 4 ^{a,A}	98 $\pm$ 7 ^{a,A}	75 $\pm$ 2 ^{a,B}	87 $\pm$ 7 ^{a,B}	75 $\pm$ 2 ^{a,A,B}	85 $\pm$ 2 ^{a,b,A}	88 $\pm$ 2 ^{a,b,A,B}	2 $\pm$ 0 ^{a,A}	8 $\pm$ 0 ^{a,A}
	AMP**	53 $\pm$ 4 ^{a,A}	23 $\pm$ 2 ^{b,A}	75 $\pm$ 3 ^{b,A}	56 $\pm$ 3 ^{b,A}	65 $\pm$ 4 ^{b,A}	75 $\pm$ 2 ^{a,A}	85 $\pm$ 1 ^{a,b,A}	87 $\pm$ 1 ^{a,b,A,B}	2 $\pm$ 0 ^{b,B}	7 $\pm$ 0 ^{a,B}
Bovine	AT*	46 $\pm$ 5 ^{a,B}	20 $\pm$ 3 ^{a,C}	67 $\pm$ 4 ^{a,B}	47 $\pm$ 3 ^{a,C}	56 $\pm$ 3 ^{a,C}	70 $\pm$ 1 ^{a,B}	84 $\pm$ 1 ^{a,A}	83 $\pm$ 1 ^{a,B}	2 $\pm$ 0 ^{a,A}	8 $\pm$ 0 ^{a,A}
	AMP**	28 $\pm$ 2 ^{b,B}	8 $\pm$ 1 ^{b,B}	53 $\pm$ 2 ^{b,B}	36 $\pm$ 3 ^{b,B}	41 $\pm$ 3 ^{b,B}	67 $\pm$ 3 ^{a,A}	86 $\pm$ 2 ^{a,A}	77 $\pm$ 2 ^{a,B}	2 $\pm$ 0 ^{a,A}	9 $\pm$ 0 ^{a,A}

Mean $\pm$ SEM value obtained from six replicates of three animals for each species.

* AT – after thawing; ** AMP – after mini-Percoll

The following motility parameters were analyzed by Computer-Assisted Semen Analysis system (CASA): total motility (TM), progressive motility (PM), average path velocity (VCL), straight line velocity (VSL), straightness (STR: VSL/VAP), linearity (LIN: VSL/ VCL), wobble (WOB: VAP/VCL), lateral head displacement (ALH) and beat cross frequency (BCF).

Within a column, values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$) by Fisher-LSD test. Uppercase letter is the comparison among different species (ovine, caprine, bovine) at the same time (i.e., AT or AMP) and lowercase letters is the comparison between AT and AMP, within the same species (ovine, caprine, bovine).

Table 2: Capacitation status and plasma membrane integrity of ovine, caprine and bovine frozen-thawed sperm subjected or not to heparin supplementation overtime

Species	Treatment	Time (h)	Capacitated (%)	Acrosome-reacted (%)	Non-capacitated (%)	Intact cell (%)
Ovine	Control*	1.5	52 ± 4	40 ± 4	6 ± 1	1 ± 0
		3.0	56 ± 4	39 ± 4	3 ± 1	2 ± 1
		6.0	54 ± 8	42 ± 9	2 ± 1	1 ± 0
		18.0	79 ± 1	17 ± 2	2 ± 1	0 ± 0
	Heparin**	1.5	46 ± 7	44 ± 7	8 ± 1	1 ± 0
		3.0	44 ± 8	42 ± 3	4 ± 1	1 ± 0
		6.0	66 ± 2	29 ± 3	4 ± 1	1 ± 0
		18.0	77 ± 2	20 ± 3	2 ± 1	0 ± 0
Caprine	Control*	1.5	39 ± 2	53 ± 2 ^{a,b,B}	7 ± 1	2 ± 1 ^{b,B}
		3.0	38 ± 5	58 ± 4 ^{a,b,A}	2 ± 0	4 ± 1 ^{a,A}
		6.0	41 ± 4	48 ± 6 ^{b,A}	1 ± 0	3 ± 0 ^{a,A}
		18.0	37 ± 4	59 ± 3 ^{a,A}	3 ± 1	0 ± 0 ^{b,A}
	Heparin**	1.5	29 ± 4	64 ± 5 ^{a,A}	5 ± 1	3 ± 1 ^{a,b,A}
		3.0	33 ± 3	64 ± 3 ^{a,A}	2 ± 1	2 ± 1 ^{b,B}
		6.0	41 ± 4	56 ± 4 ^{a,A}	1 ± 1	2 ± 0 ^{a,b,A}
		18.0	41 ± 9	39 ± 9 ^{b,B}	2 ± 1	0 ± 0 ^{c,A}
Bovine	Control*	1.5	38 ± 3	55 ± 3	6 ± 1	3 ± 1
		3.0	35 ± 4	60 ± 4	3 ± 1	5 ± 2
		6.0	37 ± 3	59 ± 4	3 ± 1	2 ± 0
		18.0	39 ± 3	56 ± 1	4 ± 1	0 ± 0
	Heparin**	1.5	37 ± 4	58 ± 5	4 ± 1	5 ± 1
		3.0	36 ± 4	59 ± 4	4 ± 1	4 ± 1
		6.0	45 ± 2	51 ± 3	3 ± 1	2 ± 0
		18.0	42 ± 3	52 ± 4	5 ± 1	0 ± 0

Mean ± SEM value obtained from six replicates of three animals for each species.

Within a column, values with different superscripts differ significantly (P<0.05) by Fisher-LSD test. Uppercase letters is the comparison in the same species, indicating differences

of moments between treatments and lowercase letters is the comparison in the same species, indicating difference within moments of each treatment.

* Control – sperm incubation in SP-TALP medium.

** Heparin – sperm incubation in SP-TALP medium supplemented with 5 µg/mL of heparin.

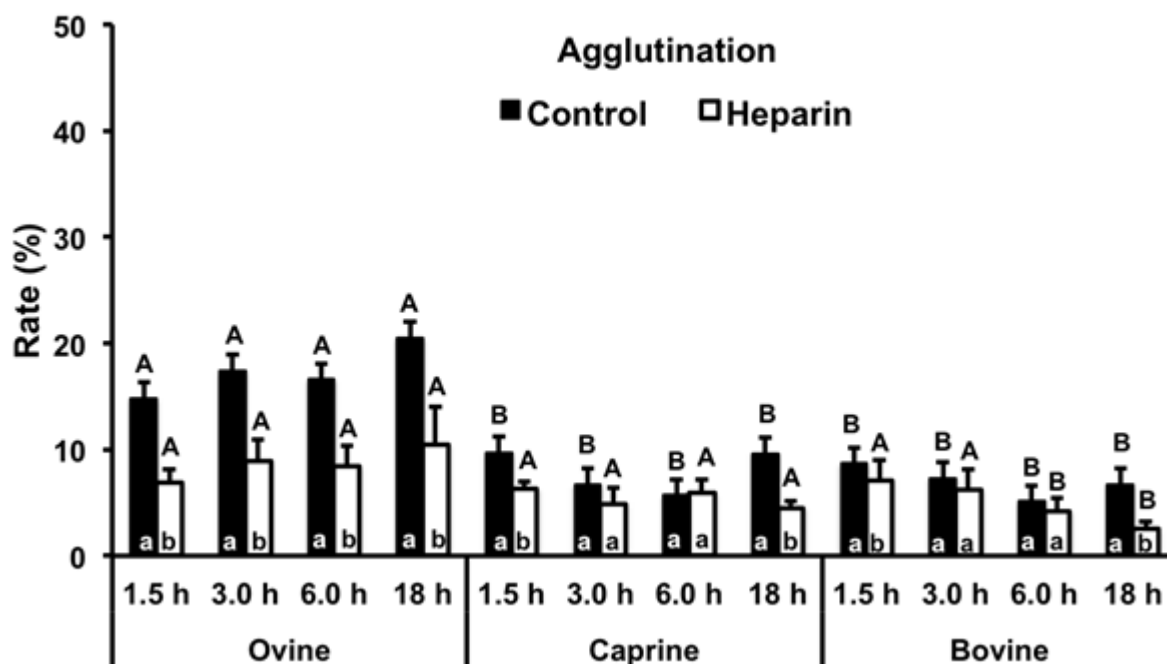


Figure 1. Agglutination rate of spermatozoa incubated in media supplemented or not with heparin. Each bar represents mean $\pm$ SEM obtained from six replicates of three animals for each species. Within a column, values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$) by paired t test. Uppercase letters is the comparison between different species and lowercase letters is the comparison between control and heparin.

Control – sperm incubation in SP-TALP medium.

Heparin – sperm incubation in SP-TALP medium supplemented with 5 $\mu\text{g/mL}$ of heparin.

References

- [1] Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983; 28: 108– 120.
- [2] Ho HC, Suarez SS. Aninositol1,4,5-trisphosphatereceptorgated intracellular Ca(2p) store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2001; 65: 1606–1615.
- [3] Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 667–668.
- [4] Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol effluxmediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 1999; 274: 3235–3242.
- [5] Cross NL. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 1367–1373.
- [6] Sreenivas D, Thomas VM, Kaladhar DSVGK, Yarla NS, Palni Samy A, Varahalarao V, Preethi R. In vitro production of sheep embryos in CR1aa medium supplemented with L-ascorbic acid: effects on morula and blastocyst development. *J Bioanal Biomed* 2013; 5: 87–193.
- [7] Parrish JJ. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 2014; 81: 67-73.
- [8] Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 1990; 42: 899-915.

- [9] Chamberland A, Fournier IV, Tardiff S, Sirard IMA, Sulhvan IR, Badey JL. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 2001; 55: 823-835.
- [10] Miah AG, Salma U, Sinha PB, Holker M, Tesfaye D, Cinar MU, Tsujii H, Schellander K. Intracellular signaling cascades induced by relaxin in the stimulation of capacitation and acrosome reaction in fresh and frozen-thawed bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2011; 125: 30-41.
- [11] Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 525–537.
- [12] Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 1997; 18: 461–468.
- [13] García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Jiménez-Rabadán P, Ramón M, Del Olmo E, Iniesta-Cuerda M, Anel-López L, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology* 2015; 84: 948–955.
- [14] Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 481–487.
- [15] Medrano A, Terrazas A, Soto R. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small Rumin Res* 2010; 89: 140-143.
- [16] Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate–dependent but apoptosis-unrelated exposure of amino

phospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002; 67: 340–350.

[17] Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21: 1–7.

[18] Rana AP, Majumder GC, Misra S, Ghosh A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1061 (2): 185-196.

[19] Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia Jr T. Cryoprotectant effects of trhalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram sêmen. *Small Rumin Res* 2010; 93: 206-209.

[20] Souza JMG, Duffard N, Bertoldo MJ, Locatelli Y, Corbin E, Fatet A, Freitas VJF, Mermillod, P. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Anim Reprod Sci* 2013;138:82.

[21] Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 353-360.

[22] Olivares CCS, Fonseca JF, Camargo LSA., Souza-Fabjan JMG, Rodrigues ALR, Brandão FZ. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rum Res* 2015; 127: 44-49.

- [23] Olivares CCS, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF, Balara MFA, Freitas VJF, Oliveira RV, Brandao FZ. Comparison of Different Sperm Selection Techniques in Ram Frozen-Thawed Sperm. *Acta Sci Vet* 2017; 45: 1431-1437.
- [24] Yang DH, McMillan AG, Standley NT, Shannon P, Xu ZZ. Extracellular calcium is involved in egg yolk-induced head-to-head agglutination of bull sperm. *Theriogenology* 2012; 78: 1476-1486.
- [25] Ribeiro Jr JI. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa: UFV, 2001; 301p.
- [26] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidation damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13: 232–241.
- [27] Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A, Kathiravan P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim Reprod Sci* 2009; 116: 244–253.
- [28] Kadirvel G, Kathiravan P, Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology* 2011; 75: 1630-1639.
- [29] Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Rodriguez-Martínez H. Relationship between sperm respond to glycosaminoglycans in vitro and non returns rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod Dom Anim* 2000; 35: 207-212.
- [30] Rosenkranz C, Holzmann A. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci* 1997; 46: 47–53.
- [31] Cesari A, Kaiser GG, Mucci N. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryos production in vitro. *Theriogenology* 2006; 66: 1185–1193.

- [32] Pérez LJ, Valcarcel A, De Las Heras MA, Moses DF, Baldassarre H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1995; 45: 1037–1046.
- [33] Poulos A, Darin-Bennett A, White IG. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol B* 1973; 46: 541-549.
- [34] Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 1977; 14: 466-470.
- [35] Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Peña AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 50–64.
- [36] Harrison RA. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52: 195-211.
- [37] Harayama H, Miyake M, Shidara O, Iwamoto E, Kato S. Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 445–50.

10. CONCLUSÕES

Os espermatozoides selecionados pelo SU apresentam maior longevidade da amostra, fato interessante para o intervalo de incubação da FIV. Por outro lado, as técnicas de Percoll e mini-Percoll parecem não prejudicar espermatozoides de carneiros a longo prazo.

A redução do volume do gradiente de Percoll utilizado e do tempo de centrifugação, bem como o aumento da sua força, promovem efeitos benéficos na qualidade da amostra.

Os eventos de criocapacitação parecem ocorrer de forma similar ao longo do tempo entre as espécies de ruminantes testadas. Possivelmente, os agentes indutores da capacitação espermática *in vitro* não são necessários para a preparação espermática de sêmen descongelado e selecionado pela técnica de mini-Percoll, em todas as espécies estudadas.

11. PERSPECTIVAS

O uso do mini-Percoll aparece como uma alternativa atrativa por minimizar o custo da etapa de preparação espermática e torná-la mais prática e eficiente, podendo ser apresentado como um método recomendado para a seleção espermática para a PIVE na espécie ovina, em opção a outras técnicas utilizadas, que por sua vez demandam mais dinheiro, complexidade e tempo.

O uso de protocolos de mini gradientes abre novas perspectivas à substituição do Percoll convencional, minimizando prejuízos à célula espermática, bem como reduzindo custos e tempo de processamento da amostra seminal de ovinos.

A prescindibilidade do agente indutor de capacitação espermática mais comumente utilizado, a heparina, na preparação espermática de sêmen das principais espécies domésticas, faz com que mais um obstáculo da técnica de PIVE seja facilitado. A compra desse reagente, que pode ser dificultada, demorada e muitas vezes cara, pode ser dispensada ao trabalhar com sêmen descongelado e

processado pelo mini-Percoll, facilitando ainda mais a vida laboral do pesquisador e dos técnicos que atuam em laboratórios de PIVE. Como já relatado antes, a associação com a técnica de mini-Percoll, que por sua vez também torna a manipulação do sêmen mais prática e barata, pode resultar em uma etapa de preparação de sêmen descongelado de ovinos, caprinos e bovinos ainda mais eficiente.

12. ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense, nº 374/2013.



Serviço Público Federal Universidade Federal Fluminense Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Comissão de Ética no Uso de Animais
Certificamos que o projeto nº 374, intitulado “Estudo de pontos estratégicos para elevação da eficiência da técnica de produção <i>in vitro</i> de embriões em ovelhas” sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão da Faculdade de Veterinária, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 12 de setembro de 2013. Este certificado é válido por três anos.
Niterói, 12 de setembro de 2013.
 _____ Coordenador da CEUA