



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TERESINHA INÊS DE ASSUMPÇÃO**

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DE ALTA QUALIDADE POR UM MÉTODO  
NANOTECNOLÓGICO DE ATIVAÇÃO MAGNÉTICA EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2022**

**Teresinha Inês de Assumpção**

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DE ALTA QUALIDADE POR UM MÉTODO  
NANOTECNOLÓGICO DE ATIVAÇÃO MAGNÉTICA EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS**

Tese apresentada à comissão especial  
de avaliação para promoção à classe de  
Professor Titular da carreira de  
magistério superior da Universidade  
Federal de Uberlândia

Uberlândia, MG

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Animais domésticos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A851s Assumpção, Teresinha Inês de, 1965-  
2022 Separação de espermatozoides de alta qualidade por um método nanotecnológico de ativação magnética em animais selvagens e domésticos [recurso eletrônico] / Teresinha Inês de Assumpção. - 2022.

Tese (Promoção para classe E - Professor Titular) - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5340>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Reprodução animal. 2. Andrologia. 3. Sêmen. 4. Animais domésticos. 5. Animais selvagens. I. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Medicina Veterinária. II. Título.

---

CDU: 636.082.4

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047

Teresinha Inês de Assumpção

**SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES DE ALTA QUALIDADE POR UM MÉTODO  
NANOTECNOLÓGICO DE ATIVAÇÃO MAGNÉTICA EM ANIMAIS SELVAGENS E DOMÉSTICOS**

Tese apresentada à comissão especial de avaliação para promoção à classe de Professor Titular da carreira de magistério superior da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 06 de outubro de 2022.

Banca Examinadora:

Dr. André Luís Quagliatto Santos

Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da FAMEV/UFU, Uberlândia, MG

Dr. Rubens Paes de Arruda

Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/ USP, Pirassununga, SP

Dra. Maria Denise Lopes

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da FMVZ/ UNESP/Botucatu, SP

Dr. Nei Moreira

Departamento de Biociências, Universidade Federal do Paraná, Palotina, PR

Aos meus pais Mário Felipe de Assumpção e Djanira Maria de Assumpção (*in memorium*) cujos valiosos ensinamentos estão sempre presentes na minha vida e me ensinaram a sempre seguir em frente por caminhos corretos por mais difícil que pareça.

A minha irmã Luzia Assumpção, exemplo de superação, pelo apoio e incentivo constantes.

**Dedico este trabalho.**

## **Agradecimentos**

A Deus por mais esta etapa cumprida e por me permitir viver mais este momento de crescimento profissional.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Faculdade de Medicina Veterinária pela contribuição no meu crescimento como docente e pesquisadora.

Ao colega Dr. Adriano Pirtouscheg que me mostrou as portas da FAMEV/UFU e é o responsável por eu fazer dela a minha casa profissional.

Ao colega Dr. André Luís Quagliatto Santos pela amizade, confiança e incentivo para superar os desafios de trabalhar com animais selvagens.

À colega de trabalho professora Dra. Renata Lançoni pelas análises estatísticas e valiosas colaborações para este trabalho.

Às colegas do Laboratório de Reprodução Animal da FAMEV/UFU, Ricarda Maria dos Santos e Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva e a técnica Graciele Freitas Cardoso pelo carinho e apoio constantes.

Ao professor Dr. Maurício Foschini, Instituto de Física da UFU, criador do protótipo para seleção espermática por ativação magnética utilizado em nossa pesquisa, pela sua amizade, apoio e parceria.

Ao professor Dr. Gustavo Guerino Macedo, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela amizade, apoio e contribuições importantes a este trabalho.

Aos colegas Dr. Neimar Correa Severo e Dr. João Pedro Brandão Zandonaide e a Central Alta Genetics (Uberaba, MG) pela cooperação nas coletas e análises do sêmen dos touros.

Ao colega Dr. José Maurício Barbanti Duarte do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos UNESP/Jaboticabal pela cooperação nas coletas e análises do sêmen dos cervídeos.

Aos colegas doutores Paula Caroline Pereira e Pedro Sanches Oquendo Junior pela cooperação nas coletas do sêmen dos garanhões.

À colega Dra. Maria Isabel Mello Martins da Universidade Estadual de Londrina e sua equipe pela cooperação nas coletas e análises do sêmen dos gatos.

À Banca avaliadora desta tese, professores Dr. André Luís Quagliatto Santos, Dr. Rubens Paes de Arruda, Dra. Maria Denise Lopes e Dr. Nei Moreira pela disponibilidade em contribuir na avaliação deste trabalho.

À Associação Brasileira de Andrologia Animal e aos nobres colegas andrologistas que a compõe pela fonte de conhecimento e aprendizado na área de andrologia animal.

À minha amiga de longos anos Eliana Vianna Costa e Silva que sempre me deu apoio profissional e é uma referência na área de andrologia animal.

À minha orientada Caroline Vieira Silva pelo carinho, apoio e valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas da FAMEV/UFU, em especial o Dr. Cirilo Antônio de Paula Lima, pelo apoio e amizade.

Às minhas irmãs Luzia e Ana Maria, meu cunhado Daniel e meus sobrinhos pelo carinho, incentivo e apoio para o meu crescimento profissional.

Ao Tico e a Chiara, meus fiéis companheiros.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)



## Resumo

A reprodução é um processo fascinante que ocorre nos mamíferos e é essencial para a sobrevivência de qualquer espécie. A fertilidade do macho requer muita atenção pois os espermatozoides têm que ser capazes de fertilizar o oócito e garantir o desenvolvimento do embrião. A qualidade dos ejaculados é muito variável tanto nas espécies domésticas quanto nas selvagens, pois este é composto por várias subpopulações espermáticas que trazem uma variedade de modificações estruturais e funcionais, sendo que algumas destas anormalidades traduzem apoptose celular e estão correlacionadas diretamente com as falhas de fertilidade *in vivo* e *in vitro*. O objetivo do estudo foi realizar a seleção de espermatozoides de alta qualidade através da separação espermática por ativação magnética (MACS/SEAM) em sêmen fresco de bovinos, cervídeos, equinos e felinos domésticos, avaliando a qualidade das células após o processo de seleção espermática. Foi coletado sêmen de animais que apresentaram alta quantidade de anormalidades espermáticas (> 30%), sendo: 1) vinte e um touros adultos da raça Nelore pela técnica de vagina artificial; 2) seis cervídeos do gênero *Mazama* pela técnica de eletroejaculação, após contenção química; 3) dez equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha pela técnica de vagina artificial e 4) dez gatos domésticos sem raça definida pela técnica de coleta farmacológica (dexmedetomidina) e cateterização uretral. As amostras analisadas foram: 1) sêmen fresco; 2) pós separação por centrifugação em gradiente de densidade (DGC); 3) pós separação por MACS ou SEAM (porção não apoptótica); 4) pós separação por MACS ou SEAM (porção apoptótica) e 5) pós separação por MACS ou SEAM seguida da DGC. Foram realizadas as análises de motilidade (método CASA ou microscopia óptica), concentração (câmara de Neubauer), morfologia do sêmen (contraste de fase) e teste de integridade de membrana celular com coloração eosina/ nigrosina (supravital). Na separação espermática por DGC utilizou-se 20 milhões de espermatozoides em gradiente de duas camadas de 400 µl cada de Percoll a 90% e 45%, que após centrifugação a 900 G por 5 minutos, o *pellet* foi diluído em HEPES. A separação dos espermatozoides por MACS ou SEAM utilizou 10 milhões de espermatozoides diluídos em 1,5 ml de HEPES, seguido de centrifugação a 300 G por 10 min. O *pellet* foi ressuscitado em 150 µl de HEPES e adicionado 20 µl de nanopartículas ligadas à anexina V, que após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se a filtração na coluna de separação magnética MiniMACS™ ou SEAM. A fração não apoptótica foi coletada em tubo de 2 mL e a fração apoptótica ligada às microesferas foi coletada removendo a coluna do ímã e adicionando 300 µl do HEPES. A separação espermática por MACS seguida por DGC foi uma conjunção das duas metodologias. A avaliação da qualidade da membrana celular e potencial mitocondrial pós seleção foram feitas utilizando sondas fluorescentes FITC/IP e JC-1, respectivamente, em citometria de fluxo. Em bovinos a combinação dos dois métodos de processamento de espermatozoides (DGC e MACS) foi significativamente mais efetiva na produção de amostras de espermatozoides de alta qualidade que os mesmos separadamente (redução de mais de 70% nas anormalidades). A subpopulação de espermatozoides não apoptóticos teve qualidade espermática morfolologicamente superior em comparação com a fração apoptótica, assim como no número de células com integridade de membrana e no potencial mitocondrial. Em cervídeos, equinos e gatos domésticos, verificamos que as técnicas de DGC e SEAM foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas, retirando principalmente defeitos de cauda e cabeça, sendo que a subpopulação de espermatozoides não apoptóticos teve qualidade espermática morfolologicamente superior em comparação com a fração apoptótica, o mesmo observado para o número de células com membranas íntegras.

Nestas três espécies, a motilidade das amostras pós SEAM foi extremamente baixa talvez devido a maior sensibilidade da célula espermática nestas espécies, ao número de procedimentos a que a célula foi submetida e o tempo grande dispendido nas análises. Estes achados sugerem que este método nanotecnológico é eficiente na produção de amostras de sêmen de alta qualidade para procedimentos de reprodução assistida tanto em animais domésticos quanto selvagem, mas ainda são necessários mais estudos para melhor entendimento das características particulares das células espermáticas de cada espécie, a fim de melhorar os resultados da técnica.

**Palavras-chave:** Reprodução animal, andrologia, fertilidade, sêmen, animais domésticos, cervídeos.

## Abstract

Reproduction is a fascinating process that occurs in mammals and it is essential for the survival of any species. Male fertility requires a lot of attention because sperm has to be able to fertilize oocyte and ensure the embryo's development. The ejaculates' quality is highly variable in both domestic and wild species, since it is composed of several spermatid subpopulations, bringing a variety of structural and functional modifications, and some of those abnormalities translate cellular apoptosis and are directly correlated with fertility failures *in vivo* and *in vitro*. This study aimed at improving selection of high-quality sperm through sperm separation by magnetic activation in fresh semen of cattle, deer, horses, and domestic cats by evaluating the cells' quality after the sperm selection process. For this, semen was collected from animals with a high number of spermatid abnormalities (> 30%), being: 1) Nelore bulls (n=21), using the artificial vagina restraint; 2) six *Mazama* deer, using the electroejaculation technique and after chemical containment; 3) ten horses Mangalarga and American Quarter horse, using the artificial vagina technique, and 4) ten domestic cats without defined breed, using pharmacological ejaculation technique (dexmedetomidine) and urethral catheterization. Semen was analyzed in five statuses: 1) fresh semen; 2) post separation by density gradient centrifugation (DGC); 3) post separation by Magnetic-activated cell sorting (MACS) or Magnetic-activated sperm sorting (MASS) (non-apoptotic part); 4) post separation by MACS or MASS (apoptotic part) and 5) post separation by MACS followed by DGC. Motility was measured using either Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) or optical microscopy, concentration by Neubauer chamber, sperm morphology by phase contrast, and supravital test was completed with eosin/nigrosin staining. In the sperm separation by DGC,  $20 \times 10^6$  cells were used in a gradient of two layers of 400  $\mu$ l each of Percoll at 90% and 45%; after centrifugation at 900 G for 5 minutes the pellet was diluted in HEPES. Sperm separation by MACS or MASS used  $10 \times 10^6$  cells diluted in 1.5 ml of HEPES, followed by centrifugation at 300 G for 10 min. The pellet was resuspended in 150  $\mu$ l HEPES and 20  $\mu$ l of nanoparticles bound to annexin V were added; after incubation for 15 minutes at room temperature, filtration was carried out in the MiniMacs™ or MASS. The non-apoptotic fraction was collected in a 2 mL tube and the apoptotic fraction connected to the microspheres was collected by removing the magnet column and adding 300  $\mu$ l of HEPES. The spermatid separation by MACS followed by DGC was a combination of the two methodologies. The evaluation of cell membrane quality and mitochondrial potential after selection was made using fluorescent probes with FITC/IP and JC-1, respectively, in flow cytometry. In cattle, the combination of the two sperm processing methods (DGC and MACS) was significantly more effective in the production of high-quality sperm samples than using them separately (70% more reduction in abnormalities). The subpopulation of non-apoptotic spermatozoa had morphologically superior sperm quality compared to the apoptotic fraction, as well as higher number of cells with intact membrane and better mitochondrial potential. In cervids, horses, and domestic cats, we found that DGC and MASS techniques were efficient in reducing sperm abnormalities, mainly removing tail and head defects, and the subpopulation of non-apoptotic sperm had morphologically superior sperm quality compared to the apoptotic fraction; the same was observed for the number of cells with intact membrane. In those three species, the motility of the post MASS samples was extremely low, perhaps due to the greater sensitivity of the spermatid cell in the species, the number of procedures to which the cell was submitted, and the large time spent in the analyses. Those findings suggest that that nanotechnological method is efficient in the production of high-quality semen samples for assisted reproduction procedures in both

domestic and wild animals, but further studies are still needed to better understand the particular characteristics of the spermatid cells of each species, in order to improve the results of the technique.

**Keywords:** Animal reproduction, andrology, fertility, semen, domestic animals, cervids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Descrição	Página
Figura 1	Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais verificadas em espermatozoides com alterações morfológicas (adaptado de Pukazhenthil et al., 2006).	24
Figura 2	Coleta de sêmen dos touros pela técnica de vagina artificial na Central Alta Genetics, Uberaba, MG.	39
Figura 3	Coleta de sêmen dos cervídeos pela técnica de eletroejaculação sob anestesia geral no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), UNESP, Jaboticabal, SP.	39
Figura 4	Coleta de sêmen dos equinos pela técnica de vagina artificial, Uberlândia, MG.	40
Figura 5	Coleta de sêmen dos gatos pela técnica de coleta farmacológica com cateterização uretral no Laboratório de Reprodução Animal da UEL, Londrina, PR.	40
Figura 6	Análises sequenciais realizadas nas amostras de sêmen. Etapa NAP – DGC e citometria só foi realizada em bovinos. Análise de motilidade feita no CASA em bovinos e gatos e em microscopia óptica nos cervídeos e equinos.	41
Figura 7	Aparelho CASA utilizado na análise de motilidade espermática de bovinos e gatos.	41
Figura 8	Esfregaço de sêmen com corante Botuvital® para análise de integridade da membrana espermática. Fonte: www.botupharma.com.br.	42
Figura 9	Citômetro de fluxo utilizado na análise de integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial de bovinos.	43
Figura 10	Centrifugação em densidade de gradiente com Percoll (mini Percoll).	43
Figura 11	Ligação da fosfotidilserina com anexina V e as nanopartículas nos espermatozoides. Adaptado de Berteli (2017).	44
Figura 12	Separação de espermatozoides apoptóticos utilizando MACS. (A) A coluna que contém esferas de aço é colocada dentro de um ímã externo. (B) As células não marcadas fluem através da coluna a ser coletada. (C) As células marcadas imunomagneticamente permanecem ligadas as esferas magnetizadas e são retidas dentro da coluna. Adaptado de Rawe et al. (2009) e Said e Land (2011).	44
Figura 13	Separação de espermatozoides utilizando MACS. Etapas de marcação e separação magnética e eluição das células apoptóticas da coluna. Adaptado de Miltenyi Biotec.	45
Figura 14	Coluna de separação magnética MiniMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha) utilizada na separação de espermatozoides em bovinos. A - ímã magnético, B - coluna de filtração	45
Figura 15	Coluna de separação magnética SEAM (protótipo provisório) desenvolvido para seleção de espermatozoides, à direita detalhe da coluna de filtração. A) seringa para controle de fluxo, B) coluna de filtração com controle térmico, C) ímã magnético, D) frasco de coleta do	46

	filtrado com controle térmico, E) <i>Display</i> para controle de fluxo de filtração. Protótipo utilizado nas filtrações de cervídeos, equinos e gatos.	
Figura 16	Defeitos morfológicos maiores, menores e totais verificadas nos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT, NAP-DGC em touros da raça Nelore. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	47
Figura 17	Total de membranas íntegras (“vivos”), integridade de membrana (sondas fluorescentes) e potencial mitocondrial das células espermáticas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT, NAP-DGC em touros da raça Nelore. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	51
Figura 18	Análise da integridade de membrana pela citometria de fluxo em espermatozoides bovinos frescos. Q1: espermatozoides com membrana lesada; Q2: espermatozoides moribundos (lentos); Q3: não representada; Q4: espermatozoides com membrana íntegra.	51
Figura 19	Fotomicrografia de espermatozoides bovinos corados com corante eosina-nigrosina (teste supravital). Célula corada está com membrana lesada e não corada está com membrana íntegra. Ampliação de 1000 X.	52
Figura 20	Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas dos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em cervídeos do gênero <i>Mazama</i> . Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	53
Figura 21	Total de células espermáticas com membranas íntegras (“vivos”) pelo teste supravital nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em três espécies de cervídeos do gênero <i>Mazama</i> . Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	56
Figura 22	Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas dos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	58
Figura 23	Total de células espermáticas com membrana íntegra (“vivos”) nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	61
Figura 24	Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas nos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	63
Figura 25	Total de células com membrana íntegra (“vivos”) nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos. Letras diferentes indicam diferença significativa, $p < 0,05$ (média $\pm$ EPM).	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
Tabela 1	Média de motilidade total e progressiva do sêmen observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT e NAP-DGC em touros da raça Nelore (valores em porcentagem, média $\pm$ EPM).	48
Tabela 2	Média de anormalidades morfológicas dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT e NAP-DGC em touros da raça Nelore (valores em porcentagem, média $\pm$ EPM).	48
Tabela 3	Média de anormalidades dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em três espécies de cervídeos (valores em porcentagem, média $\pm$ EPM).	55
Tabela 4	Média de anormalidades dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos (valores em porcentagem, média $\pm$ EPM).	60
Tabela 5	Média de anormalidades individuais dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos (valores em porcentagem, média $\pm$ EPM).	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANX V	Anexina V
APT	Apoptótica
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
DGC	Centrifugação por densidade de gradiente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	Isoticionato de fluoresceína
FAMEV	Faculdade de Medicina Veterinária
FS	Fosfatidilserina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IP	Iodeto de propídio
JC 1	Iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
NAP	Não apoptótica
NUPECCE	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEAM	Separação espermática por ativação magnética
SYBR-14	SYBR-14 - Sonda fluorescente de ácido nucleico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UNESP	Universidade Estadual Paulista



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b> .....	20
2.1. Fertilidade nos machos .....	20
2.2. Anormalidades espermáticas .....	21
2.3. Parâmetros seminais .....	24
2.4. Análise de sêmen .....	25
2.5. Apoptose nos espermatozoides .....	28
2.6. Separação espermática por ativação magnética .....	29
2.7. O porquê deste estudo .....	31
2.8. A escolha das espécies .....	32
2.8.1. Importância dos bovinos na pecuária nacional e o grande número de pesquisas na espécie .....	32
2.8.2. Os cervídeos e sua importância na biodiversidade .....	33
2.8.3. A importância dos equinos nas criações brasileiras .....	34
2.8.4. Os gatos domésticos e seu sêmen com alto grau de anormalidades espermáticas .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	36
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1. Local de execução .....	37
4.2. Os animais .....	37
4.3. Coleta, preparação e análise das amostras .....	38
4.3.1. Coleta do sêmen .....	38
4.3.2. Fluxograma das análises .....	41
4.3.3. Análises física e morfológica do sêmen .....	41
4.3.4. Análises de membrana plasmática e potencial mitocondrial .....	42
4.3.5. Centrifugação por gradiente de densidade .....	43
4.3.6. Separação celular por ativação magnética .....	44
4.3.7. MACS – DGC .....	46
4.3.8. Análise estatística .....	46
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47

5.1. Bovinos .....	47
5.2. Cervídeos .....	53
5.3. Equinos .....	57
5.4. Gatos domésticos .....	62
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> - Artigos publicados .....	81
<b>ANEXO 1</b> - Magnetic-activated cell sorting improves high quality spermatozoa in bovine semen.....	82
<b>ANEXO 2</b> - Selection of High-quality Sperms by the Nanotechnological Method of Magnetic Activation in Brazilian Cervids .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

A reprodução é um dos fatores de maior importância na sobrevivência das espécies e na eficiência e rentabilidade dos sistemas produtivos. A partir de 1780, quando Spallanzani demonstrou que uma prole resultava da fusão de um espermatozoide e um oócito, muitos estudos foram produzidos procurando explicar a fertilidade dos animais que está ligada, nos machos, a sua capacidade de produzir e liberar espermatozoides fisiologicamente maduros e aptos à fecundação (Petrunkina et al., 2007; Amann et al., 2018). O espermatozoide é uma célula extremamente complexa e seu potencial de fertilização pode ser comprometido quando houver qualquer perturbação em suas características bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas (Jeyendran et al., 2019).

Grande evolução nos conhecimentos ocorreu nos últimos 50 anos procurando esclarecer os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares que controlam a fertilidade nas diversas espécies (Flowers, 2013; Smith et al., 2018). Com o advento da reprodução assistida há um quarto de século, um grau maior de exigência para o isolamento de espermatozoides com alta capacidade fecundante estimulou a pesquisa andrológica para compreender melhor a fisiologia das células espermáticas e desenvolver técnicas mais sofisticadas para separar os espermatozoides funcionais, com morfologia normal e capazes de realizar a fertilização de oócitos (Henkel e Schill, 2003; Danis e Samplaski, 2019).

Uma série de testes laboratoriais tem sido desenvolvida para monitorar as características estruturais e funcionais do espermatozoide, pois os parâmetros seminais padrões como motilidade, morfologia e concentração espermática não são suficientes, não só para prever a fertilidade, mas também para identificar indivíduos subférteis (Gadea et al., 2004). A escolha de métodos com repetibilidade, rápidos e sensíveis de avaliação do sêmen é de preocupação crescente, sendo que algumas técnicas objetivas foram desenvolvidas com o uso de sistemas computadorizados e *softwares* específicos (Petrunkina et al., 2007).

Entre as técnicas disponíveis e emergentes que visam melhorar a qualidade do *pool* de espermatozoides podemos citar o CASA (Computer Assisted Spem Analysis), análise de morfometria computadorizada, sondas fluorescentes para análise da estrutura celular e de sua funcionalidade (leituras em citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência), avaliação da capacidade de degradação das espécies reativas de oxigênio, centrifugação em gradiente de densidade, integridade do DNA, separação celular por ativação magnética, entre outras (Celeghini et al., 2007; Rawe et al., 2009; Henkell, 2012; Bergstein et al., 2014; Vaughan e Sakkas, 2019; Waberski et al., 2021).

Assim, o desenvolvimento de uma técnica de seleção espermática, rápida, sensível e que seja eficiente em isolar células com morfologia e estrutura normais e com elevada capacidade de fecundação permitirá a produção de amostras de sêmen de alta qualidade e com alta chance de fertilização do oócito, tanto em animais domésticos quanto nos selvagens, para uso em programas de reprodução assistida, o que contribuirá para o aumento da eficiência reprodutiva *in vivo* e *in vitro*.

## **2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

### **2.1. FERTILIDADE NOS MACHOS**

A reprodução e o desenvolvimento são processos fascinantes que ocorrem nos mamíferos e apresentam grandes diferenças entre os animais. O crescimento bem-sucedido das espécies depende da fertilidade do macho e da capacidade de seus espermatozoides de fertilizar o oócito e garantir o desenvolvimento inicial do embrião. Grandes conhecimentos foram gerados sobre as especificidades da estrutura e a função do espermatozoide, porém seus papéis cruciais na fertilidade permanecem em parte desconhecidos (Thompson et al., 2018).

A reprodução é essencial para a sobrevivência de qualquer espécie. A fertilidade do macho tem recebido muita atenção nas criações domésticas onde os benefícios econômicos dependem da melhoria da produtividade, em estudos de infertilidade humana a fim de compreender quais características do ejaculado explicam falhas na fertilização assistida e em espécies selvagens na manutenção de populações com boa variabilidade genética (Gomendio et al., 2007, Holt et al., 2014). O estudo da fisiologia reprodutiva progrediu desde o estudo do animal como o todo até o nível molecular em um período surpreendentemente curto com um grande volume de informações sobre esse assunto. Nos últimos 50 anos, houve uma grande evolução nos conhecimentos sobre mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares, controle da reprodução e da reprodução assistida nas diversas espécies de animais domésticos e selvagens (Smith et al., 2018).

Os machos contribuem significativamente para as falhas de fertilidade, sendo que isso parece ser devido ao uso de indivíduos subférteis. A avaliação da fertilidade de um macho é baseada nas características de seu sêmen, sendo que se a qualidade deste for ruim, com espermatozoides anormais e com níveis variáveis de fertilidade, as células se tornam incapazes de fertilizar o oócito levando a redução da fertilidade do macho (Flowers, 2013). A qualidade do espermatozoide é um dos fatores que determina o sucesso das técnicas de reprodução *in vivo* e *in vitro*, sendo que a reprodução assistida tem se transformado no tratamento de escolha em

casos de infertilidade no macho e fêmea, porém as taxas de sucesso ainda permanecem abaixo do ideal (Rawe et al., 2009; Odhiambo et al., 2014).

A estimativa da fertilidade é limitada por vários fatores como o tipo de célula, estratégias de deposição de espermatozoide, registros de fertilidade, etc., incluindo o fato de que o ejaculado é composto por uma população diversificada de espermatozoides. Esta heterogeneidade celular se reflete não apenas nas diferenças na integridade dos atributos necessários para a fertilização, como motilidade ou morfologia, mas também na capacidade dos espermatozoides de permanecerem férteis ao longo do tempo, para suportar as etapas de seleção e as respostas a fatores exógenos (Rodriguez-Martinez, 2007).

A concentração de espermatozoides no ejaculado, motilidade espermática, morfologia espermática, status acrossomal e a competência funcional dos espermatozoides são algumas das características do sêmen conhecidas por influenciar a fertilidade masculina, porém estes parâmetros são insuficientes, não só para prever a real fertilidade do animal, mas também para identificar indivíduos subférteis (Gomendio et al, 2007; Petrunkina et al, 2007).

## **2.2. ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS**

A qualidade do ejaculado é muito variável tanto nas espécies domésticas quanto nas selvagens e uma variedade de modificações estruturais estão presentes em todas as espécies, o que tem grande relação com sua fertilidade, pois qualquer fator capaz de alterar a espermatogênese resulta na produção de espermatozoides com alterações morfológicas (Aitken et al., 2011; Arruda et al., 2015). Uma grande diversidade na morfologia da cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide são encontrados em todas as espécies, com diferenças marcantes em termos de tamanho total, forma e número de espermatozoides produzidos. A origem dessas variações ou diversidade nos espermatozoides pode estar associada ao aparelho reprodutor feminino, competição espermática, tamanho testicular, dimensão e número dos espermatozoides, entre outras (Prakash et al., 2014). O tipo de alteração morfológica observado no ejaculado quase sempre indica sua origem e pode ocorrer durante as diferentes fases de vida do espermatozoide, como na espermatogênese, transporte e armazenamento epididimário, retenção espermática nas ampolas, ejaculação ou após a ejaculação (Arruda et al., 2015).

A principal razão para a variabilidade no sêmen das espécies é que cada ejaculado não é uma suspensão homogênea de espermatozoides e sim uma mistura heterogênea de várias subpopulações, produtos de diferentes ondas espermatogênicas que amadureceram ao longo dos epidídimos e são armazenados em suas caudas como diferentes grupos de células. Estas

subpopulações celulares mostram respostas diferentes a fatores fisiológicos ou estímulos biotecnológicos pois não possuem a mesma morfologia, não tem os mesmos padrões de motilidade, não têm o mesmo material genômico qualitativo ou quantitativo, não exibem a mesma capacidade de interagir com outras células e nem têm a mesma capacidade fertilizante (Rodriguez-Martinez, 2007, Peña, 2015; Amann et al., 2018).

As alterações morfológicas podem ser usualmente identificadas durante a avaliação clínica de rotina da qualidade do sêmen e sempre se relacionam a animais subfêrteis ou infêrteis dependendo do tipo ou frequência das anormalidades morfológicas (Kaya et al., 2014). Além da morfologia espermática, a motilidade das células espermáticas também tem uma relação positiva com sucesso da fertilização em condições competitivas e não competitivas, sendo que é altamente provável que a viabilidade espermática influencia diretamente no sucesso da fertilização (Gomendio et al., 2007; Simmons e Fitzpatrick, 2012). Para uma ótima fertilização alguns eventos moleculares ligados à membrana espermática são importantes como sua maturação no epidídimo, alterações na dinâmica das proteínas de membrana e lipídios durante a capacitação espermática, excitose do acrossoma e ligação/ fusão de pró-núcleos masculino e feminino (Tavalee et al., 2014).

Estudos sobre características espermáticas de mamíferos selvagens também demonstraram diferenças consideráveis na viabilidade, função e taxa de sucesso na fertilização entre as espécies. Pesquisas intensivas são necessárias para o desenvolvimento de métodos confiáveis que enfatizem as variações específicas nas espécies relativas à fisiologia dos espermatozoides, o que nem sempre é simples devido à baixa disponibilidade de acesso aos gametas de algumas espécies e a necessidade de minimizar o estresse de manuseio dos animais (Fickel et al., 2007).

Segundo Saacke (2008), as falhas de fertilização e embriogênese normalmente tem uma grande contribuição de origem seminal, ou seja, dependem das características do espermatozoide que podem ser compensáveis ou não compensáveis. Os defeitos compensáveis são aqueles que comprometem a chegada do espermatozoide ao oócito ou a penetração na sua zona pelúcida (defeitos de peça intermediária, cauda e acrossoma), fatores funcionais ou alterações moleculares e a capacidade de sofrer capacitação e iniciar uma reação acrossômica, sendo que neste caso a fertilidade pode ser melhorada através da inseminação ou aumento do número de espermatozoides depositados na fêmea. Já nos casos em que a fertilidade do macho não responde ao aumento dos espermatozoides, estes são defeitos não compensáveis, eles podem iniciar a fertilização, mas comprometem a qualidade do embrião e a manutenção da prenhez, com a maioria das falhas ocorrendo antes do reconhecimento da gestação e estão normalmente associados à membrana plasmática e integridade do DNA (Saacke, 2008; Flowers, 2013; Garcia-Deragon et al., 2019).

As alterações morfológicas na cabeça do espermatozoide incluem: anormalidades do acrossoma que ocorrem devido a prolongados períodos de repouso sexual, morte celular e fixação para avaliação morfológica, podendo também ter origem genética. Outros defeitos acrossômicos: acrossomos destacados ou totalmente perdidos, assimétrico, espessado, edemaciados, com vacúolos, com gotas presas à membrana acrossômica, cavidades preenchidas com material amorfo entre as duas membranas (*knobbed*). Defeitos na própria cabeça em seu tamanho e forma do núcleo ou condensação da cromatina como cabeças gigantes ou pequena, cabeças deformadas, cabeças duplas e cabeça redonda. Defeitos na condensação da cromatina aparecem como pequenos ou grandes vacúolos e podem ocorrer devido a infecções seminais, varicocele, febre e tumores testiculares, podendo ser ainda sinal de imaturidade e levam a uma drástica redução na fertilização do oócito ou alteração no desenvolvimento inicial (Pesch e Bergmann, 2006).

No pescoço e peça intermediária temos as seguintes alterações morfológicas: Destruição da região do pescoço, falta da bainha de mitocôndria, alargamento da bainha fibrosa da peça intermediária, gotas citoplasmáticas na região do pescoço e na peça intermediária são sinais de falha de maturação. Perda de microtúbulos e uma desorganização de peça intermediária semelhante ao defeito "*dag*", dobramento e fratura da parte distal da peça intermediária, malformação da bainha mitocondrial e o defeito "*corkscrew*" (distribuição irregular de mitocôndrias semelhantes a um saca-rolhas) (Pesch e Bergmann, 2006).

Já as alterações morfológicas principais na cauda são: Padrão tubular anormal leva à imobilidade e incapacidade de alcançar o óvulo levando a sub e infertilidade dos espermatozoides. Caudas enroladas, quebradas, duplas, "*tail stump*" (ausência da peça intermediária e cauda), desorganização da bainha fibrosa e distorções na estrutura dos microtúbulos estão associados à esterilidade (Pesch e Bergmann, 2006).

Uma classificação para as alterações anatômicas do espermatozoide foi criada por Blom em 1972 e é utilizada até hoje, onde são consideradas duas classes: Defeitos maiores e Defeitos menores, sendo os defeitos maiores mais relacionados com infertilidade e doenças testiculares ou epididimárias, enquanto os defeitos menores são referentes a anomalias de menor impacto na fertilidade. Para a interpretação do resultado do espermograma, devem ser considerados os percentuais de defeitos maiores, menores e defeitos totais (Blom, 1973). Ainda devem ser incluídas as presenças de medusas, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, neutrófilos e bactérias (Arruda et al., 2015).

As anormalidades dos espermatozoides são as seguintes: Defeitos maiores: subdesenvolvido, cabeça isolada patológica, contorno anormal, estreita na base, piriforme, pequeno anormal, formas teratológicas, *pouch formation*, acrossoma, gota citoplasmática

proximal, *corckscrew*, pseudogota, outros defeitos de peça intermediária e cauda fortemente dobrada ou enrolada. Os defeitos menores: cabeça delgada, gigante, curtos, longos, pequeno normal, abaxial, retroaxial, oblíquo, cabeça isolada normal, cauda dobrada, gota citoplasmática distal, cauda enrolada e acrossoma desprendido (CBRA, 2013).

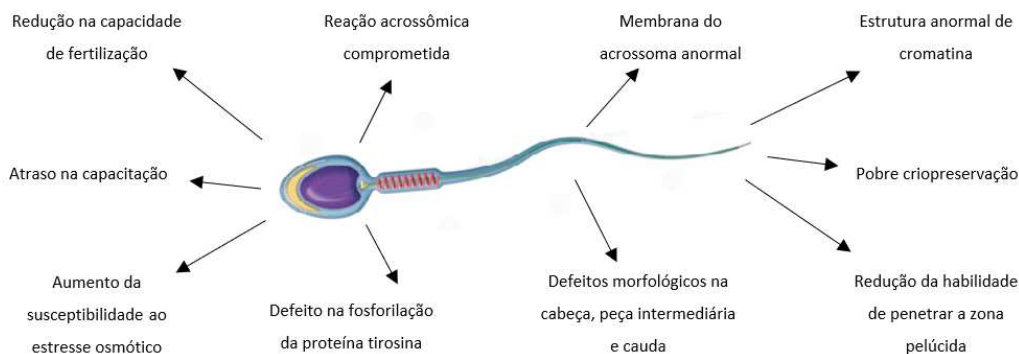


Figura 1 – Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais verificadas em espermatozoides com alterações morfológicas (adaptado de Pukazhenthil et al., 2006).

### 2.3. PARÂMETROS SEMINAIS

A avaliação laboratorial da qualidade do espermatozoide é um procedimento importante em muitos aspectos da reprodução sendo necessário o uso de métodos reprodutíveis, rápidos e sensíveis para monitorar aspectos cruciais da função da célula espermática (Gadea et al., 2004). A avaliação convencional do sêmen parece ser suficiente para revelar o grau de “normalidade” dos testículos (número de espermatozoides, morfologia) e os epidídimos (morfologia espermática, motilidade).

A avaliação da motilidade espermática é normalmente um dos primeiros passos do espermograma e fornece informações sobre a provável fertilidade do animal e/ou avalia a viabilidade de uma amostra de sêmen. A motilidade deve ser considerada de três maneiras, primeiro a porcentagem de células mostrando movimento, em segundo lugar a característica do próprio movimento e, em terceiro lugar, a velocidade do movimento (Peña, 2015).

O ejaculado deve conter um certo número de espermatozoides móveis e morfologicamente “normais” para permitir que a quantidade mínima de espermatozoides atinja o oviduto e possam participar do processo de fertilização e sustentar o desenvolvimento do embrião (Flowers, 2013; Kaya et al., 2014; Rodriguez-Martinez, 2014).

Para a análise e a interpretação do espermograma, há valores de referência para as diversas espécies domésticas, com padrões para as diferentes características como motilidade, vigor, concentração, morfologia, etc. Esses valores de referência são normatizados, para animais



domésticos, no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e referenciados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal e estão disponíveis na publicação “Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal” (CBRA, 2013).

#### **2.4. ANÁLISE DE SÊMEN**

Diversas pesquisas nos últimos anos desenvolveram técnicas laboratoriais para ampliar a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides, sendo que as análises de motilidade e de anormalidades espermáticas são essenciais para o exame do sêmen, pois revelam a qualidade das células e os diferentes defeitos morfológicos (Arruda et al., 2015).

A motilidade espermática é um dos parâmetros de qualidade espermática mais utilizado e está bem estabelecida em animais para avaliar a qualidade do sêmen, sendo também um parâmetro fundamental usado pelos andrologistas na ciência básica e aplicada (Horst, 2020). Os sistemas de análise de motilidade espermática auxiliados por computador (*CASA – Computer Assisted Sperm Analysis*) foram desenvolvidos para reduzir a subjetividade da avaliação da motilidade espermática e tiveram ampla aceitação científica e prática, pois a avaliação da cinética espermática tem grande relevância no potencial de fertilidade das células espermáticas (Waberski et al., 2021).

O CASA produz um filme com o trajeto de cada espermatozoide que é obtido por meio de marcações de pontos na cabeça da célula, sendo processado através de um sistema computadorizado e automático de captura e que analisa sucessivas fotos das células revelando informações mais precisas e acuradas do movimento de cada espermatozoide. O computador é programado com uma micrometragem mínima e outra máxima do espermatozoide para cada espécie animal, sendo que outros objetos que tiverem tamanhos abaixo do mínimo são considerados parte do fundo (Amann e Waberski, 2014; Bergstein et al., 2014).

O CASA é amplamente aceito pela comunidade de reprodução animal em unidades de produção e para pesquisas sobre biologia básica do espermatozoide. Porém para obter todo o potencial do CASA e gerar dados fidedignos deve-se atentar para duas coisas: 1) Muitos fatores podem influenciar a exatidão e a precisão dos valores gerados, assim deve-se regularmente validar todas as configurações de *hardware* e *software* com suas amostras e técnicos do laboratório; 2) Deve-se determinar limites de subgrupo apropriados para cada medida de movimento do espermatozoide em amostras típicas de cada espécie animal e usar esses limites para visualizar e resumir subpopulações de espermatozoides em cada amostra analisada, não confiar em médias ou medianas (Amann e Waberski, 2014). Apesar dos avanços na técnica,

ainda há grande necessidade de padronização em muitas espécies, e os inúmeros fatores que afetam os resultados tornam difícil fornecer critérios universalmente aceitos para classificar amostras de sêmen (Sutovsky et al., 2015, Yániz et al., 2018, Nunes, 2021).

A observação das células espermáticas e suas alterações morfológicas é feita através da microscopia óptica analisando lâminas de esfregaços de sêmen corados como, por exemplo, pelo vermelho-congo (método Cerovsky), ou através de preparação úmida analisada em microscopia de contraste de fase ou de interferência de fase. São avaliadas 200 células, contando-se células normais e computando apenas um defeito por célula anormal. Caso sejam observados dois ou mais defeitos na mesma célula, deve ser registrado em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, se observados dois defeitos de mesma classificação, registra-se apenas o de maior frequência e verificação da porcentagem de defeitos, classificando-os em maiores e menores (Arruda et al., 2015; Moraes e Souza, 2019).

Além da integridade morfológica do espermatozoide, a qualidade do sêmen depende também da integridade e função de estruturas como a membrana plasmática, sua cauda, potencial mitocondrial, acrossoma e cromatina (DNA espermático), produção de espécies reativas de oxigênio, integridade do citoesqueleto celular. Durante anos, a avaliação da integridade de membranas dos espermatozoides foi baseada em colorações vitais usando microscopia de luz, o que permitia também o exame da sua morfologia. Mais recentemente, várias sondas fluorescentes foram introduzidas para determinar a integridade de membranas espermáticas e as diferentes estruturas, com leituras feitas em citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência (Celeghini et al., 2007; Bergstein et al., 2014, Daub et al., 2016; Komsky-Elbaz e Roth, 2018).

A integridade da membrana espermática é essencial na viabilidade seminal, pois garante a sua homeostase celular mantendo a motilidade, sendo esse requisito essencial para manter a capacidade de fecundação da célula espermática. Entre as sondas fluorescentes utilizadas para avaliar a integridade de membrana temos o iodeto de propídio (IP) que só atravessa a membrana plasmática lesada, assim como o Hoechst 3358, SYBR- 14, entre outros (Celeghini et al., 2007; Bergstein et al., 2014). Já a análise da integridade acrossomal pode ser realizada também com sondas como a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), que possui especificidade a glicoproteínas na membrana acrossomal e quando conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) marca o acrossoma lesado (Celeghini et al., 2007, Bergstein et al., 2014; Komsky-Elbaz e Roth, 2018). As mitocôndrias são responsáveis pela manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho, sendo que sondas fluorescentes como o iodeto de 5, 5', 6, 6' - tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) têm sido utilizadas para coloração diferencial de

mitocôndrias com alto ou baixo potencial (Celeghini et al., 2007, Bergstein et al., 2014; Komsky-Elbaz e Roth, 2018).

As sondas fluorescentes podem ser utilizadas separadamente para avaliar uma estrutura em particular ou em associações para a avaliação simultânea das membranas citoplasmática e acrossomal e a função mitocondrial. O desenvolvimento de técnicas de alta repetibilidade que fornecem resultados que refletem o estado real de cada estrutura são importantes para detectar sua integridade estrutural e sua funcionalidade e, indiretamente, a sua fertilidade (Celeghini et al., 2007).

A citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa na andrologia, permitindo a avaliação rápida e simultânea de múltiplos compartimentos espermáticos e analisa milhares de espermatozoides em poucos segundos (Peña, 2015). Ela permite contar, examinar e classificar células em uma solução aquosa, onde as células passarão individualmente através de um feixe de luz ou laser que excita as sondas fluorescentes ligadas às células e capta a frequência da luz. O equipamento converte essa frequência em sinais elétricos, que são quantificados por *softwares* específicos. Os dados de cada espermatozoide são coletados e analisados para fornecer informações sobre subpopulações na amostra, sendo exibidos graficamente em histogramas. Esta técnica é altamente precisa, sensível, rápida e analisa um número estatisticamente relevante de células, avaliando a funcionalidade das membranas quando marcadas com sondas fluorescentes (Cordelli et al., 2005, Gillan et al., 2005; Bergstein et al., 2014; Peña, 2015).

A integridade de membrana espermática pode ainda ser analisada pelo teste supravital onde uma combinação de eosina/ nigrosina é utilizada para avaliar a integridade da membrana, uma vez que a eosina penetra na célula quando lesada, corando o interior do núcleo e possibilitando identificar os espermatozoides mortos (Faezah et al., 2012). Esta técnica é bem conhecida e amplamente utilizada na análise de células espermáticas, pois utiliza o conhecimento de que a eosina cora células com membranas celulares danificadas e nigrosina cora o fundo, porém vale lembrar que a confiabilidade deste teste laboratorial clássico para a viabilidade do espermatozoide pode ser questionável pois avalia uma pequena população de espermatozoides (até 200 células por amostra) e a precisão da avaliação depende da experiência e habilidade do avaliador (Klimowicz-Bodysa et al., 2012). Daub et al. (2016) e Assumpção et al. (2021a) verificaram que a avaliação da integridade da membrana do espermatozoide com corantes vitais (eosina/nigrosina) e sondas fluorescentes apresentam resultados muito semelhantes na determinação do percentual de espermatozoides com lesão de membrana no sêmen, mostrando assim que qualquer uma das análises, feitas criteriosamente, podem refletir a viabilidade celular.

## 2.5. APOPTOSE NOS ESPERMATOZOIDES

Tanto nas espécies domésticas quanto nas selvagens, os ejaculados apresentam graus variáveis de qualidade, o que tem grande relação com sua fertilidade. Espermatozoides com anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda produzem alta quantidade de espécies reativas de oxigênio que interferem diretamente com a motilidade e vigor das células, integridade do DNA, atividade das mitocôndrias (produção de energia), funcionalidade de proteínas e carboidratos, podendo provocar apoptose e morte celular, levando o animal a um quadro de sub ou infertilidade (Angrimani et al., 2013; Hosen et al., 2015; Sabeti et al., 2016).

A apoptose é a morte celular programada baseada em um mecanismo genético que leva a várias alterações celulares, morfológicas e bioquímicas, levando a célula a um “suicídio” sem provocar uma resposta inflamatória e ela difere de outros processos de eliminação celular pois ela requer ATP para conduzir suas vias bioquímicas. Nas células somáticas tem sido caracterizada por um encolhimento inicial das células com quebra do contato entre elas, elas adquirem uma forma arredondada, as organelas ficam mais concentradas no citoplasma, e no núcleo ocorre condensação da cromatina e quebra do DNA pelas endonucleases específicas (Heninger et al., 2004; Caselles et al., 2014). A apoptose é mecanismo organizado e impulsionado por vias intrínsecas ou extrínsecas distintas, sendo a via extrínseca ativada pela família de receptores do fator de necrose tumoral (ativador das caspases) e a via intrínseca é ativada em células onde a homeostase é interrompida como resultado de estresse induzido (Peña et al., 2011).

A apoptose é um mecanismo comum que os gametas passam durante a espermatogênese e é necessário para manter a homeostase nos testículos. Todo ejaculado contém duas populações de espermatozoides: uma fração não apoptótica contendo células de qualidade morfolologicamente superior e uma fração apoptótica associada a grande quantidade de anormalidades morfológicas (Hendricks e Hansen, 2009).

A apoptose em espermatozoides é expressa por marcadores distintos de danos celulares, como a perda da integridade da membrana celular com a externalização da fosfatidilserina, ativação da caspase-3, perda do potencial da membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a fragmentação do DNA (nuclear e mitocondrial), sendo associados ao decréscimo dos parâmetros seminais como motilidade, morfologia e concentração levando a redução de sua fertilidade (Brum et al., 2008; Aziz et al., 2007; Rawe et al., 2009; Nakidkina e Kuzmina, 2019).

A apoptose é um mecanismo essencial para a remoção de células germinativas em desenvolvimento do epitélio seminífero, sendo que os estágios onde ocorrem os níveis mais elevados de apoptose geralmente correspondem aos picos mitóticos e meióticos do

desenvolvimento de células germinativas. Durante a espermatogênese, se o processo de apoptose for eficiente, as células germinativas anormais são eliminadas para que apenas espermatozoides normais sejam formados, mas algumas células germinativas marcadas para apoptose escapam do mecanismo de eliminação e completam a sua divisão levando a formação de espermatozoides anormais com algumas células apresentando danos graves no seu DNA (Heninger et al., 2004; Berteli et al., 2017).

A análise convencional de uma amostra de espermatozoides fornece grande número de informações sobre suas características, mas não revela informações sobre a presença de eventos de apoptose que podem ser amplamente responsáveis pela baixa taxa de fertilização e implantação do embrião (Rawe et al., 2009).

O papel dos marcadores de apoptose celular nas células somáticas está bem estabelecido, porém na função do espermatozoide ainda não. Vários marcadores de apoptose das células somáticas estão presentes nos ejaculados, mas os papéis desses marcadores na vitalidade/morte dos espermatozoides e na infertilidade masculina ainda não estão bem esclarecidos (Oehninger et al, 2003). Espermatozoides imaturos podem apresentar marcadores não caracterizados e serem responsáveis pela fertilidade inadequada, podem expressar marcadores de apoptose semelhantes de células somáticas se ocorrer apoptose antes da diferenciação espermática final, podem ser reflexo de mecanismos relacionados a endocrinopatias, varicocele e inflamação/ infecção e ainda ter a morte celular rápida devido ao curto tempo de vida típico dos espermatozoides pós ejaculação (Oehninger et al, 2003; Marchetti e Marchetti, 2005).

A apoptose pode ser induzida ainda após a ejaculação por exposição dos espermatozoides a um ambiente inóspito e estressante que pode comprometer a taxa de fertilização e a competência de desenvolvimento do embrião (Hendricks e Hansen, 2009). A translocação da fosfotidilserina na membrana celular, a fragmentação de DNA e ativação das caspases revelam um fenótipo de apoptose na população de espermatozoides em uma proporção variável, sendo que a elucidação criteriosa destes mecanismos será uma contribuição significativa para o campo da reprodução (Oehninger et al, 2003; Marchetti e Marchetti, 2005, Aitken e Baker, 2013).

## **2.6. SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA POR ATIVAÇÃO MAGNÉTICA**

As técnicas de separação de espermatozoides devem ser rápidas, fáceis, de baixo custo e serem capazes de selecionar células móveis e morfológicamente normais, não causar alterações nas células separadas, eliminar espermatozoides mortos e outras células, incluindo leucócitos e bactérias, eliminar substâncias tóxicas ou bioativas como fatores de capacitação ou ROS, e

permitir o processamento de volumes maiores de ejaculados. As técnicas atualmente empregadas negligenciam fatores como integridade do DNA, geração de espécies reativas de oxigênio, maturação da membrana e espermatozoides apoptóticos (Said e Land, 2011; Henkel, 2012).

Os métodos convencionais de seleção espermática como a migração ou sedimentação de células, centrifugação em gradiente de densidade (DGC), “swim up”, entre outras, utilizam várias etapas de centrifugação, expondo o espermatozoide saudável a altos níveis de ROS que induzem estresse oxidativo danificando o seu DNA (Makker et al., 2008; Aitken et al., 2013). Estes procedimentos possuem limitações, pois não utilizam critérios moleculares para avaliar a função reprodutiva, de modo que a maior competência funcional nem sempre é obtida nas células selecionadas, limitações estas que podem ser superadas associando outras técnicas como as de seleção de espermatozoides não apoptóticos (Said et al., 2006; Rappa et al., 2016).

A membrana celular possui como constituintes principais o colesterol e os fosfolípidios que são importantes na manutenção de sua integridade. A fosfatidilserina (FS) está presente na face interna da membrana e a sua externalização é considerada como um sinal de apoptose, sendo associada ao decréscimo dos parâmetros seminais como motilidade, morfologia e concentração levando a redução de sua fertilidade (Said et al., 2008; Rawe et al., 2009; Tavallee et al., 2012). Anexina V (ANX) é uma proteína que liga-se especificamente a FS e é capaz de identificar células com membranas alteradas em início de apoptose (Rawe et al., 2009). Arrighi et al. (2009) observaram que a FS está presente em 61,4 % das membranas dos espermatozoides em todas as regiões (cabeça, peça intermediária e cauda) com maior expressão na cabeça.

A técnica de separação celular por ativação magnética (MACS) é um método não invasivo que utiliza o conhecimento da afinidade da anexina V (ANX) com a FS da membrana. A ANX quando acoplada a microesferas metálicas e liga-se aos espermatozoides com membrana lesada, com alteração no potencial de membrana mitocondrial e com fragmentação de DNA, e quando este conjugado é submetido a um campo magnético de alta potência em uma coluna de separação, estes conjugados irão aderir à coluna, enquanto as células não apoptóticas com membranas intactas passarão livremente por ela, sem comprometer a viabilidade do espermatozoide que poderá ser utilizado em técnicas de reprodução assistida (Dirican et al., 2008, Rawe et al., 2009; Rappa et al., 2016; Manuel et al., 2017).

Através de microscopia eletrônica de transmissão, Curti et al. (2014) verificaram que MACS aumenta a quantidade de células com caudas normais, amplia a motilidade e a morfologia normal. A MACS é uma técnica eficiente de separação de espermatozoides na espécie humana com taxa de recuperação de células em torno de  $73,8 \pm 12,1\%$  (Said et al., 2006).

Alguns estudos mostram os efeitos positivos da combinação da técnica de MACS com os métodos clássicos de processamento para a seleção da qualidade do espermatozoide (DGC, *swim up*). Tavalae et al. (2012) mostraram que DGC ou MACS sozinhos reduzem fragmentação do DNA em cerca de 30% e DGC-MACS reduziu em 40% a 49% as células com alteração de DNA, semelhante ao observado também por Dirican et al. (2008); Arrighi et al. (2009); Gil et al. (2013); Berteli et al. (2017), entre outros.

## 2.7. O PORQUÊ DESTE ESTUDO

As biotécnicas da reprodução surgiram e evoluíram com o passar dos tempos, com aplicações no aumento da eficiência reprodutiva e produtiva, preservação dos recursos genéticos animais, melhoria da qualidade dos produtos, com repercussões na saúde animal, na saúde humana e na preservação de espécies em extinção (Rodrigues e Bertolini, 2019).

A crescente adoção da inseminação artificial e criopreservação de sêmen aumentou a necessidade de desenvolver métodos para especificar a fertilidade dos machos. Desde o início do século XX a má qualidade dos espermatozoides tem sido associada à baixa fertilidade, e a avaliação da morfologia espermática tem sido utilizada no exame de saúde reprodutiva ou pesquisa de baixa fertilidade de animais (Nöthling e Irons, 2008). Um dos fatores que contribuem para esta baixa fertilidade é a qualidade dos ejaculados que é muito variável, pois é composto por uma mistura heterogênea de subpopulações de espermatozoides que possuem morfologia, motilidade e capacidade de fertilização próprias, incluindo células com anormalidades estruturais, mostrando assim a necessidade de uma seleção das células para otimizar sua capacidade de fecundação (Prakash et al., 2014; Amann et al., 2018).

Na tentativa de obter amostras seminais com maior número de espermatozoides viáveis, as técnicas de seleção espermática são cada vez mais empregadas, resultando em amostras com maior motilidade, menor quantidade de anormalidades e maior viabilidade (Henkel e Shill, 2003). Técnicas como a separação espermática por centrifugação em gradiente de densidade e a separação espermática por ativação magnética são opções para reduzir a quantidade de anormalidades espermáticas nas amostras seminais, principalmente espermatozoides com anormalidade em cauda e cabeça, melhorando assim a qualidade do ejaculado para que o mesmo possa ser utilizado em técnicas como inseminação artificial e a fertilização *in vitro* (Faezah et al.; 2014; Bucar et al., 2015; Berteli et al., 2017). Na reprodução humana os primeiros resultados após fertilização *in vitro* com espermatozoides selecionados a partir de DGC e MACS são encorajadores quanto à taxa de fertilização e às taxas de gravidez (Said e Land, 2011; Manuel et al., 2017).

Ainda são necessários estudos nas espécies animais com a técnica de DCG e MACS, sejam isoladas ou em conjunto, a fim de produzir amostras de sêmen com o mínimo de espermatozoides anormais, alta motilidade e integridade de suas membranas visando ótimas taxas de fertilização e que também possam garantir que não haja prejuízos na eficiência das células espermáticas *in vivo* e *in vitro* pós seleção. O desenvolvimento de uma técnica de separação espermática que não interfira com sua qualidade permitirá a produção de amostras de sêmen de animais domésticos e selvagens de alta qualidade e com alta chance de fertilidade do oócito, o que contribuirá para o aumento da eficiência reprodutiva pós-inseminação ou na produção de embriões *in vitro*.

## **2.8. A ESCOLHA DAS ESPÉCIES**

Para esta pesquisa foram escolhidas quatro espécies animais, sendo três domésticas (bovinos, equinos, felinos) e uma selvagem (cervídeo). A justificativa da escolha das espécies estudadas está descrita nos tópicos abaixo:

### **2.8.1. Importância dos bovinos na pecuária nacional e o grande número de pesquisas na espécie**

O Brasil detém uma população de bovinos estimada em 275 milhões de cabeças (Giro do Boi, 2022), com um total de 28.706.330 milhões de doses de sêmen comercializadas para inseminação artificial no ano de 2021 (ASBIA, 2022) e uma produção de embriões de 302.309 milhões registrada em 2019 (Viana, 2021). Estas biotécnicas movimentam bilhões de reais por ano e têm sido um poderoso instrumento para a multiplicação e disseminação de genética de alta qualidade além do aumento da lucratividade do produtor rural.

Milhões de fêmeas bovinas são inseminadas anualmente em todo o mundo, sendo 82.481.999 fêmeas no Brasil em 2021, representando 22,79% do rebanho nacional de vacas (ASBIA, 2022). Apesar desse alto número de inseminações, a probabilidade de concepção é em torno de 50%, devido à baixa qualidade seminal e às injúrias causadas pela criopreservação, que afetam a fecundação e/ou o desenvolvimento embrionário (Sá Filho et al., 2009).

Nos últimos 10 anos foram publicados 651 artigos científicos na área de reprodução de bovinos no Brasil (CAPES, 2022), representando mais de 60% dos artigos da área de reprodução animal. Há uma crescente busca por tecnologias e alternativas que permitam o desenvolvimento da pecuária, com altos índices da produção animal, dentre estas, as biotécnicas da reprodução, que têm mostrado um aumento contínuo das publicações sobre a evolução das gerações de tecnologia de reprodução assistida, as quais proporcionaram o desenvolvimento da produção



animal e o melhoramento genético, sendo que em torno de 56% dos artigos da área de reprodução de bovinos fala sobre aspectos gerais do sêmen e produção *in vitro* de embriões (Zamai et al., 2019).

A fertilidade do touro tem recebido muita atenção em estudos de pecuária onde os benefícios econômicos dependem da melhoria da produtividade. Apesar de anos de esforços, nenhum resultado conclusivo foi obtido, provavelmente porque os bovinos domésticos muitas vezes são sujeitos a forte seleção artificial para alta fertilidade, na busca de ejaculados de alta motilidade e alta proporção de espermatozoides normais (Gomendio et al., 2007). A avaliação da fertilidade de touros tem sido baseada nas características de seu sêmen, porém este contém espermatozoides com níveis variáveis de fertilidade e pode apresentar células anormais que os tornam incapazes de fertilizar o oócito. A qualidade do espermatozoide é um dos fatores que determina o sucesso das técnicas de reprodução *in vivo* e *in vitro*, sendo que a reprodução assistida na espécie tem se transformado no tratamento de escolha em casos de infertilidade no macho e fêmea, porém as taxas de sucesso ainda não são ideais (Rawe et al., 2009; Odhiambo et al., 2014).

### **2.8.2. Os cervídeos e sua importância na biodiversidade**

A preservação de uma espécie depende da manutenção de populações com boa variabilidade genética e a reprodução é essencial neste processo. As biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização *in vitro* e criopreservação de sêmen e de embriões podem contribuir para esta diversidade genética, entretanto, a aplicação destas técnicas ainda é limitada em espécies selvagens devido, principalmente, à falta de conhecimento básico em biologia reprodutiva (Howard, 1999; Holt et al., 2014). A manutenção da diversidade genética é essencial para sobrevivência de uma espécie, pois sua redução pode afetar a espermatogênese e ovulação, concepção, desenvolvimento embrionário através de alterações epigenéticas do genoma, susceptibilidade a doenças, morbidade e mortalidade perinatal (Morato et al., 1998; Rola et al., 2013; Holt et al., 2014).

No Brasil existem oito espécies de cervídeos, entre eles os do gênero *Mazama*: *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Mazama nana* (Hensel, 1872) e *Mazama bororo* (Duarte, 1996). As espécies de *M. nana* e *M. bororo* são consideradas como vulneráveis em nível mundial e as demais espécies estão com suas populações em rápido declínio (ICMBio, 2018; IUCN, 2022).

A qualidade dos ejaculados é muito diferente entre as espécies de cervídeos, quando a seleção natural nem sempre faz com que o macho com melhor qualidade seminal tenha maior número de filhos, mas também envolve um processo complexo e requer muitos atributos para

que o espermatozoide possa atingir o local de fertilização, penetrar o oócito e ativar o desenvolvimento do embrião (Aitken et al., 2011).

Nas diferentes espécies de animais selvagens, incluindo os cervídeos, até mesmo em vida livre, há um alto grau de anormalidades estruturais dos espermatozoides provocada pelo aumento da endogamia (perda da variabilidade genética) devido ao declínio populacional provocado pelas mudanças ambientais e ações antrópicas (Wildt et al., 2010; Holt et al., 2014). Este quadro também é observado em animais de cativeiro provocado pelo estresse do espaço reduzido, mudança de ambiente e convivência constante com outros indivíduos (Abreu et al. 2009), o que provoca queda drástica de fertilidade nas espécies, reduzindo a eficiência da reprodução assistida e colocando em risco a conservação destes animais.

### **2.8.3. A importância dos equinos nas criações brasileiras**

O Brasil dispõe atualmente de um rebanho de equinos de 5.962.126 milhões de animais (IBGE, 2021), que reúne cavalos de trabalho, lazer e competição. A atividade movimenta anualmente R\$ 16, 5 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por mais de três milhões de postos de trabalho (*Animal Business*, 2022).

Os garanhões apresentam taxas de concepção por ciclo mais baixas quando comparados com outras espécies de animais, principalmente porque são selecionados não por aptidão reprodutiva e fertilidade, mas sim com base na capacidade atlética, *pedigree*, conformação, desempenho e progênie, o que leva a garanhões valiosos serem subfêrteis e com baixa qualidade de sêmen, mas que são frequentemente usados em programas de criação comercial (Loomis, 2006, Mari et al., 2011). A gradativa demanda por animais de elevado padrão racial torna iminente a implantação de técnicas que possibilitam intensificar o aproveitamento de bons reprodutores, de modo a impulsionar o aspecto qualitativo do plantel das variadas raças. O conhecimento das características reprodutivas e seminais de um animal é fundamental para se adotar biotécnicas de reprodução objetivando aumentar a eficiência reprodutiva da espécie (Papa, 2020).

A qualidade do sêmen tem um papel decisivo na fertilidade, pois qualquer fator capaz de alterar a espermatogênese resulta na produção de espermatozoides com alterações morfológicas (Arruda et al., 2015). As características do sêmen podem variar muito entre os garanhões ou mesmo em um indivíduo, sendo que a qualidade do espermatozoide é um dos fatores determinantes do sucesso das técnicas de reprodução assistida (Loomis, 2006).

Atualmente, a fertilidade dos garanhões tem sido um dos principais parâmetros de seleção e utilização, sendo avaliada por diversos métodos laboratoriais de avaliação do sêmen que em conjunto podem ajudar a prever o potencial fecundante. Os garanhões apresentam grande quantidade de células espermáticas com anormalidades, devido principalmente aos espermatozoides apoptóticos que levam redução da motilidade e alto grau de anormalidades das células (Caselles et al., 2014). Os testes convencionais de análise espermática, como concentração, motilidade e avaliação morfológica são valiosos para identificar garanhões subfêrteis, mas fornecem apenas informações moderadas sobre a competência funcional dos espermatozoides, pois não avaliam a estrutura interna da célula espermática, como a cromatina (DNA e proteínas específicas), indicativos essenciais da funcionalidade dos espermatozoides, da habilidade de fecundação e do desenvolvimento embrionário (Love, 2011; Muradas et al., 2013; Griffin et al., 2019).

#### **2.8.4. Os gatos domésticos e seu sêmen com alto grau de anormalidades espermáticas**

Os gatos convivem com os humanos há aproximadamente 10.000 anos e ganham cada vez mais espaço como membros das famílias. Em 2021, de acordo com a Comissão de Animais de Companhia (COMAC, 2021), a população aproximada de gatos domiciliados no país era de 30 milhões de animais, e movimentaram R\$ 25 milhões de reais no mercado de produtos e serviços. Para suprir essa demanda crescente pela companhia dos felinos crescem o número de gatis especializados na reprodução das diferentes raças. Assim como acontece com a reprodução assistida de outras espécies de animais, o conhecimento sobre a reprodução de gatos deve ser aprofundado para se evitar perdas econômicas, pois ainda são poucos os estudos nesta espécie (Vieira et al., 2009).

O gato doméstico tem sido muito utilizado como modelo de pesquisa no estudo dos mecanismos biológicos da reprodução nas 37 espécies da família Felidae, a maioria dos quais são raros e ameaçados de extinção e podem se beneficiar do conhecimento obtido em estudos com gatos domésticos, pois estes são modelos experimentais para o estudo da reprodução das espécies selvagens (Jewgenow et al., 2009; Vieira et al., 2009). Os gatos domésticos são selecionados para reprodução principalmente com base em sua aparência e comportamento, não pelas características reprodutivas, o que pode levar a vários problemas de fertilidade e menor qualidade do sêmen dos animais, principalmente devido a azoospermia/oligospermia e teratospermia (Fontbonne et al., 2020).

As análises de sêmen no gato doméstico são mais complicadas pelo volume diminuto dos ejaculados e o conhecimento das variações na morfologia espermática ajudaria a interpretação mais confiável dos espermogramas da espécie (Zambelli e Cunto, 2006; Axner e Forsberg, 2007).

Os felinos apresentam um fenômeno interessante na função testicular que leva o aumento da produção de espermatozoides com teratospermia, ou seja, produção de mais de 60% de espermatozoides morfológicamente anormais levando uma redução na produção e na fertilidade das células (Axner e Forsberg, 2007). Espermatozoides teratospérmicos apresentam alteração na capacidade de sobreviver à criopreservação, no processo de capacitação e reação acrossômica, na penetração da zona pelúcida e na fertilização do oócito (Pukazhenthil et al., 2006).

A teratospermia na espécie pode ter diferentes tipos de origem como a redução da diversidade genética, sendo que alguns gatos produzem periodicamente um alto número de espermatozoides malformados que parecem parcialmente regulados pela sazonalidade ou talvez a abstinência nas cópulas, nutrição ou fatores de saúde (Blottner e Jewgenow, 2007). Também é conhecido que ocorrem distúrbios na depleção das células germinativas apoptóticas que garantem a qualidade dos gametas produzidos, o que contribui para o aumento da produção de espermatozoides com baixa qualidade. As razões e os mecanismos exatos desta condição são pouco conhecidos, podendo estar relacionados com a idade e a época de reprodução, pois alguns animais podem apresentar mudanças sazonais no peso do testículo, concentração de testosterona e qualidade do sêmen (Jewgenow et al., 2009; Prochowska et al., 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

Este estudo visou realizar a seleção de espermatozoides de alta qualidade através da separação espermática por ativação magnética em sêmen fresco de bovinos, cervídeos, equinos e felinos domésticos, avaliando a qualidade das células após o processo de seleção espermática.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver para animais domésticos e silvestres a técnica de separação espermática por ativação magnética (MACS/SEAM) a fim da obtenção de amostras de espermatozoides de alta qualidade comparando com a centrifugação por gradiente de densidade (DGC).
- Comparar a motilidade e a morfologia espermática pré e pós-separação por MACS/SEAM, no filtrado (fração não apoptótica) e na porção retida na coluna de separação (fração apoptótica), a fim de analisar a interferência da MACS/SEAM na qualidade celular.

- Analisar se ocorre algum tipo de lesão nas células espermáticas após separação por DSG e MACS, pelo teste supravital e através da avaliação da membrana plasmática e do potencial de mitocôndrias usando as sondas fluorescentes.
- Verificar se a técnica de separação espermática é eficiente em todas as espécies
- Produzir amostras de sêmen de alta qualidade e com alta chance de fertilidade a fim de aumentar os índices reprodutivos *in vivo* e *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de execução

1) **Laboratório de Reprodução Animal** da Universidade Federal de Uberlândia – preparo de materiais, corantes e reagentes, análises morfológicas do sêmen e teste supravital.

#### 2) Bovinos

- Coleta de sêmen dos touros, análises de CASA e citometria de fluxo para análise de membranas espermáticas na Central Alta Genetics, Uberaba, MG. Cooperação dos doutores Neimar Correa Severo e João Pedro Brandão Zandonaide.

- Análise de citometria de fluxo para potencial mitocondrial dos espermatozoides – Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. Cooperação do Dr. Gustavo Guerino Macedo.

#### 3) Cervídeos

- Coleta do sêmen no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), UNESP, Campus Jaboticabal, Jaboticabal, SP. Cooperação do Dr. José Maurício Barbanti Duarte.

#### 4) Equinos

- Coleta do sêmen de animais de criatórios particulares da região de Uberlândia, MG, sendo as amostras cedidas pelos doutores Paula Caroline Pereira e Pedro Sanches Oquendo Junior.

#### 5) Gatos

- Coleta e análise física do sêmen realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. Cooperação da Dra. Maria Isabel Mello Martins.

### 4.2. Os animais

1 - **Bovinos** - Foram realizadas coletas de sêmen de 21 touros adultos da raça Nelore. Foram selecionados animais desclassificados no espermograma devido altas quantidade de células com

anormalidades (acima de 30%). Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 024/18.

**2 - Cervídeos** - Foram utilizados seis cervídeos, sendo dois de cada espécie: veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado-roxo (*Mazama nemorivaga*) e veado-mateiro (*Mazama americana*), pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil (Registro IBAMA nº 1/35/92/0882-5, Cadastro SISBIO nº 482.508). Os cervídeos eram mantidos em baias individuais (4m x 4 m), com contato auditivo e olfatório entre machos e fêmeas e expostos a flutuações naturais de luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar. A alimentação era à base de ração industrializada e forragens e a água fornecida à vontade ao animal.

**3 - Equinos** - O estudo foi realizado com 10 garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga criados na região de Uberlândia/MG. Foram selecionados animais desclassificados no espermograma (CBRA, 2013), por apresentarem altas quantidades de células com anormalidades (acima de 30%).

**4 - Gatos** – Utilizou-se sêmen de 10 gatos domésticos adultos sem raça definida, oriundos de uma ONG de proteção animal que foram levados para castração no programa de controle populacional de animais da Universidade Estadual de Londrina.

#### **4.3. Coleta, preparação e análise das amostras**

##### **4.3.1. Coleta do sêmen**

As amostras de sêmen dos bovinos foram coletadas utilizando o método de vagina artificial por pessoal treinado do quadro técnico da Central Alta Genetics, sob as mesmas condições técnicas e de assepsia.



Figura 2 – Coleta de sêmen dos touros pela técnica de vagina artificial na Central Alta Genetics, Uberaba, MG.

As coletas de sêmen dos cervídeos foram realizadas pela técnica de eletroejaculação sob anestesia geral. Os animais foram anestesiados com associação dos anestésicos cloridrato de xilazina (1 mg/ kg) e cloridrato de quetamina (10 mg/kg), por via intramuscular. Foi utilizado um eletroejaculador (P-T Eletronics®; Boring, OR; USA) acoplado a uma probe (2,0 cm de diâmetro e 28,0 cm de comprimento, com três eletrodos longitudinais com 1,5 cm de distância entre os mesmos). Após sedação e introdução dos eletrodos direcionados ventralmente no reto, o animal recebeu estímulos crescentes de 250 mA a 750 mA com duração média de três segundos, e entre cada estímulo houve um intervalo de três segundos (perfazendo um total de dez estímulos por sequência). Foram realizadas três sequências de estimulação, com intervalos de um a dois minutos durante a coleta (Duarte e Garcia, 1995).



Figura 3 – Coleta de sêmen dos cervídeos pela técnica de eletroejaculação sob anestesia geral no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, UNESP, Jaboticabal, SP.

As coletas dos equinos foram realizadas utilizando o método de vagina artificial, sob as mesmas condições técnicas e de assepsia.



Figura 4 – Coleta de sêmen dos equinos pela técnica de vagina artificial, Uberlândia, MG.

As coletas dos gatos foram realizadas pela técnica de Coleta farmacológica, utilizando a associação de dexmedetomidina (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , IM; Dormitor<sup>®</sup>, Zoetis) e cetamina (5 mg/kg, IM; Quetamina<sup>®</sup>, Vetnil) e a cateterização uretral por sonda tomcat (0,8mm x 1,00mm x 11cm) com 15 minutos após a aplicação dos fármacos (Hidalgo et al., 2022).

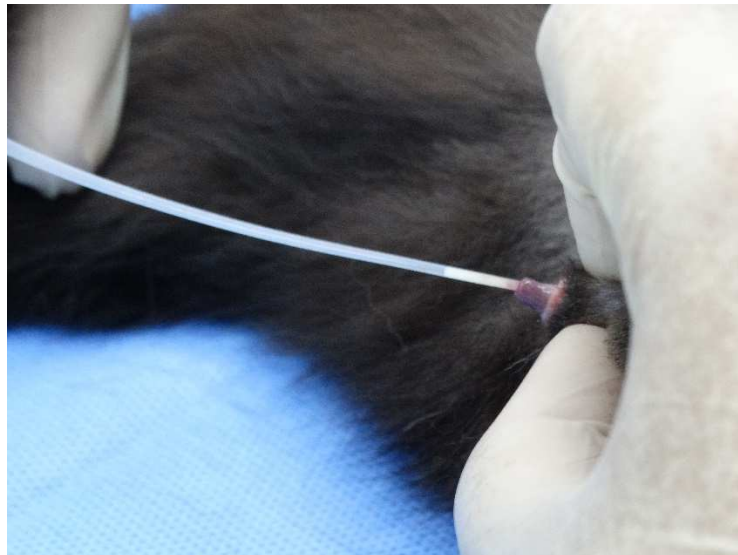


Figura 5 – Coleta de sêmen dos gatos pela técnica de Coleta farmacológica com cateterização uretral no Laboratório de Reprodução Animal da UEL, Londrina, PR.



#### 4.3.2. Fluxograma das análises

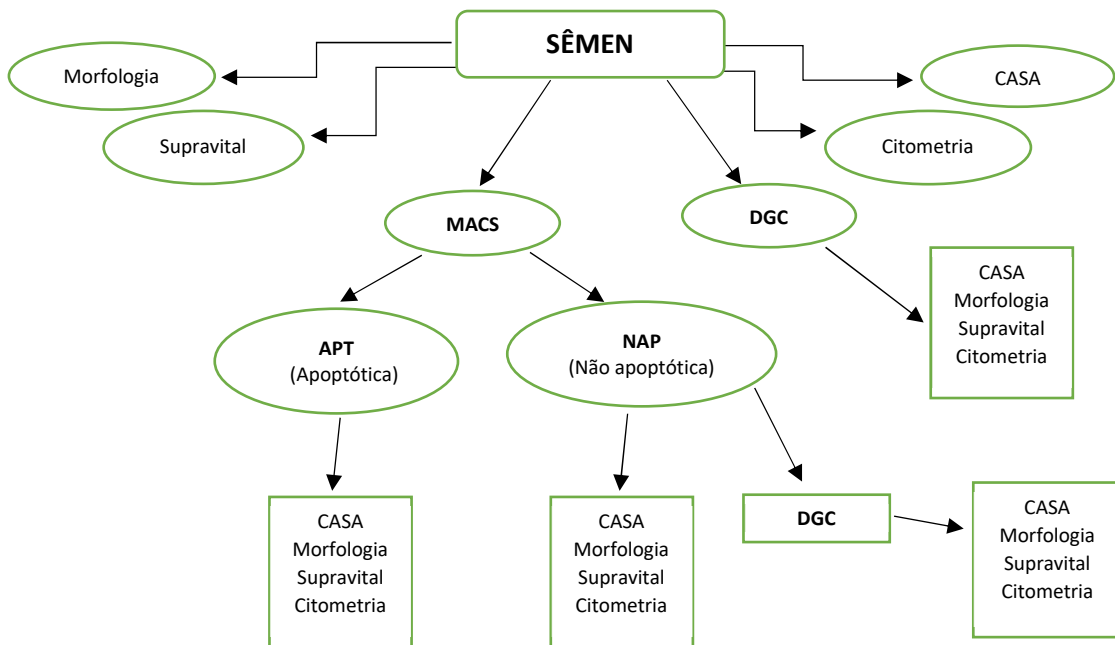


Figura 6 – Análises sequenciais realizadas nas amostras de sêmen. Etapa NAP – DGC e citometria só foi realizada em bovinos. Análise de motilidade feita no CASA em bovinos e gatos e em microscopia óptica nos cervídeos e equinos.

#### 4.3.3. Análises física e morfológica do sêmen

Para as análises de motilidade total e progressiva foi realizada a análise computadorizada de sêmen (CASA) em equipamento modelo IVOS (Hamilton Thorne®) para as amostras de bovinos e de gatos. Nas outras espécies, cervídeos e equinos, foram feitas sob microscopia óptica utilizando uma gota de sêmen sobre uma lâmina de vidro recoberta com lamínula.



Figura 7 – Aparelho CASA utilizado na análise de motilidade espermática de bovinos e gatos.

A concentração do sêmen foi medida com auxílio da câmara de Neubauer, para mensuração do número de espermatozoides por mL na amostra, em todas as espécies.

A morfologia espermática foi avaliada em todas as espécies pelo método de preparação em câmara úmida, sob microscopia óptica de contraste de fase, sendo avaliadas 200 células, verificando a porcentagem das anormalidades individualmente e contabilizando os defeitos maiores, menores e totais. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo avaliador. A classificação das anormalidades foi de acordo com o Manual de Exame Andrológico (CBRA, 2013).

O teste supravital (análise de vivos/ mortos) foi feito utilizando esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina, corante Botuvital® (Botupharma, Botucatu, SP), verificando a porcentagem de células com membrana íntegra (“vivos”) e membrana lesada (“mortos”) (Faezah et al., 2012).

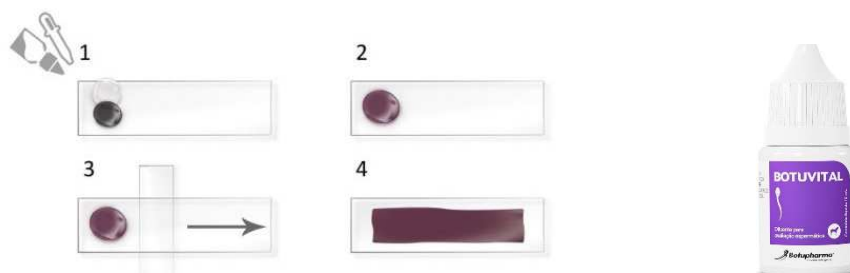


Figura 8 – Esfregaço de sêmen com corante Botuvital® para análise de integridade da membrana espermática. Fonte: [www.botupharma.com.br](http://www.botupharma.com.br).

Foram analisadas cinco amostras diferentes: 1) sêmen fresco (fresco); 2) pós separação por DGC (DGC); 3) pós separação por MACS ou SEAM (porção filtrada, não apoptótica) (NAP); 4) pós separação por MACS ou SEAM (porção retida na coluna – apoptótica) (APT) e 5) pós separação por MACS (porção filtrada) seguida da DGC (NAP-DGC).

#### **4.3.4. Análises de membrana plasmática e potencial mitocondrial**

A integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial foram avaliadas de acordo com protocolo por Celeghini et al. (2007), com adaptações. A integridade da membrana plasmática foi avaliada em citometria de fluxo (Cyflow®) utilizando 10 µL de sêmen com 2 µL iodeto de propídio e 1 µL de SYBR-14.

Para análise do potencial mitocondrial foi utilizado um milhão de espermatozoides diluídos em 150 µL de HEPES com 6 µL de JC-1 (iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' –

tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que após incubação por 8 minutos em temperatura ambiente sob abrigo da luz foram fixadas com paraformol 4% (3  $\mu$ L) e armazenadas em geladeira sob abrigo da luz até a análise, também realizada por citometria de fluxo (Cytoflex®).

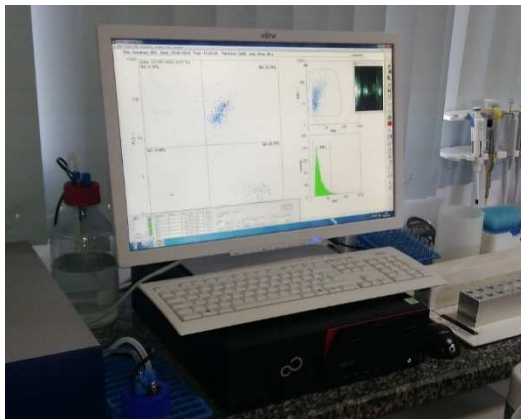


Figura 9 – Citômetro de fluxo utilizado na análise de integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial de bovinos.

#### 4.3.5. Centrifugação por gradiente de densidade

Para separação espermática por centrifugação em gradiente de densidade (DGC) foi utilizada uma solução estoque de Percoll a 90% (P1644 Sigma-Aldrich, St Louis, USA). O gradiente de densidade de Percoll foi preparado depositando-se em tubos uma camada de 400  $\mu$ L de Percoll 45%, abaixo dela depositou 400  $\mu$ L de Percoll 90% e acima destas soluções foi depositado 20 milhões de espermatozoides, seguindo protocolo de mini Percoll de Missio et al. (2018), com modificações. Os gradientes foram centrifugados a 900 G por 5 minutos, na temperatura ambiente. O sedimento contendo os espermatozoides foi diluído em 150  $\mu$ L HEPES (H3375 Sigma-Aldrich, St Louis, USA) para análise celular (Machado et al, 2009).

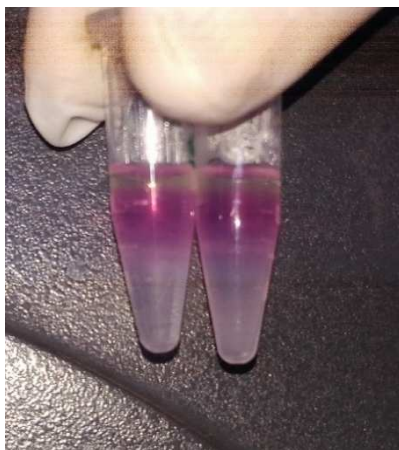


Figura 10 – Centrifugação em densidade de gradiente com Percoll (mini Percoll).

#### 4.3.6. Separação celular por ativação magnética

Para separação espermática por MACS foi utilizado o protocolo descrito por Rawe et al. (2009), com modificações. Na amostra contendo 10 milhões de espermatozoides foram adicionados 1,5 ml de HEPES, seguido de centrifugação a 300 G por 10 min. O pellet formado foi ressuspensionado em 150 µl HEPES e adicionado 20 µl de nanopartículas ligadas à Anexina V (Miltenyi Biotec, Alemanha). Após a incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se a filtração na coluna de separação magnética MiniMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha). A coluna foi previamente hidratada com 500 µl de tampão fosfato salino (PBS) com soro albumina bovina (BSA). O filtrado ou fração não apoptótica foi coletado em tubo de 2 mL. A fração apoptótica unida às microesferas foi coletada removendo a coluna do ímã e adicionando 300 µl do HEPES, com a ajuda de um êmbolo.

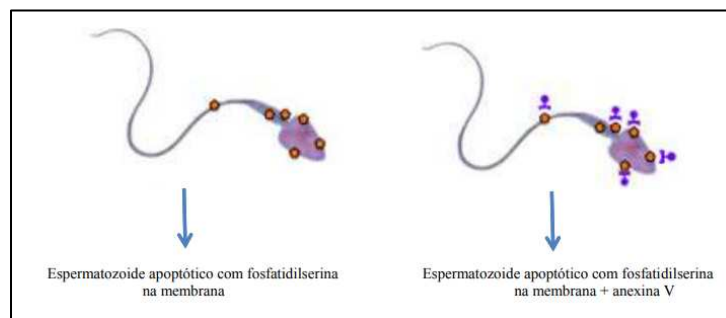


Figura 11 – Ligação da fosfatidilserina com anexina V e as nanopartículas nos espermatozoides. Adaptado de Berteli (2017).

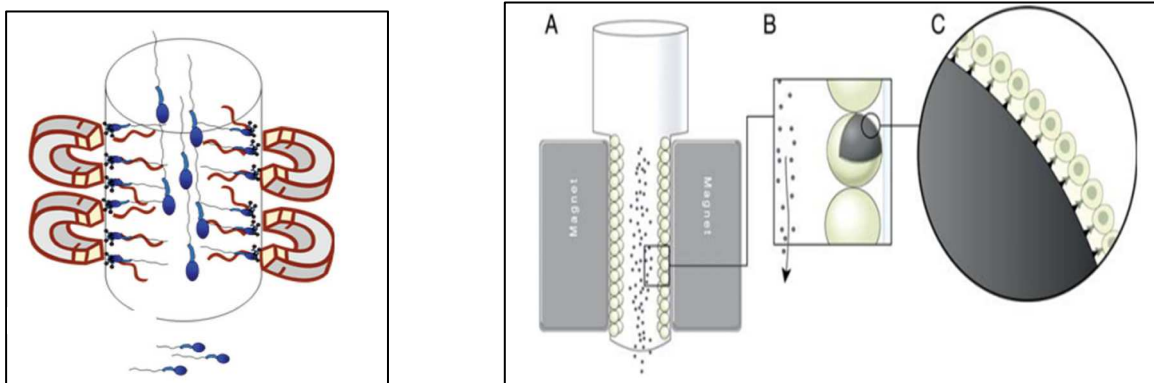


Figura 12 - Separação de espermatozoides apoptóticos utilizando MACS. (A) A coluna que contém esferas de aço é colocada dentro de um ímã externo. (B) As células não marcadas fluem através da coluna a ser coletada. (C) As células marcadas imunomagneticamente permanecem ligadas às esferas magnetizadas e são retidas dentro da coluna. Adaptado de Rawe et al. (2009) e Said e Land (2011).

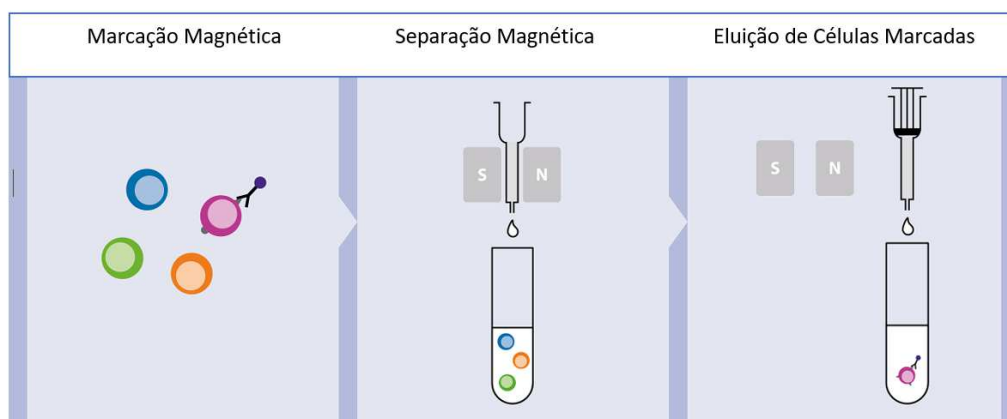


Figura 13 - Separação de espermatozoides utilizando MACS. Etapas de marcação e separação magnética e eluição das células apoptóticas da coluna. Adaptado de Miltenyi Biotec.



Figura 14 - Coluna de separação magnética MiniMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha) utilizada na separação de espermatozoides em bovinos. A - imã magnético, B - coluna de filtração.

Após as análises de bovinos utilizando o MiniMACS (Miltenyi Biotec) foi desenvolvido um protótipo de separação específico para espermatozoides, nomeado de SEAM (separação espermática por ativação magnética). Este protótipo se encontra em fase de solicitação de patente e foi desenvolvido pelo Dr. Maurício Foschini do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, em parceria, para as pesquisas com nanopartículas.

O SEAM é uma técnica semelhante ao MACS, com algumas alterações. O SEAM É composto por uma coluna contendo uma matriz com esferas ferromagnéticas e um campo magnético de alta potência em uma coluna de separação. O campo magnético de 0,5 tesla retém de forma

eficiente as células marcadas com as nanopartículas e a matriz espaçosa dentro da coluna garante que células não marcadas possam facilmente fluir. Ele possui um sistema de controle de intensidade de fluxo de filtração regulado por um *display*, além de um sistema de controle de temperatura na coluna de filtração e no frasco que recebe o filtrado para manter a temperatura constante das células espermáticas (37°C).

Este protótipo foi utilizado nas análises de cervídeos, equinos e gatos. Toda a sequência de metodologia utilizada para a separação magnética utilizada no MACS foi também utilizada no SEAM.

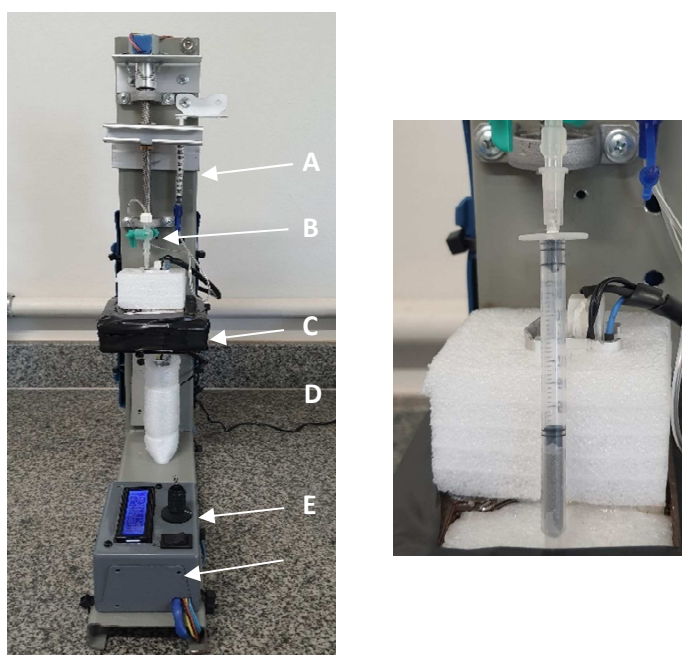


Figura 15 - Coluna de separação magnética SEAM (protótipo provisório) desenvolvido para seleção de espermatozoides, à direita detalhe da coluna de filtração. A) seringa para controle de fluxo, B) coluna de filtração com controle térmico, C) ímã magnético, D) frasco de coleta do filtrado com controle térmico, E) *Display* para controle de fluxo de filtração. Protótipo utilizado nas filtrações de cervídeos, equinos e gatos.

#### 4.3.7. Separação celular por ativação magnética – Centrifugação por gradiente de densidade

A separação espermática por MACS seguida por DGC foi uma conjunção dos dois métodos descritos acima. Esta análise só foi feita em bovinos devido à disponibilidade de amostra suficiente para as análises.

#### 4.3.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistical Analysis System for Windows SAS® 9.2 (SAS, 2014). Em bovinos, as variáveis contínuas foram avaliadas quanto à

normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett. Em cervídeos, equinos e gatos, os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro- Wilk. As variáveis que não atenderam aos requisitos de normalidade e homogeneidade da análise de variância foram devidamente transformadas de acordo com o *Guided Data Analysis* do SAS. Comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo procedimento MIXED do SAS (versão 9.4; SAS institute, Inc., Cary, NC, USA), tendo o tratamento como efeito fixo. As diferenças entre tratamentos foram obtidas por meio do teste de Tukey. A probabilidade de  $P \leq 0.05$  foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Bovinos

Todos os métodos utilizados nas análises mostraram-se eficientes no estudo dos espermatozoides dos bovinos. Quando comparamos as técnicas de DGC e MACS verificamos que ambas foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas retirando, principalmente, de forma seletiva, defeitos de cauda e cabeça, respectivamente. Porém, a combinação dos dois métodos mostrou maior eficiência produzindo amostra de alta qualidade celular, como mostrado por Assumpção et al. (2021b). Como nesta pesquisa, Gil et al. (2013), Bucar et al. (2015) e Berteli et al. (2017) também mostraram a eficiência do MACS na seleção de espermatozoides funcionais no sêmen humano, e quando utilizada junto ao gradiente de densidade os resultados nas taxas de fertilização foram excelentes. Curti et al. (2014) relataram que MACS quando utilizada junto ao gradiente de densidade reduz de 30 a 60% o número de células com defeitos de cabeça e cauda.

A MACS se mostrou, neste estudo, muito efetiva na seleção de espermatozoides funcionais de alta qualidade de bovinos como verificado também por Faezah et al. (2012) e Assumpção et al. (2021b), com aumento da motilidade e redução das anormalidades, como obtido no sêmen humano por Gil et al. (2013) e Berteli et al. (2017). Aziz et al. (2007) e Odhiambo et al. (2014) utilizando MACS observaram aumento de viabilidade, motilidade progressiva e morfologia normal, semelhantes ao verificado neste estudo.

As Tabelas 1 e 2 e a Figura 16 mostram os valores médios de motilidade total e progressiva, os tipos de anormalidades individuais, maiores, menores e totais das células espermáticas obtidas nas cinco amostras do sêmen analisadas. Todas as variáveis foram significativas nas análises de variância com  $p < 0,05$ .

Tabela 1 – Média de motilidade total e progressiva do sêmen observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT e NAP-DGC em touros da raça Nelore (valores em porcentagem, média ± EPM).

	fresco	DGC	NAP	APT	NAP-DGC
Motilidade total	75,75±3,82 <sup>a</sup>	72,66±5,39 <sup>a</sup>	52,18±3,32 <sup>b</sup>	17,80±4,66 <sup>c</sup>	8,11±5,06 <sup>c</sup>
Motilidade progressiva	58,22±3,30 <sup>a</sup>	68,31±3,94 <sup>a</sup>	38,33±2,83 <sup>c</sup>	12,10±2,76 <sup>d</sup>	11,37±3,94 <sup>d</sup>

\* NAP - não apoptótica, APT - apoptótica e DGC - Centrifugação em gradiente de densidade. Letras Diferentes nas linhas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2 – Média de anormalidades morfológicas dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT e NAP-DGC em touros da raça Nelore (valores em porcentagem, média ± EPM).

Anormalidade	fresco	DGC	NAP	APT	NAP-DGC
Abaxial/ retroaxial	0,50±0,17 <sup>a</sup>	0,18±0,10 <sup>ab</sup>	0,25±0,12 <sup>ab</sup>	0,26±0,10 <sup>ab</sup>	0,08±0,08 <sup>b</sup>
Acrossoma	3,22±0,78 <sup>ab</sup>	2,40±0,51 <sup>ab</sup>	0,80±0,21 <sup>b</sup>	4,31±0,79 <sup>a</sup>	0,75±0,35 <sup>b</sup>
Cabeça isolada normal	5,90±1,19 <sup>a</sup>	2,81±0,52 <sup>b</sup>	0,95±0,25 <sup>b</sup>	2,26±0,56 <sup>b</sup>	1,00±0,30 <sup>b</sup>
Cauda dobrada	5,86±1,51 <sup>a</sup>	3,04±0,57 <sup>a</sup>	4,40±0,77 <sup>a</sup>	4,68±0,94 <sup>a</sup>	1,66±0,43 <sup>b</sup>
Cauda Enrolada	1,09±0,32 <sup>ab</sup>	0,22±0,14 <sup>b</sup>	1,50±0,41 <sup>a</sup>	0,36±0,17 <sup>b</sup>	0,58±0,25 <sup>ab</sup>
Cauda fort. Dobrada/ enrolada	4,40±0,86 <sup>a</sup>	0,77±0,25 <sup>b</sup>	1,45±0,38 <sup>b</sup>	4,10±0,90 <sup>a</sup>	0,91±0,37 <sup>b</sup>
Contorno anormal	2,45±0,56 <sup>b</sup>	2,31±0,31 <sup>b</sup>	1,30±0,29 <sup>b</sup>	5,42±0,76 <sup>a</sup>	1,50±0,39 <sup>b</sup>
Defeito de peça intermediária	0,18±0,10 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,15±0,08 <sup>a</sup>	0,10±0,07 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
Delgado	0,90±0,35 <sup>a</sup>	0,59±0,26 <sup>a</sup>	0,20±0,15 <sup>a</sup>	0,73±0,25 <sup>a</sup>	0,08±0,08 <sup>a</sup>
Delgado na base	0,77±0,27 <sup>a</sup>	0,54±0,21 <sup>ab</sup>	0,05±0,05 <sup>b</sup>	0,31±0,21 <sup>ab</sup>	0,0 <sup>b</sup>
Gota citoplasmática distal	0,77±0,30 <sup>a</sup>	1,54±0,73 <sup>a</sup>	0,75±0,26 <sup>a</sup>	1,26±0,68 <sup>a</sup>	0,16±0,16 <sup>a</sup>
Gota citoplasmática proximal	6,86±1,76 <sup>a</sup>	5,27±1,20 <sup>a</sup>	4,40±1,02 <sup>a</sup>	4,36±1,03 <sup>a</sup>	3,00±1,02 <sup>a</sup>
Piriforme	0,13±0,09 <sup>a</sup>	0,18±0,08 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,15±0,08 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
<i>Pouch formation</i>	2,63±0,88 <sup>a</sup>	1,27±0,66 <sup>a</sup>	1,25±0,35 <sup>a</sup>	1,89±0,60 <sup>a</sup>	0,66±0,35 <sup>a</sup>
Defeitos maiores	19,36±2,20 <sup>a</sup>	13,36±1,53 <sup>b</sup>	9,65±0,97 <sup>bc</sup>	21,10±1,82 <sup>a</sup>	6,66±1,11 <sup>c</sup>
Defeitos menores	15,22±2,43 <sup>a</sup>	8,13±0,90 <sup>bc</sup>	7,65±0,84 <sup>bc</sup>	9,57±1,21 <sup>b</sup>	3,83±0,71 <sup>c</sup>
Defeitos totais	35,04±2,29 <sup>a</sup>	21,50±1,47 <sup>b</sup>	17,30±1,10 <sup>b</sup>	30,68±1,94 <sup>a</sup>	10,50±1,46 <sup>c</sup>

NAP - não apoptótica, APT - apoptótica e DGC - Centrifugação em gradiente de densidade. Letras Diferentes nas linhas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



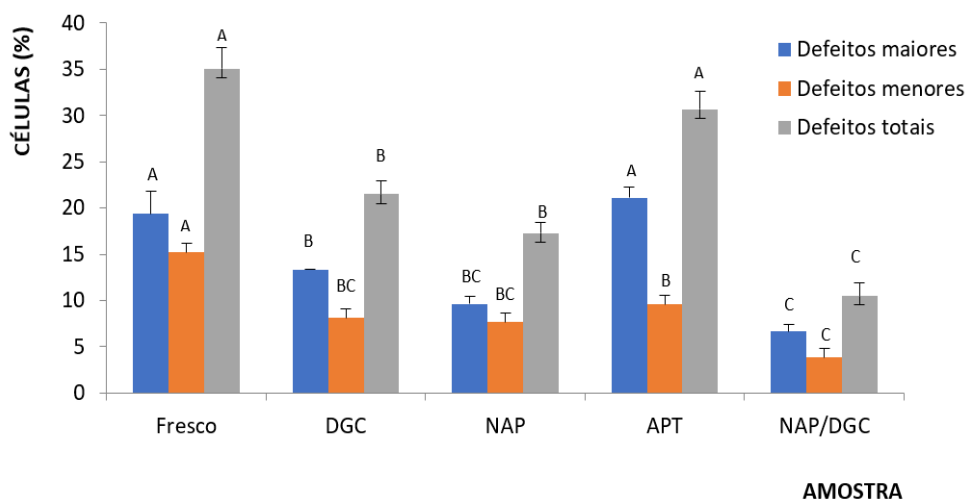


Figura 16 - Defeitos morfológicos maiores, menores e totais verificadas nos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT, NAP-DGC em touros da raça Nelore. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

Na análise das Tabelas 1 e 2 e Figura 16 notamos que a separação por DGC aumentou a motilidade progressiva dos espermatozoides em torno de 15 % em relação ao sêmen fresco porém sem diferença significativa entre elas, pois esta técnica retira do meio as células com problemas de movimentação, como foi verificado também por Oliveira et al. (2011) que afirmaram que as melhores células em termos de movimento flagelar são selecionadas por este método. Se compararmos a motilidade da NAP com APT a queda foi maior que 30%, mostrando que a MACS também é capaz de retirar células que não se movimentam. Já a NAP-DGC apresentou baixa motilidade progressiva talvez devido ao número de procedimentos a que a célula foi submetida e o tempo grande dispendido nas análises, como mostra a pesquisa de Assumpção et al. (2021b). Rawe et al. (2009) e Berteli et al. (2017) afirmaram que a redução de motilidade após MACS é devido às forças mecânicas e magnéticas dentro da coluna que podem levar a defeitos na cauda com queda na motilidade, porém com alta quantidade de células vivas. A motilidade total não mostrou diferença entre o fresco e o DGC, mas sim com as outras amostras.

Em termos de anormalidades espermáticas notamos que tanto o DGC como o MACS reduziram sua quantidade, sendo que a conjunção das duas análises (NAP-DGC) traduziu uma redução drástica, como visto na Tabela 2, onde observamos que o total de defeitos reduz mais de 70%. Da mesma forma observamos que os defeitos maiores e menores foram variáveis entre as amostras. A APT sempre apresentou elevada quantidade de defeitos, principalmente defeitos maiores.

A MACS é uma técnica excelente para separação celular, onde observamos que características como o aumento da motilidade progressiva e redução de anormalidades dos espermatozoides ocorrem após seleção pelo MACS, o que foi demonstrado, como neste estudo, em bovinos por Faezah et al. (2012), Odhiambo et al. (2014) e Assumpção et al. (2021b) e no sêmen humano por Dirican et al. (2008), Arrighi et al. (2009), Tavallee et al. (2012) e Berteli et al. (2017).

Analisando os defeitos individuais podemos observar que defeitos de cauda (Tabela 2) tiveram grande queda após a DGC em relação ao fresco. A DGC também contribuiu para redução dos outros defeitos das células espermáticas, mas de forma mais sutil. Em relação aos defeitos de cabeça, a MACS atuou de forma eficiente na redução destes defeitos, com quedas nos defeitos individuais na NAP em relação ao sêmen fresco. Os defeitos de cabeça como lesões do acrossoma, contorno anormal e delgado na base também mostraram diferenças entre as amostras, o que não ocorreu para delgado e piriforme.

Em outros defeitos como cabeça isolada normal, a DGC reduziu em 50% sua quantidade, enquanto na NAP a redução foi de 84%, mostrando diferença significativa entre fresco e as demais amostras. Já para defeitos de peça intermediária, a DGC mostrou-se eficiente reduzindo em 78%, mas a NAP praticamente não teve variação e também não houve diferença entre as amostras. Analisando as gotas citoplasmáticas proximais e distais notamos que as técnicas de DGC e MACS não tiveram boa eficiência na redução destes tipos de anormalidades. Aziz et al. (2007) e Dirican et al. (2008) verificaram similar padrão da morfologia espermática entre as frações de gradiente de densidade com a não apoptótica que apresentou baixa quantidade de cabeças anormais, gotas citoplasmáticas, defeitos de acrossoma e de peça intermediária, porém significativamente diferente com a fração apoptótica, como nesta pesquisa.

A Figura 17 traz os valores médios encontrados de integridade de membrana e potencial mitocondrial das células espermáticas e o número de células com membrana íntegra (“vivos”) obtidas no teste supravital verificadas nas cinco amostras de sêmen analisadas.

Na Figura 18 temos a análise da integridade de membrana pela citometria de fluxo.

A Figura 19 mostra a integridade de membrana espermática avaliada pelo teste supravital no esfregaço corado com eosina-nigrosina.

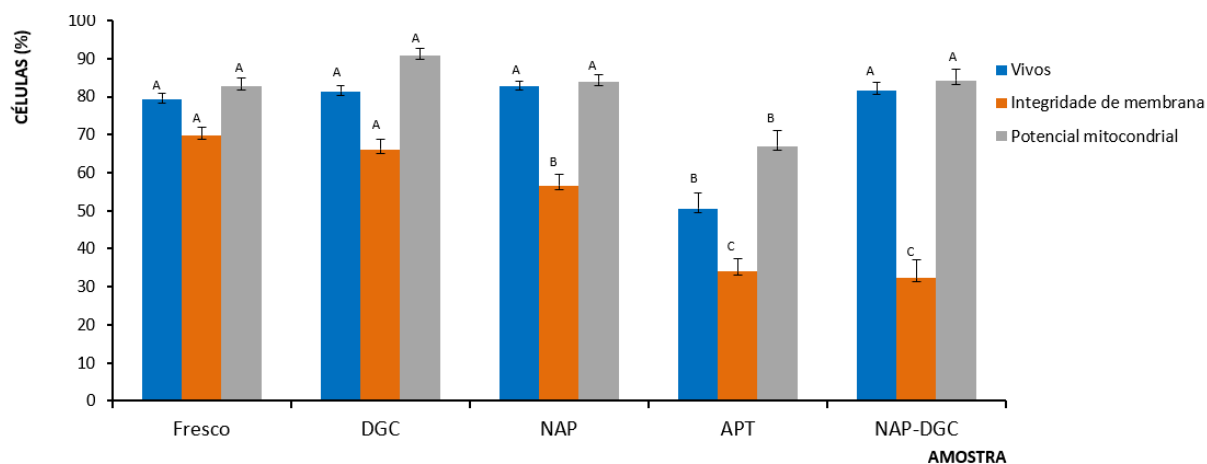


Figura 17 – Total de membranas íntegras (“vivos”), integridade de membrana (sondas fluorescentes) e potencial mitocondrial das células espermáticas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP, APT, NAP-DGC em touros da raça Nelore. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

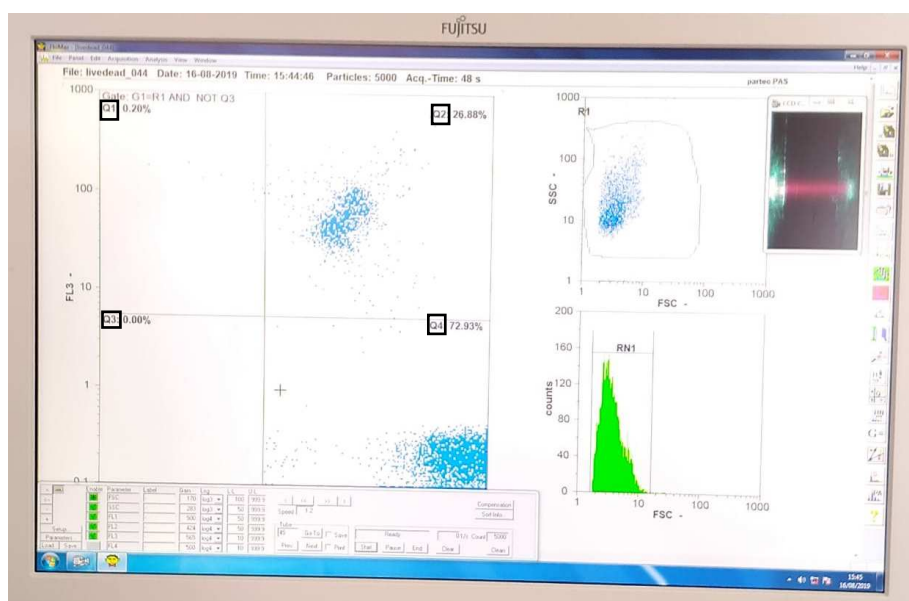


Figura 18 – Análise da integridade de membrana pela citometria de fluxo em espermatozoides bovinos frescos. Q1: espermatozoides com membrana lesada; Q2: espermatozoides moribundos (lentos); Q3: não representa nada; Q4: espermatozoides com membrana íntegra.



Figura 19 – Fotomicrografia de espermatozoides bovinos corados com corante eosina-nigrosina (teste supravital). Célula corada está com membrana lesada e não corada está com membrana íntegra. Ampliação de 1000 X.

Analisando a Figura 17 notamos que o número de células com membrana íntegra foi semelhante nas amostras com exceção da APT onde teve uma queda para 50%, reafirmando assim que tanto as técnicas de DGC quanto MACS são eficientes em retirar células com lesão de membrana da amostra de sêmen, como observado por Assumpção et al. (2021b). Apesar de não significativa a diferença, a NAP apresentou uma elevação de 4% no número de células vivas em relação ao sêmen fresco. Grunewald et al. (2006) e Faezah et al. (2012) observaram que MACS separa as subpopulações com membrana íntegra resultando maior número de células vivas, o que foi detectado no teste supravital.

Em relação à integridade de membrana avaliada pela sonda fluorescente, não houve diferença entre o fresco e DGC, mas sim destas com as outras amostras, porém a NAP teve uma grande diferença da APT (56,6% e 34,0%, respectivamente) mostrando mais uma vez a eficiência da MACS em retirar células com lesão de membrana que possivelmente já estão entrando em apoptose. Nesta pesquisa tivemos uma baixa integridade de membrana na amostra NAP-DGC (32,3%), que acreditamos ser devido ao alto grau de manuseio destas células durante as análises que pode ter provocado lesão em sua membrana. Aziz et al. (2007), Rawe et al. (2009), Faezah et al. (2012) mostraram que MACS separa células com membrana íntegra e também reduz o estresse oxidativo das amostras, resultando em menor número de células apoptóticas. Manuel et al. (2017) verificaram que a MACS é capaz de reduzir de 60 a 70% as células apoptóticas da amostra.

Também verificando a Figura 17, podemos notar que o potencial mitocondrial foi semelhante nas amostras, com exceção da APT onde teve uma queda de quase 20%. Kasai et al. (2002) e Zorn et al. (2012) mostraram que a capacidade de fertilização dos espermatozoides está ligada

à sua motilidade e é dependente da função mitocondrial, mostrando que a avaliação do potencial de membrana mitocondrial serve como parâmetro para inferir a fertilidade das células, pois quando este está alto temos uma boa qualidade espermática.

## 5.2. Cervídeos

A motilidade média observada no sêmen fresco em *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* foi de 70% e no *M. americana* foi de 85% e o vigor variou de 2-3 entre as espécies. As motilidades observadas nesta pesquisa são semelhantes às observadas em *M. americana* por Rola et al. (2013), em *M. gouazoubira* por Perroni (2013), em *M. nana* por Abreu et al. (2009).

Os valores médios de motilidade progressiva das células espermáticas obtidas nas quatro amostras do sêmen analisadas foram: fresco  $75 \pm 4,28\%$ , DGC  $71,66 \pm 7,49\%$ , NAP  $18,33 \pm 3,07\%$  e APT  $16,66 \pm 2,1\%$ . Não houve diferença significativa entre fresco e DGC e entre NAP e APT. A motilidade progressiva dos espermatozoides foi semelhante entre sêmen fresco e a DGC, mas foi extremamente baixa na NAP e APT talvez devido a maior sensibilidade da célula espermática na espécie, ao número de procedimentos a que a célula foi submetida e o tempo grande dispendido nas análises, o que foi observado por Assumpção et al. (2021). Rawe et al. (2009) e Berteli et al. (2017) afirmaram que a redução na motilidade após separação magnética é devido às forças mecânicas e magnéticas dentro da coluna que podem levar a defeitos na cauda com queda na motilidade, porém com alta quantidade de células vivas.

A Figura 20 mostra os valores médios das anormalidades maiores, menores e totais das células espermáticas obtidas nas amostras do sêmen analisadas.

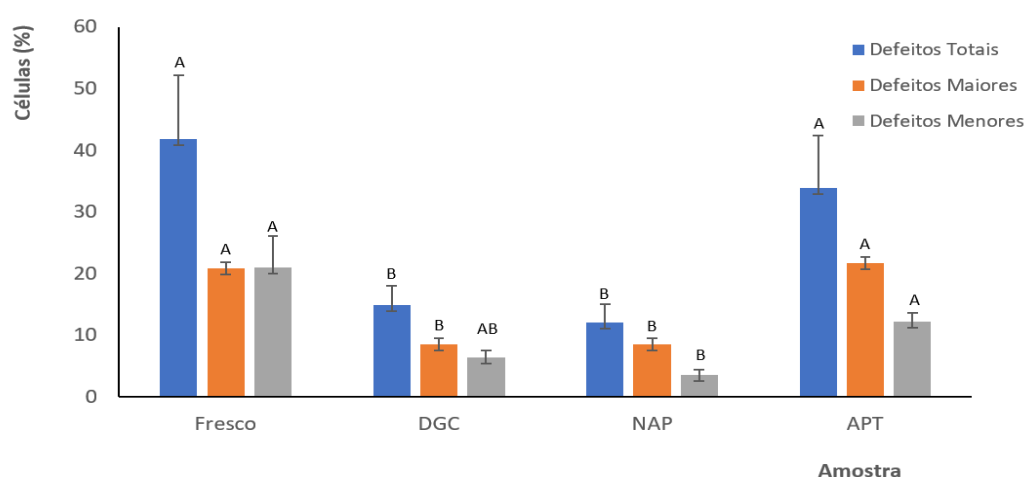


Figura 20 - Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas dos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em cervídeos do gênero *Mazama*. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

O total médio de anormalidades verificadas no sêmen fresco em *M. gouazoubira* foi de 48%, *M. nemorivaga* de 61% e no *M. americana* foi de 14% (média de  $41,83 \pm 10,25\%$ , sendo  $20,83 \pm 6,63\%$  de maiores e  $21,0 \pm 5,1\%$  de menores). A elevada quantidade de anormalidades espermáticas no sêmen fresco mostra que a qualidade de sêmen é ruim nas espécies de cervídeos, sendo muito variável entre espécies. Trabalhando com espécies iguais a desta pesquisa, Rola et al. (2013) verificaram em *M. americana* valores muito inferiores ao deste estudo, enquanto para *M. nemorivaga* foi observado por Perroni et al. (2012) valores semelhantes. Em *M. gouazoubira* Perroni et al. (2012, 2013), Assumpção e Santos (2017) e Assumpção et al. (2019) observaram um total de anormalidades espermáticas muito próximos ao encontrado neste estudo.

O total de anormalidades (Figura 20) no sêmen fresco foi alto, mas semelhante ao obtido na APT, sendo que DGC e a NAP apresentaram queda expressiva nestas quantidades. Em cervídeos, a elevada porcentagem de anormalidades morfológicas pode ser considerada de origem genética, resultado de alterações ambientais ou estresse constante. Em animais de cativeiro, como os animais desta pesquisa, a causa mais provável seria o estresse causado pela redução de liberdade, aprisionamento e imposição da convivência constante com outros indivíduos, já que os cervídeos vivem a maior parte do tempo isolados quando livres na natureza (Duarte e Merino 1997).

Quando comparamos as técnicas de DGC e SEAM verificamos que ambas foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas, retirando principalmente defeitos de cauda e cabeça, o que afirma Assumpção et al. (2021). Como nesta pesquisa, Bucar et al. (2015) e Berteli et al. (2017) também mostraram a eficiência do MACS na seleção de espermatozoides funcionais no sêmen humano com bons resultados nas taxas de fertilização.

A SEAM se mostrou, neste estudo, muito efetiva na seleção de espermatozoides funcionais de alta qualidade de cervídeos, como verificado também por Faezah et al. (2012) e Assumpção et al. (2021b) em bovinos e por Aziz et al. (2007), Gil et al. (2013) e Berteli et al. (2017) no sêmen humano.

A Tabela 3 mostra os valores médios das anormalidades individuais das células espermáticas obtidas nas quatro amostras de sêmen analisadas. Todas as variáveis foram significativas nas análises de variância com  $p < 0,05$ .

Tabela 3 - Média de anormalidades dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em três espécies de cervídeos do gênero *Mazama* (valores em porcentagem, média  $\pm$  EPM).

	fresco	DGC	NAP	APT
Abaxial/ retroaxial	0,67 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>
Acrossoma	0,17 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>
Cabeça isolada normal	2,33 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
Cabeça isolada patológica	7,67 $\pm$ 4,93 <sup>a</sup>	2,80 $\pm$ 2,14 <sup>b</sup>	0,83 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	0,83 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>
Cauda dobrada	6,00 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	1,83 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	5,00 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>
Cauda Enrolada	6,17 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	1,17 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	2,83 $\pm$ 0,95 <sup>ab</sup>
Cauda fort. dobrada enrolada	6,83 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	2,67 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>	4,00 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>
Contorno anormal	3,00 $\pm$ 2,97 <sup>ab</sup>	2,33 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	1,50 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	6,83 $\pm$ 2,40 <sup>b</sup>
Defeito de peça intermediária	0,83 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	1,00 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
Delgado	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
Delgado na base	1,67 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>
Gota citoplasmática distal	1,50 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>
Gota citoplasmática proximal	3,33 $\pm$ 3,35 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	3,67 $\pm$ 2,91 <sup>a</sup>
<i>Pouch formation</i>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>

NAP - não apoptótica, APT - apoptótica e DGC - Centrifugação em gradiente de densidade. Letras diferentes entre colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Foi utilizada como referência para classificação das anormalidades espermáticas dos cervídeos a classificação já existente para mamíferos domésticos (CBRA, 2013), pois ainda não há classificação de anormalidades proposta para esta espécie. Neste estudo, foram observados 14 tipos de anormalidades espermáticas, sendo 4,84% de cabeça, 10% de cabeças isoladas (normal e patológica) e 25,86% de cauda e peça intermediária, semelhante ao relatado por Assumpção et al. (2021). Como neste estudo, Abreu et al. (2009) encontraram em *Mazama nana* também maior incidência de defeitos de cauda (25,95  $\pm$  6,54) que de cabeça (13,80  $\pm$  6,10), o mesmo observado por Assumpção et al. (2019) em *M. gouazoubira* com 4% de anormalidades de cabeça e 32% de cauda. Peroni et al. (2012) encontraram tipos de anormalidades semelhantes à deste estudo em *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*.

Analisando os defeitos individuais podemos observar que defeitos de cauda (Tabela 3) tiveram grande queda após a DGC em relação ao fresco. A DGC também contribuiu para redução dos outros defeitos das células espermáticas, mas de forma mais sutil. A SEAM atuou de forma eficiente na redução dos defeitos de cabeça como contorno anormal e delgado na base. Em outros defeitos como cabeças isoladas, tanto a DGC quanto a SEAM reduziram suas quantidades,

mostrando diferença significativa no caso das cabeças isoladas patológicas. Analisando as gotas citoplasmáticas proximais e distais notamos que as técnicas de DGC e SEAM não tiveram boa eficiência na redução destes tipos de anormalidades.

Vale notar a SEAM também atuou na redução de defeitos ligados à cauda do espermatozoide como cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente dobrada e enrolada, onde a NAP apresentou diferença com as outras amostras. Arrighi et al. (2009) observaram que a FS está presente em 61,4 % das membranas dos espermatozoides em todas as regiões (cabeça, peça intermediária e cauda), explicando assim a ligação da ANX/nanopartículas na região da cauda, retirando estes defeitos durante a SEAM.

Resultados semelhantes aos deste estudo na morfologia espermática foram verificadas por Aziz et al. (2007) e Dirican et al. (2008), com padrão semelhante da morfologia entre as frações de gradiente de densidade e NAP que apresentaram baixa quantidade de cabeças anormais, gotas citoplasmáticas, defeitos de acrossoma e de peça intermediária, porém significativamente diferente com a fração apoptótica (APT).

A Figura 21 traz os valores médios encontrados no número de células com membrana íntegra obtidas no teste supravital verificadas nas quatro amostras de sêmen analisadas. Não foi observada diferença entre as amostras fresco, DGC e NAP, mas sim destas com a APT.

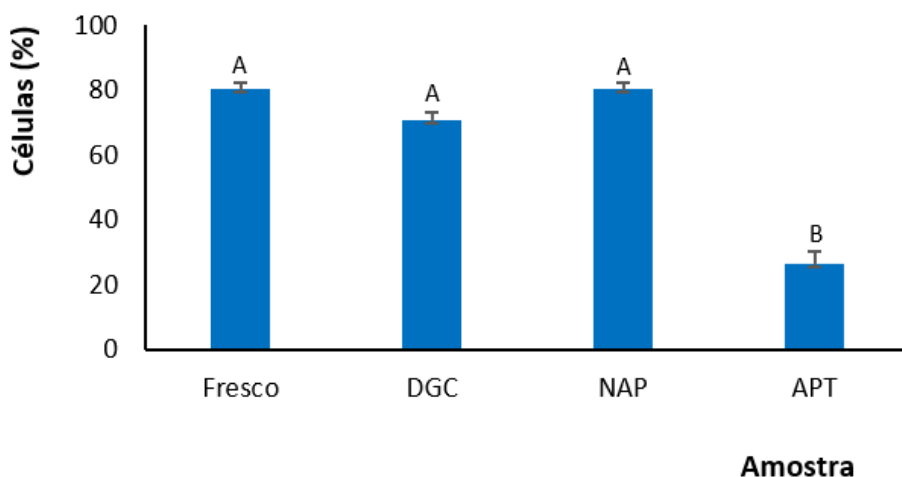


Figura 21 – Total de células espermáticas com membranas íntegras (“vivos”) pelo teste supravital nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em três espécies de cervídeos do gênero *Mazama*. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

Analisando a Figura 21 notamos que o número de células com membrana íntegra (“vivos”) foi semelhante nas amostras com exceção da APT onde teve uma queda para 67% em relação à NAP, reafirmando assim que tanto as técnicas de DGC quanto SEAM são eficientes em retirar



células com membrana lesada da amostra de sêmen. Apesar de não significativa a diferença, a NAP apresentou uma elevação de 10,5 % no número de células com membrana íntegra em relação à DGC. Faezah et al. (2012) observaram no teste supravital que MACS separa as subpopulações com membrana íntegra resultando em maior número de células vivas. Aziz et al. (2007) e Rawe et al. (2009) analisando a integridade de membrana mostraram que MACS separa células com membrana íntegra e também reduz o estresse oxidativo das amostras e Manuel et al. (2017) afirmaram que esta técnica reduz em 60 a 70% o número de células apoptóticas.

### 5.3. Equinos

A motilidade média observada no sêmen fresco dos animais foi de  $48,5 \pm 27,1\%$ . As motilidades observadas nesta pesquisa foram baixas na maioria dos animais, porém não diferem dos relatos da literatura de Fernandes e Pimentel (2002), Mari et al. (2011), Ebel et al. (2020) e de Greiser et al. (2020). Porém a interpretação de motilidade progressiva deve ser cautelosa e feita em conjunto com outros achados clínicos, pois segundo Varner (2008) e Love (2016) as condições de laboratório, tipo de equipamento e experiência do avaliador podem alterar a motilidade intrínseca do espermatozoide do garanhão. Um garanhão pode exibir motilidade espermática “normal”, mesmo com grande porcentagem de espermatozoides morfolologicamente anormais e a fertilidade pode ser reduzida pois algumas células com anormalidades podem exibir motilidade (Love, 2011 e 2016).

A motilidade progressiva das células espermáticas foi observada apenas no sêmen fresco, pois a qualidade do ejaculado estava ruim e a maioria das amostras deu motilidade 0% nas outras amostras analisadas (DGC, NAP e APT). Apenas um animal que teve motilidade inicial de 80% no ejaculado, apresentou resultado pós DGC de 50%, esta redução corrobora com o afirmado por Alvarenga et al. (2012) e Pessoa et al. (2020) sobre a redução de motilidade pós centrifugação, pois é importante a associação entre a força centrífuga e a sua duração que estão diretamente ligadas a danos causados às células espermáticas e a quantidade de células recuperadas. No entanto, Mari et al. (2011), Lindahl et al. (2012) e Morell (2012) observaram um aumento de motilidade dos espermatozoides em garanhões após DGC quando utilizaram apenas uma camada de Percoll, e afirmam que a altura e densidade da coluna oferecem um desafio extra para a migração de espermatozoides, resultando em um contato prolongado com o Percoll, o que pode levar a uma queda na sua motilidade.

A motilidade progressiva dos espermatozoides foi zero na NAP e APT talvez devido a maior sensibilidade do espermatozoide na espécie, ao número de procedimentos a que a célula foi submetida, o tempo grande dispendido nas análises, as forças mecânicas e magnéticas dentro

da coluna que podem levar a defeitos na cauda com queda na motilidade (Rawe et al., 2009). Alta sensibilidade da célula espermática, devido suas proporções relativas de lipídios de alta densidade na membrana celular já é conhecida em equinos (Garcia et al., 2011; Gautier e Aurich, 2021), assim como nos suínos. Pesquisas de Mrkun et al. (2014) e Deori et al. (2022) em varrões mostraram que a motilidade progressiva diminuiu após a separação por MACS, mostrando valores muito baixos ou zerados nas frações pós filtração e afirmam que a técnica MACS exige mais refinamento antes que possa ser útil para processamento de espermatozoides de suínos, o que acreditamos ser semelhante para equinos.

A Figura 22 mostra os valores médios das anormalidades maiores, menores e totais das células espermáticas obtidas nas amostras de sêmen analisadas.

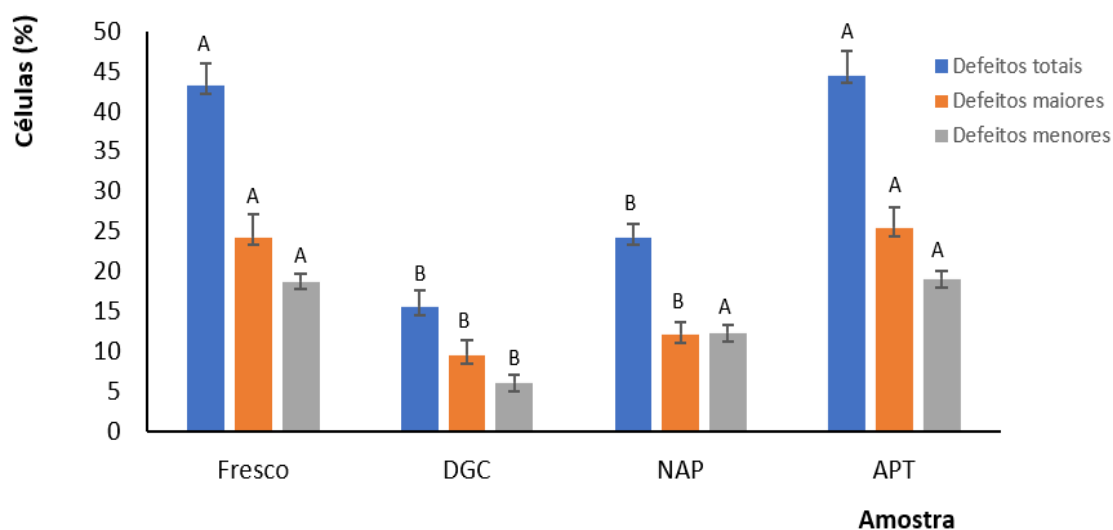


Figura 22 - Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas dos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

A média de anormalidades totais verificadas no sêmen fresco foi de  $43,20 \pm 2,78\%$ , sendo  $24,40 \pm 2,89$  de defeitos maiores e  $18,80 \pm 3,43$  de defeitos menores. A grande quantidade de anormalidades espermáticas no sêmen fresco mostra que a qualidade de sêmen é ruim nos equinos, sendo muito variável entre os animais. Esta pesquisa está dentro do obtido nos ganhões, como afirmado na literatura, os quais relatam a taxa de normalidade espermática de  $55,5 \pm 2,8\%$  (Fernandes e Pimentel, 2002),  $33,5 \pm 6,8\%$  (Mari et al., 2011),  $50\%$  (Serafini et al., 2014) e  $51 \pm 18\%$  (Love, 2016).

O total de anormalidades (Figura 22) no sêmen fresco foi alto, mas semelhante ao obtido na APT ( $44,5 \pm 2,96\%$ ), sendo que as outras amostras apresentaram queda nestas quantidades, DGC

( $15,6 \pm 2,10$ ) e a NAP ( $24,30 \pm 1,63$ ). Os achados da fração APT podem ser devido aos marcadores apoptóticos positivos específicos dos espermatozoides nos equinos que traduzem alterações de membrana de 4,8 a 19,2%, dependente do garanhão (Ortega-Ferrusola et al., 2009).

Em equinos, a DGC mostrou neste estudo uma redução na porcentagem de anormalidades morfológicas, como também relatado por Brum et al. (2008), Mari et al. (2011), Lindahl et al. (2012) e Battut et al. (2016). Brum et al. (2008) afirmaram ainda que a técnica de DGC é capaz de separar efetivamente subpopulações de células com alterações apoptóticas e imaturas do ejaculado. Quando comparamos as técnicas de DGC e SEAM verificamos que ambas foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas, retirando principalmente defeitos de cauda e cabeça, respectivamente. Como nesta pesquisa, Bucar et al. (2015) e Berteli et al. (2017) também mostraram a eficiência do MACS na seleção de espermatozoides funcionais no sêmen humano com bons resultados nas taxas de fertilização.

A SEAM se mostrou, neste estudo, efetiva na seleção de espermatozoides funcionais de equinos, porém não tão efetiva como verificado por Odhiambo et al. (2014) e Assumpção et al. (2020) em bovinos e por Aziz et al. (2007), Gil et al. (2013), e Berteli et al. (2017) no sêmen humano. Já nos suínos, Deori et al. (2022) obtiveram um enriquecimento da qualidade do sêmen utilizando a MACS, porém Mrkun et al. (2014) observaram uma queda na quantidade de células normais com redução de  $67,2 \pm 17,0\%$  (fresco) para  $31,8 \pm 12,6\%$  (não apoptótica) e  $5,9 \pm 7,3\%$  (apoptótica), indicando que as alterações morfológicas dos espermatozoides podem ter ocorrido durante o MACS, sendo que a razão disto pode ser que a membrana do espermatozoide do suíno é mais suscetível do que o espermatozoide de outras espécies, ao procedimento MACS. Acreditamos que o sêmen equino possa se comportar semelhante ao suíno devido sua sensibilidade, necessitando mais estudos para adaptação da técnica para esta espécie.

A Tabela 4 mostra os valores médios das anormalidades individuais das células espermáticas obtidas nas quatro amostras de sêmen analisadas.

Tabela 4 – Média de anormalidades dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos (valores em porcentagem, média ± EPM).

	fresco	DGC	NAP	APT
Acrossoma	3,00±0,44 <sup>a</sup>	0,60±0,40 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	3,30±0,73 <sup>a</sup>
Cabeça isolada normal	3,80±1,66 <sup>a</sup>	1,50±0,68 <sup>a</sup>	3,70±1,41 <sup>a</sup>	1,00±0,39 <sup>a</sup>
Cauda dobrada	7,80±0,98 <sup>ab</sup>	2,40±0,71 <sup>c</sup>	3,80±0,72 <sup>ac</sup>	9,10±1,62 <sup>b</sup>
Cauda enrolada	7,20±1,51 <sup>ab</sup>	2,20±0,72 <sup>b</sup>	4,50±0,88 <sup>ab</sup>	9,00±2,11 <sup>a</sup>
Cauda fort. dobrada enrolada	4,40±0,80 <sup>a</sup>	0,60±0,33 <sup>b</sup>	3,80±0,74 <sup>a</sup>	3,70±0,61 <sup>a</sup>
Contorno anormal	4,30±1,22 <sup>a</sup>	1,20±0,53 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	4,50±1,04 <sup>a</sup>
Defeito de peça intermediária	6,60±1,06 <sup>ab</sup>	3,40±0,71 <sup>a</sup>	4,30±0,66 <sup>a</sup>	8,30±1,50 <sup>b</sup>
Delgado na base	0,70±0,59 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,50±0,30 <sup>a</sup>
Gota citoplasmática proximal	4,00±0,97 <sup>a</sup>	2,80±0,70 <sup>a</sup>	3,10±0,70 <sup>a</sup>	3,6±1,32 <sup>a</sup>
Teratológico	1,40±0,96 <sup>a</sup>	0,90±0,69 <sup>a</sup>	1,10±0,45 <sup>a</sup>	1,50±0,89 <sup>a</sup>

NAP - não apoptótica, APT - apoptótica e DGC - Centrifugação em gradiente de densidade. Letras diferentes entre colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Neste estudo, foram observados 10 tipos de anormalidades espermáticas, sendo 9,4% de cabeça e 33,8% de cauda e peça intermediária, achados semelhantes aos de Fernandes e Pimentel (2002) e Love (2016), sendo que os defeitos de maior incidência foram defeitos de peça intermediária, cauda enrolada e cauda dobrada. Analisando os defeitos individuais podemos observar que defeitos de cauda (Tabela 4) tiveram grande queda após a DGC em relação ao fresco. A DGC também contribuiu para redução dos outros defeitos das células espermáticas, mas de forma mais sutil, como obtido também por Lindahl et al. (2012) que utilizaram esta técnica para selecionar espermatozoides morfológicamente normais com cromatina intacta e boa motilidade progressiva, recomendando esta técnica para ser incorporada na rotina normal de processamento do sêmen do garanhão.

A SEAM atuou de forma eficiente na redução dos defeitos de cabeça como acrossoma e contorno anormal. Em outros defeitos como cabeças isoladas, a DGC foi mais efetiva que a NAP na redução de suas quantidades, mostrando diferença significativa no caso das cabeças isoladas normais. Analisando as gotas citoplasmáticas proximais notamos que as técnicas de DGC e SEAM não tiveram boa eficiência na redução destes tipos de anormalidades.

Vale notar a SEAM também atuou na redução de defeitos ligados à cauda do espermatozoide como cauda dobrada e cauda enrolada. Arrighi et al. (2009) observaram que a FS está presente nas membranas dos espermatozoides em todas as regiões, explicando assim também ligação da ANX/nanopartículas na região da cauda, retirando estes defeitos durante a SEAM. Resultados

semelhantes aos deste estudo na morfologia espermática foram verificadas por Aziz et al. (2007), Dirican et al. (2008) e Assumpção et al. (2021b), com padrão semelhante da morfologia entre as frações de DGC e NAP que apresentaram baixa quantidade de cabeças anormais, gotas citoplasmáticas, defeitos de acrossoma e de peça intermediária, porém significativamente diferente com a fração apoptótica (APT).

A Figura 23 traz os valores médios encontrados no número de células com membrana íntegra obtidas no teste supravital (eosina-nigrosina) verificadas nas quatro amostras de sêmen analisadas. Não foi observada diferença entre as amostras DGC e NAP, mas sim destas com fresco e APT.

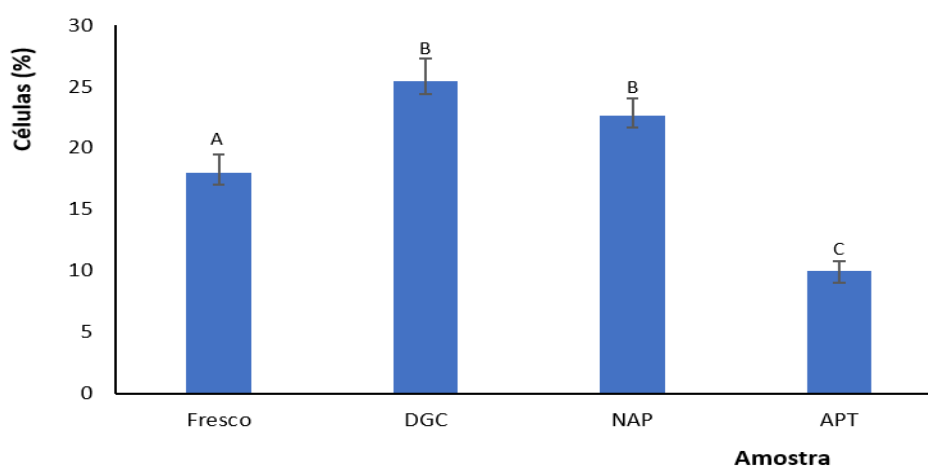


Figura 23 – Total de células espermáticas com membrana íntegra (“vivos”) nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em equinos. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

A técnica de coloração com eosina-nigrosina tem sido utilizada por vários pesquisadores para avaliar a integridade de membrana do espermatozoide (Battut et al., 2016; Love, 2016; Pessoa et al., 2020). Analisando a Figura 23 notamos que o número de células com membrana íntegra foi semelhante nas amostras DGC e NAP, com aumento em relação ao fresco e uma redução na APT com uma queda de mais de 50% em relação a NAP, reafirmando assim que tanto as técnicas de DGC quanto SEAM são eficientes em retirar células com membrana lesada da amostra de sêmen. Faezah et al. (2012) observaram no teste supravital que MACS separa as subpopulações com membrana íntegra resultando maior número de células vivas, o mesmo observado por Assumpção et al. (2021b). Rawe et al. (2009) e Berteli et al. (2017) afirmaram que apesar da redução de motilidade espermática observada após MACS a quantidade de células vivas recuperada após os procedimentos é elevada.

#### 5.4. Gatos

A coleta de sêmen por cateterismo uretral neste estudo se mostrou eficiente na obtenção de amostras de sêmen em gatos após o uso de agonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos, neste caso sendo utilizado a dexmedetomidina. É uma técnica rápida e de alta aplicabilidade em programas de reprodução assistida em felinos, que segundo Madrigal-Valverde et al. (2021) o uso da dexmedetomidina é uma alternativa mais viável e econômica à medetomidina em gatos domésticos, pois apenas um quarto da dose desta é suficiente para uma boa Coleta por cateterização uretral, reduzindo assim o custo do procedimento. Comparando a eficiência de outros fármacos, medetomidina e detomidina, Silva et al. (2021) verificaram em gatos domésticos que a melhor qualidade na Coleta e do ejaculado foi com o primeiro fármaco, e afirmam o uso da detomidina traduz amostras azoospermicas, relaxamento uretral deficiente, volume insuficiente ou contaminação de urina. A técnica de cateterização uretral com uso de agonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos está bem relatada também por outros pesquisadores como Pukazhenthil et al. (2006), Zambelli et al. (2008), Scrollavezza et al. (2009), Filliers et al. (2010), Prochowska et al. (2015, 2021), Swanson et al. (2017), entre outros.

Os valores médios de motilidade total e progressiva verificado nos gatos deste estudo foram, respectivamente,  $63,7 \pm 14,9$  % e  $31,5 \pm 12,6$  %, valores estes próximos aos relatados por Scrollavezza et al. (2009), Vieira et al. (2009), Filliers et al. (2010), Prochowska et al. (2021), Silva et al. (2021) e Hidalgo et al. (2022). Já as pesquisas de Scrollavezza et al. (2009), Swanson et al. (2017) e Madrigal-Valverde et al. (2021) encontraram valores bem mais elevados do que os deste estudo tanto na motilidade total como na progressiva, talvez devido o fármaco utilizado ou as características dos animais utilizados no estudo.

As análises de sêmen dos gatos foram complicadas pelo pequeno volume dos ejaculados obtidos, o que comprometeu a realização de algumas análises por falta de material suficiente. O teste de DGC foi possível em apenas 50% dos animais, assim como análise de motilidade pós SEAM feita apenas em 3 animais. A motilidade média total obtida na DGC foi  $34,6 \pm 33,7$  %, sendo que um animal apresentou 90% de motilidade e dois outros apenas 9%, reafirmando assim a variabilidade das respostas ao DGC na espécie. Há poucos relatos do uso desta técnica em gatos domésticos, mas Howard et al. (1990 e 1993) relataram elevação de 50% na motilidade após o *swim-up* principalmente nos gatos teratospérmicos, enquanto Filliers et al. (2008) obtiveram 80,8 % de motilidade total e 69,9% de progressiva após o DGC, muito superior ao obtido nesta pesquisa.

A resposta foi fraca na motilidade pós SEAM, sendo NAP dos 3 animais com média de 30% de motilidade e a APT 0%, não encontramos explicação na literatura para este resultado mas

acreditamos que número de procedimentos a que a célula foi submetida e o tempo grande gasto nas análises pode ter contribuído para este resultado, pois segundo Rawe et al. (2009) a redução da motilidade após MACS é devido às forças mecânicas e magnéticas dentro da coluna que podem levar a defeitos na cauda com queda na motilidade.

A Tabela 5 e a Figura 24 mostram os valores médios das anormalidades individuais, maiores, menores e totais das células espermáticas obtidas nas quatro amostras do sêmen analisadas. Todas as variáveis foram significativas nas análises de variância com  $p < 0,05$ .

Tabela 5 – Média de anormalidades individuais dos espermatozoides observadas nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos (valores em porcentagem, média  $\pm$  EPM).

	fresco	DGC	NAP	APT
Acrossoma	3,00 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	0,30 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2,20 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
Cabeça isolada normal	1,00 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
Cauda dobrada	8,40 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	3,00 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	4,90 $\pm$ 0,76 <sup>ab</sup>
Cauda Enrolada	7,10 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	2,80 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	5,10 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>
Cauda fort. dobrada enrolada	14,60 $\pm$ 3,40 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 1,11 <sup>ab</sup>	14,30 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>	17,30 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup>
Contorno anormal	5,10 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	5,70 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>
Defeito de peça intermediária	8,70 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	3,40 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	4,90 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	5,80 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>

NAP - não apoptótica, APT - apoptótica e DGC - Centrifugação em gradiente de densidade. Letras diferentes entre colunas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

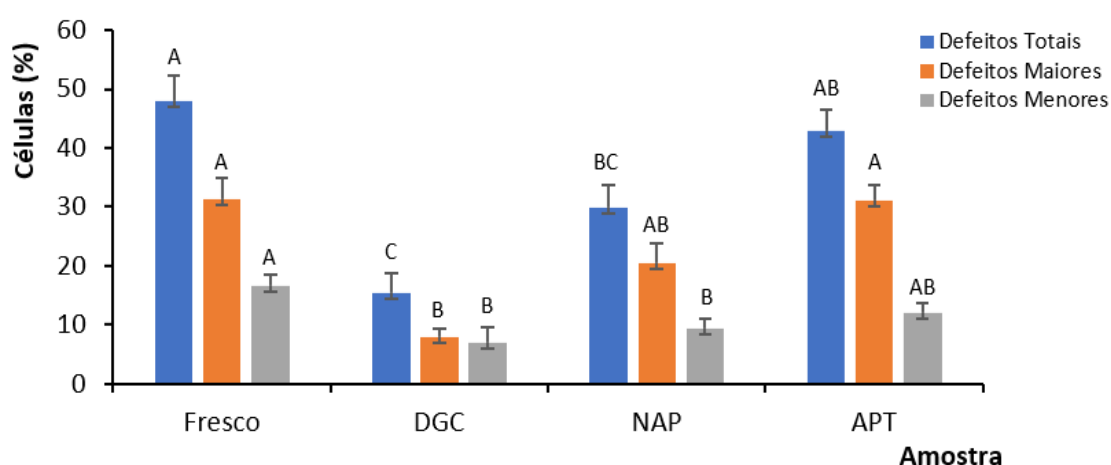


Figura 24 - Anormalidades morfológicas maiores, menores e totais verificadas nos espermatozoides nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

A média de anormalidades totais verificadas no sêmen fresco foi de  $47,9 \pm 4,47\%$ , sendo  $31,4 \pm 3,54$  de defeitos maiores e  $16,5 \pm 2,08$  de defeitos menores. A grande quantidade de anormalidades espermáticas no sêmen fresco mostra que a qualidade de sêmen é ruim nos gatos, sendo muito variável entre os animais, porém segundo Howard et al. (1993) os animais deste estudo estão classificados como normospérmicos, pois os animais teratospérmicos seriam aqueles que apresentam mais de 60% de células anormais no ejaculado. As médias totais de anormalidades registradas nesta pesquisa estão de acordo com o verificado por Axner e Fosberg (2007, Vieira et al. (2009), Villaverde et al. (2007) e Prochowska et al. (2015, 2021). No entanto, Madrigal-Valverde et al. (2021) observaram 36,7% de anormalidades totais sendo 12,2% de maiores e 23,50% de menores, diferente do que aqui observamos onde a maior quantidade foi de defeitos maiores da célula, como relatado também por Vieira et al. (2009).

A Tabela 5 mostra que foram encontradas neste estudo um total de 7 anormalidades espermáticas, prevalecendo os defeitos de cauda (fortemente dobrada e enrolada, dobrada e enrolada) e também de peça intermediária. A literatura relata resultados variados de anormalidades individuais em gatos, mas semelhantes ao deste estudo, onde a maioria descreve alta quantidade de defeitos de peça intermediária e cauda (Howard et al., 1993; Tebet et al., 2006; Zambelli e Cunto, 2006; Villaverde et al., 2008; Vieira et al., 2009; Prochowska et al., 2015; Madrigal-Valverde et al., 2021; Prochowska et al., 2021). Porém Zambelli e Cunto (2006) e Axner e Fosberg (2007) observaram também alta incidência de defeitos de cabeça, diferentemente do encontrado neste estudo. As variações encontradas nos diversos estudos podem estar relacionadas as técnicas de Coleta, pedigree dos animais, sazonalidade reprodutiva, abstinência nas cópulas, nutrição, fatores de saúde (Axner e Fosberg, 2007; Blottner e Jewgenow, 2007; Fontbonne et al., 2020).

A Tabela 5 e a Figura 24 mostram que os defeitos maiores e menores foram diferentes entre as amostras. A APT sempre apresentou elevada quantidade de defeitos, principalmente defeitos maiores. Em termos de anormalidades espermáticas notamos que tanto a DGC como a SEAM reduziram sua quantidade (Tabela 5), onde observamos que o total de defeitos pós DGC reduziu em torno de 70% as anormalidades em relação ao fresco. Howard et al. (1990, 1993) utilizando *swim-up* também duplicou o número de células com morfologia normal, sendo a técnica muito eficiente para amostras de animais teratospérmicos. Já Filliers et al. (2008) obtiveram 89,3% de células espermáticas normais após o DGC e afirmam que a melhor qualidade celular após o uso desta técnica pode ser atribuída à eliminação de bactérias, espécies reativas de oxigênio decorrentes de restos celulares e espermatozoides mortos. A SEAM é uma técnica excelente para separação celular, o que foi demonstrado, como neste estudo, em bovinos por Odhiambo



et al. (2014) e Assumpção et al. (2021b) e no sêmen humano por Tavallee et al. (2012) e Berteli et al. (2017).

Analisando os defeitos individuais podemos observar que defeitos de cauda e peça intermediária (Tabela 5) tiveram grande queda após a DGC (12,6%) em relação ao fresco (39,8%). Em relação aos defeitos de cabeça, a SEAM atuou de forma eficiente na redução destes defeitos, com quedas significativas nos defeitos individuais na NAP em relação ao sêmen fresco, verificado nas lesões do acrossoma e contorno anormal.

Em outros defeitos como cabeça isolada normal, a DGC aumentou sua quantidade, enquanto na NAP a redução foi de 50%, mostrando diferença entre fresco e as demais amostras. Já para defeitos de peça intermediária, a DGC mostrou-se eficiente reduzindo em mais de 50%, bem semelhante ao observado na NAP. Aziz et al. (2007) e Dirican et al. (2008) verificaram similar padrão da morfologia espermática entre as frações de DGC com as não apoptóticas que apresentaram baixa quantidade de cabeças anormais, defeitos de acrossoma e de peça intermediária, porém significativamente diferente com a fração apoptótica (APT), como nesta pesquisa.

A Figura 25 traz os valores médios de células com membrana íntegra (“vivos”) obtidas no teste supravital verificadas nas quatro amostras de sêmen analisadas. Houve uma pequena diferença significativa entre as amostras.

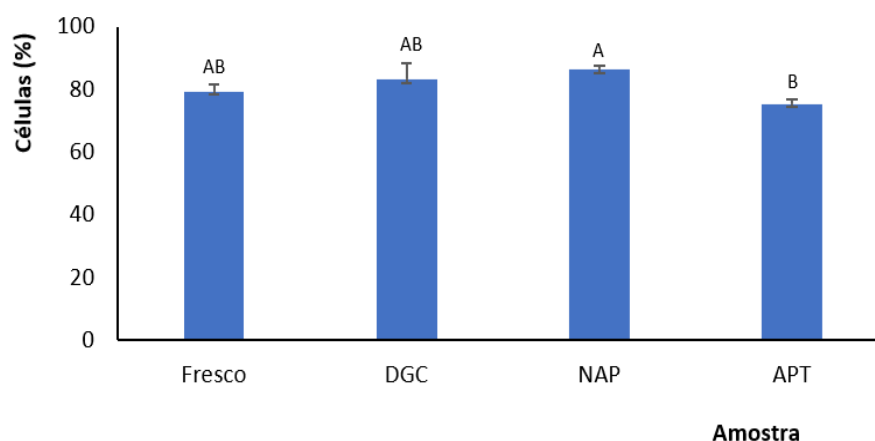


Figura 25 – Total de células com membrana íntegra (“vivos”) nas amostras de sêmen fresco, DGC, NAP e APT em gatos domésticos. Letras diferentes indicam diferença significativa,  $p < 0,05$  (média  $\pm$  EPM).

Analisando a Figura 25 notamos que o número de células com membrana íntegra foi semelhante nas amostras, com leve aumento nas amostras de DGC e NAP em relação ao fresco e uma redução na APT com uma queda de 13% em relação a NAP, reafirmando assim que tanto

as técnicas de DGC quanto SEAM são eficientes em retirar células mortas da amostra de sêmen. A técnica de coloração com eosina-nigrosina tem sido utilizada por vários pesquisadores para avaliar a integridade de membrana dos espermatozoides em gatos domésticos, que em sua maioria apresentam elevado número de células íntegras. Utilizando a mesma técnica de Coleta, Filliers et al. (2008), Zambelli et al. (2008), Prochowska et al. (2015); Madrigal-Valverde et al. (2021) observaram uma média de 72 a 89 % de com membrana íntegra dos espermatozoides no sêmen fresco, valores estes próximos ao verificado neste estudo.

## 6 CONCLUSÕES

- A seleção espermática por ativação magnética foi efetiva na seleção de espermatozoides de alta qualidade, com redução expressiva das anormalidades em bovinos, cervídeos, equinos e felinos domésticos.
- A subpopulação de espermatozoides não apoptóticos teve qualidade espermática morfolologicamente superior e maior viabilidade celular sendo indicada para uso nos processos de fertilização *in vivo* ou *in vitro*.
- A avaliação da membrana plasmática e do potencial de mitocôndrias mostrou que a técnica de seleção espermática por ativação magnética não interfere na estrutura celular, mantendo sua integridade.
- As técnicas de centrifugação em gradiente de densidade e de seleção espermática por ativação magnética foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas retirando defeitos de cauda e de cabeça dos espermatozoides.
- Este método nanotecnológico é eficiente na produção de amostras de sêmen de alta qualidade para procedimentos de reprodução assistida.
- Serão realizados estudos de fertilidade com as células selecionadas por ativação magnética para comprovação de sua qualidade.
- Ainda são necessários mais estudos para melhor entendimento das características particulares das células espermáticas de cada espécie, a fim de ajustes na técnica para maior eficiência.

## REFERÊNCIAS

- Abreu CO, Martinez AC, Moraes W, Juvenal JC, Moreira N (2009). Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). Pesquisa Veterinária Brasileira, 29: 993–998.
- Aitken RJ, Baker MA (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. International Journal Developmental Biology, 57: 265-272.
- Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB (2011). Apoptosis in the germ line. Reproduction, 141:139-150.
- Alvarenga MA, Papa FO, Carmo MT, Kievitsbosch T, Chaves MMBC, Ramires Neto C (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. Journal of Equine Veterinary Science, 32 (8): 424-429.
- Amann RP, Saacke RG, Barbato GF, Waberski D (2018). Measuring Male-to-Male Differences in Fertility or Effects of Semen Treatments. Annual Review of Animal Biosciences, 6:255–286.
- Amann RP, Waberski D (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology, 81 (1): 5-17.
- Angrimani DSR, Lucio CF, Veiga GAL, Silva LCG, Regazzi FM, Nichi M, Vannucchi CI (2014). Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. Andrologia, 46: 814–819.
- Animal Business, 2020. Terceiro maior rebanho do mundo, mercado de equinos aquece economia brasileira. Disponível em: <https://animalbusiness.com.br/>. Acesso em: 28/06/2022.
- Arrighi CV, Lucas H, Chardonnens D, Agostini A (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. Reproductive Biology and Endocrinology, 7: 1-12.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Leite TG, Oliveira LZ, Lançoni R, Rodrigues MP (2015). Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 39(1): 47-60.

ASBIA 2022 – Associação Brasileira de Inseminação artificial - Index 2021. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios>. Acesso em: 15/05/2022.

Assumpção TI, Santos ALQ (2017). Cryopreservation of genetic material collected post-mortem from male gray brocket deer *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814. *International Journal of Current Science and Technology*, 5(9): 510-512.

Assumpção TI, Santos ALQ, Cardoso GF (2019). Morfologia dos espermatozoides no trato reprodutivo de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814. In: Reunião anual da ABRAA, IV, Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2019, Goiânia. Anais ... p. 263-266. Campo Grande, MS: Editora UFMS, 2019, 269 p.

Assumpção TI, Santos ALQ, Duarte JMB, Foschini M, Vieira CS (2021). Selection of high-quality sperms by the nanotechnological method of magnetic activation in brazilian cervids. *Journal of Zoological Research*, 3 (2): 31-37.

Assumpção TI, Severo NC, Zandonaide JPB, Macedo GG, (2021a). Inter-relações entre as características qualitativas dos espermatozoides em bovinos. In: Reunião anual da ABRAA, V, Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2021, Evento virtual. Anais ... p. 229-232. Campo Grande, MS: Editora UFMS, 2021, 256 p.

Assumpção TI, Severo NC, Zandonaide JPB, Macedo GG, (2021b). Magnetic-activated cell sorting improves high quality spermatozoa in bovine semen. *Journal Animal Reproduction and Biotechnology*, 36: 91-98.

Axner E, Forsberg LC (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reproduction Domestic Animals*, 42:282–291.

Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A (2007). The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*, 22(5): 1413–1419.

Battut IB, Kempfer A, Becker J, Lebailly L, Camugli S, Chevrier L (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4): 1111-1131.

Bergstein TG, Weiss RR, Bicudo SD (2014) Técnicas de análise de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38(4): 189-194.

Berteli TS (2017). MACS (*Magnetic-activated cell sorting*) antes e após a centrifugação em gradiente de densidade para o preparo seminal. 74p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas, Ribeirão preto, SP, 2017.

Berteli TS, Broi MG, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA (2017). Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa, *Andrology*:1-7.

Blom E (1973). Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaer Medicine*, 25:383-391.

Blottner S, Jewgenow K (2007). Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reproduction Domestic Animals*, 42:536–540.

Brum AM, Sabeur K, Ball BA (2008). Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69: 1041–1055.

Bucar S, Gonçalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sa R (2015). DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *Journal Assisted Reproduction Genetics*, 32:147–154.

CAPES, 2022. Artigos de reprodução de bovinos. Disponível em: <https://www-periodicos-capes.gov.br.ez1.periodicos.capes.gov.br/>. Acesso em: 27/06/2022.

Caselles AB, Miro-Moran A, Morillo Rodriguez A, Gallardo Bolanos JM, Ortega-Ferrusola C, Salido GM, Pena FJ, Tapia JA, Aparicio IM (2014). Identification of Apoptotic Bodies in Equine Semen. *Reproduction Domestic Animals*, 49: 254–262.

CBRA (2013) Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 104 p.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 479-488.

COMAC - Comissão de Animais de Companhia, 2021. Gatos no mercado pet. Disponível em <https://sindan.org.br/>. Acesso em 29/06/2022.

Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spano M (2005). Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72: 273-279.

Curti G, Skowronek F, Vernochi R, Rodriguez-Buzzi AL, Rodriguez-Buzzi JC, Casanova G, Sapiro R (2014). Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). *Reproductive Biology*, 14: 289-292.

Danis RB, Samplaski MK (2019) Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports*, 20 (43): 1-8.

Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otzdorff C (2016). Sperm membrane integrity in fresh and frozen–thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the Nucleo Counter SP-100. *Theriogenology*, 86 (2):651-656.

Deori S, Ntallaris T, Wallgren M, Morrell JM, Johannisson A (2022). Comparison of single layer centrifugation and magnetic activated cell sorting for selecting viable boar spermatozoa after thawing. *Livestock Science* 257(104853): 1-5.

Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsarı C, Kanyılmaz O, Kaya A, Ünsal A (2008). Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal Assisted Reproduction Genetics*, 25: 375-381.

Duarte JMB, Garcia JM (1997). Tecnologia da reprodução para a propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção, p.228-238 In: Duarte J.M.B. (Ed.). *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Funep: Jaboticabal, SP, 1987, 239 p.

Duarte JMB, Merino ML (1997). Taxonomia e evolução, p.1-21. In: Duarte JMB (Ed.). *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Funep: Jaboticabal, SP, 1987, 239 p.

Ebel F, Vallejo A, Gajardo G, Ulloa O, Clavel E, Rodríguez-Gil JE, Ramírez-Reveco A (2020). Semen quality and freezability analysis during breeding and non-breeding seasons in heavy draft stallions in southern Chile. *Andrologia*, 52: 1-7.

Faezah SSM, Zuraina FMY, Farah JHF, Khairul O, Hilwani NI, Iswadi MI, Fang CN, Zawawi I, Abas OM, Fatimah SI (2012). The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitation status. *Zygote*, 22: 378–386.

Fernandes CE, Pimentel CA (2002). Características seminais e fertilidade em garanhões. *Ciência Rural*, 32(5): 829-834.

Fickel j, Wagener A, Ludwig A (2007). Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal Wild Research*, 53:81–89.

Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Soom AV (2010). In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, 74: 31–39.

Flowers WL (2013). Sperm characteristics that limit success of fertilization. *Journal Animal Science*, 91:3022–3029.

Fontbonne A, Prochowska S, Niewiadomska Z (2020). Infertility in purebred cats - A review of the potential causes. *Theriogenology*, 158: 339-345.

Gadea J, Selles E, Marco MA (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 303–308.

Garcia BM, González-Fernández L, Ortega Ferrusola C, Salazar-Sandoval C, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ (2011). Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction Domestic Animals*, 46: 141-148.

Garcia-Deragon LF, Severo NC, Almeida SM, Zandonaide JPB. Relações entre defeitos espermáticos e taxas de gestação. In: V Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2021, p.113-123. Disponível em: <https://www.abraa.org.br/anais2021>. Acesso em: 28/06/2022.

Gautier C, Aurich C (2021). “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 106884: 1-15.

Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R, Checa MA (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal Assisted Reproduction Genetics*, 30: 479–485.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 62: 445-457.

Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ERS (2007). Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction*, 134: 19–29.

Greiser T, Sieme H, Martinsson G, Distl O (2020). Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. *Theriogenology*, 142:8-14.

Griffin RA, Baker M, Aitken RJ, Swegen A, Gibb Z (2019). What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction*, 158:125-137.

Grunewald S, Paasch U, Said, TM, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ (2006). Magnetic-activated Cell Sorting before Cryopreservation Preserves Mitochondrial Integrity in Human Spermatozoa. *Cell Tissue Banking*, 7:99–104.

Hendricks KEM, Hansen PJ (2009). Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa? *Theriogenology*, 71: 1138–1146.

Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, Forrest DW (2004). Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, 62: 283–297.

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

Henkel RR (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal Andrology*, 13(1): 43–52.

Henkel RR, Schill WB (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive biology and endocrinology*, 1(1): 1-22.

Hidalgo MMT, Almeida ABM, Letícia LAS, Silva AS, Trautwein LGC, Greggi JR, Silva VW, Silva NR, Martins MIM (2021). Comparação de dois tempos para Coleta farmacológica de sêmen com agonista adrenérgicos em gatos domésticos. In: Reunião anual da ABRAA, VI, Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2021, Campinas. Anais ... Revista Brasileira de Reprodução Animal, 22 (2):260.

Holt WV, Brown JL, Comizzoli P (2014). Reproductive science as an essential component of conservation biology. *Advanced Experimental Medical Biology*, 753: 3-14.



Horst GVD (2020). Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science*, 220: 106350.

Hosen B, Islam R, Begum R, Kabir Y, Howlader ZH (2015). Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iran Journal Reproduction Medical*, 13(9): 525-532.

Howard JG (1999) Assisted reproduction techniques in carnivores. In: *Zoo and Wild Animal Medicine IV*, p. 449-457, Eds. ME Fowler and RE Miller. WB Saunders Co, Philadelphia.

Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary–gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *Journal Andrology*, 11: 204-215.

Howard JG, Bush M, Wildt DE (1991). Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *Journal of Andrology*, 12: 36-45.

Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE (1993). Zona Pellucida Filtration of Structurally Abnormal Spermatozoa and Reduced Fertilization in Teratospermic Cats. *Biology of Reproduction*, 49:131-139.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021). Ranking - Pecuária – Rebanhos. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 22/06/22.

ICMBio (2018). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 622p.

IUCN (2022). International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species. Disponível em <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em 25/05/2022.

Jewgenow K, Neubauer K, Blottner S, Schon J, Wildt DE, Pukazhenthil BS (2009). Reduced Germ Cell Apoptosis During Spermatogenesis in the Teratospermic Domestic Cat. *Journal of Andrology*, 30(4): 460-468.

Jeyendran RS, Caroppo E, Rouen A, Anderson A, Puscheck E (2019). Selecting the most competent sperm for assisted reproductive Technologies. *Fertility Sterility*, 111: 851-863.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K (2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian Journal Andrology*, 4: 97-103.

Kaya A, Birler S, Enwall L, Memili E. Determinants of Sperm Morphology. In: Chenoweth PJ, Lorton ST. *Animal andrology: theories and applications*. 1 ed., Boston: CAB International, 2014, 568 p.

Klimowicz-Bodysa MD, Batkowskic F, Ochremd AS, Savic MA (2012). Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. *Theriogenology*, 77: 628 – 635.

Komsky-Elbaz A, Roth Z (2018). Fluorimetric Techniques for the Assessment of Sperm Membranes. *Journal of Visualized Experiments*, 141:1-8.

Lindahl J, Dalin AM, Stuhmann G, Morrell JM. (2012). Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6 °C prior to artificial insemination. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54 (40): 1-5.

Loomis PR (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics Equine*, 22: 663–676.

Love CC (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76: 547–557.

Love CC (2016) Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics Equine*, 32: 531–546.

Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA (2009). Effect of percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 71:1289-1297.

Madrigal-Valverde M, Bittencourt RF, Ribeiro Filho ADL, Barbosa VF, Vieira CA, Romão EA, Carneiro IB, Azevedo MC, Araujo GR (2021). Quality of domestic cat semen collected by urethral

catheterization after the use of different alpha 2-adrenergic agonists. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 23(8): 745–750.

Makker K, Agarwal A, Sharma RK. (2008) Magnetic activated cell sorting (MACS): Utility in assisted reproduction. *Indian Journal Experimental Biology*, 46: 491–497.

Manuel TJ, José MM, María CA, Carlos Z, Estela MP (2017). Use of Annexin V based Sperm Selection in Assisted Reproduction, *Andrology*, 6(1): 1-10.

Marchetti C, Marchetti P (2005). Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 33: 669–677.

Mari G, Castagnetti C, Rizzato G, Mislei B, Iacono E, Merlo B (2011). Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Animal Reproduction Science*, 126: 96–100.

Miltenyi Biotec. MiniMACS cell separation. Disponível em: <https://www.miltenyibiotec.com/>. Acesso em: 25/07/2022.

Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Pavin CIUM, Hirya Fernandes Pinto, Cibir FWS, Brum DS (2018). Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development, *Animal Reproduction Science*, 192: 146-153.

Moraes JCF, Souza CJH. Uma revisão sobre a execução do exame andrológico nos carneiros. Documentos 161. Bagé : Embrapa Pecuária Sul, 2019. 21 p.

Morato RG, Guimarães MABV, Nunes ALV, Carciofi AC, Ferreira F, Barnabe VH, Barnabe RC. (1998). Coleta e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 35(4):178-181.

Morrell JM (2012). Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32: 436-440.

Mrkun J, Dolenšek T, Knific T, Pišlar A, Kosec M, Kos J, Zrimšek P (2014). Elimination of apoptotic boar spermatozoa using magnetic activated cell sorting. *Acta Veterinaria BRNO*, 83: 13–18.

Muradas PR, Weiss RR, Kozicki LE (2013). Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. *Revista Acadêmica Ciência Agrárias e Ambientais*, 11 (3): 299-313.

Nakidkina NA, Kuzmina TI (2019). Apoptosis in Spermatozoa and Its Role in Deteriorating Semen Quality. *Russian Journal of Developmental Biology*, 50 (4): 165–172.

Nöthling JO, Irons PC (2008). A simple multidimensional system for the recording and Interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology*, 69 (5): 603-611.

Nunes MM. Avaliação computadorizada do sêmen: o que o laudo diz? In: V Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2021, p.113-123. Disponível em: <https://www.abraa.org.br/anais2021>. Acesso em: 22/06/2022.

Odhiambo JF, DeJarnette JM, Geary TW, Kennedy CE, Suarez SS, Sutovsky M, Sutovsky P (2014). Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biology of Reproduction*, 91(4): 1–10.

Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S (2003). Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reproductive BioMedicine*, 7 (4): 469–476.

Oliveira IZ , Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AF, Perini AP , Resende MV , Miguel MCV, Lucio AC, Hossepian de Lima VFM (2011). Spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine. *Andrologia*, 44: 9-15.

Ortega-Ferrusola C, García BM, Gallardo-Bolanos JM, González-Fernández L, Rodríguez-Martinez H, Tapia JA, Peña FJ (2009). Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 114: 393–403.

Papa, F.O. Reprodução de Garanhões, 1 ed., São Paulo: Editora MedVet, 2020, 336 p.

Peña FJ (2015). Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction*, 12(3): 351-355.

Peña FJ, García BM, Samper JC, Aparicio JA, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76: 1177–1186.

Peroni, EDFC (2013). Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catiungueiro (*Mazama gouazoubira*), com sêmen congelado. 56p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2013.

Peroni EDFC, Zanetti ES, Rola LD, Cursino MS, Duarte JMB (2012). Morfologia espermática dos veados-cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) mantidos em cativeiro: resultados preliminares. In: XV Congresso ABRAVES, Florianópolis, 2012. Anais..., p.130-133.

Pesch S, Bergmann M (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37: 597–612.

Pessoa GA, Martini AP, Trentin JM, Minela T, Rubin MIB (2020). Effect of plasma separation techniques and sperm selection on sperm recovery and viability of cooled pony stallion semen for 48h at 5°C. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72 (6): 2017-2026.

Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 134: 3–17.

Prakash S, Prithiviraj E, Suresh S, Lakshmi NV, Ganesh MK, Anuradha M, Ganesh L, Dinesh P (2014). Morphological diversity of sperm: A mini review. *Iran Journal Reproduction Medical*, 12(4): 239-242.

Prochowska S, Nizanski W, Ochota M, Partyka A (2015). Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*, 84: 1565–1571.

Prochowska S, Partyka A, Nizanski W (2021). Expression of Apoptosis-Related Genes in Cat Testicular Tissue in Relation to Sperm Morphology and Seasonality — A Preliminary Study. *Animals*, 11: 489-499.

Pukazhenthil BS, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt DE (2006). The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, 66: 112–121.

Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology Advances*, 34:578–587.

Rawe V, Álvarez G, Uriondo H, Papier S, Miasnik S, Nodar F (2009). Separación magnética por columnas de anexinas V: “filtrado molecular” para la selección de espermatozoides no apoptóticos. *Reproducción*, 24: 104-114.

Rodrigues JL, Bertolini M (2019) Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 43(2): 204-208.

Rodriguez-Martinez H (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development*, 19: 91–101.

Rodriguez-Martinez H (2014). Semen Evaluation and Handling: Emerging Techniques and Future Development. In: Chenoweth PJ, Lorton ST. *Animal andrology: theories and applications*. 1 ed., Boston: CAB International, 568 p.

Rola LD, Zanetti ES, Duarte JMB (2013). Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. *Animal Production Science*, 53 (5):472-477.

Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM (2009). Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, 72:210-218.

Saacke RG (2008). Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in sêmen. *Theriogenology*, 70: 473–478.

Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(4): 231-240.

Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ, Paasch U (2006). Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biological Reproduction*, 74: 530–537.

Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal Andrology*, 29: 134–142.

SaiD TM, Land JA (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17 (6): 719–733.

Scrollavezza P, Tambella AM, Vullo AM, Piccionello AP (2009). Evaluation of the muscular relaxant effect of dexmedetomidine or medetomidine in cats. *Veterinary Research Communications*, 33 (1): 213–215.

Serafini R, Longobardi V, Spadetta M, Neri D, Ariota B, Gasparrini B, Di Palo R (2014). Trypan Blue/Giemsa Staining to Assess Sperm Membrane Integrity in Salernitano Stallions and its Relationship to Pregnancy Rates. *Reproduction Domestic Animals*, 49: 41–47.

Silva MCC, Ullony KM, Araújo GR, Jorge-Neto PN, Albuquerque VB, Caramalac SM, Oliveira AR, Zanella R, Marques MG, Csemark-Junior AC Luczinski TC, Frazílio FO, Costa e Silva EV, Deco-Souza T. (2021). Can detomidine replace medetomidine for pharmacological semen collection in domestic cats? *Animal Reproduction*, 18(2):1-7.

Simmons LW, Fitzpatrick JL (2012). Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction*, 144: 519–534.

Smith MF, Geisert RD, Parrish JJ (2018). Reproduction in domestic ruminants during the past 50 yr: discovery to application. *Journal Animal Science*, 96:2952–2970.

Sutovsky P, Aarabi M, Miranda-Vizueté A, Oko R (2015). Negative biomarker-based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. *Asian Journal of Andrology*, 17: 554–560.

Swanson WF, Bateman HL and Vansandt LM. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Anim ReprodSci* 2017; 52: 255–260.

Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Kiyani A, Nasr-Esfahani MH (2014). Relationship between fertilization rate and early apoptosis in sperm population of infertile individuals. *Andrologia*, 46: 36-41.

Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD (2006). Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 1629–1632.

Thompson SK, Kutchy NA, Kwok S, Rosyada ZNA, Imumorin IG, Purwantara B, Memili E (2018). Sperm: Comparative morphology and function related to altered reproductive strategies and fertility in mammals. *The Professional Animal Scientist*, 34:558–565.

Varner DD (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70: 448–462.

Vaughan DA, Sakkas D (2019). Sperm selection methods in the 21st century. *Biology of Reproduction*, 101(6): 1076–1082.

Viana JHM (2021). Estatísticas do Mercado de embriões. Jornal “O Embrião”, Edição 67, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Disponível em: <http://www.sbte.org.br/>. Acesso em: 26/06/2022.

Vieira, DK, Suzano SMC, Pires MVM, Alvarenga AR, Silveira AMM, Abrami BR, Ferreira AMR. Andrological examination in domestic cats (*Felis catus*) by use of the electroejaculation method. In: World Small Animal Veterinary Association World Congress. Proceedings..., São Paulo, 2009.

Villaverde AISB, Melo CMM, Corrente JE, Papa FO, Lopes MD (2008). Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis catus*). *Ciência Animal Brasileira*, 9(3): 686-692.

Waberski D, Suarez SS, Henning H (2021). Assessment of sperm motility in livestock: perspectives based on sperm swimming conditions *in vivo*. *Animal Reproduction Science*, 222: 106849.

Wildt DE, Comizzoli P, Pukazhenthil BS, Songsasen N (2010). Lessons from biodiversity-the value of nontraditional species to advance reproductive sciences, conservation, and human health. *Molecular Reproduction Development*, 77(5): 397–409.

Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P, Soler C (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6): 799-809.

Zamai MF, Andreazzi MA, Messias DMP, Cavalieri FLB, Emanuelli IP (2019). Panorama das publicações científicas sobre reprodução animal: 2000 a 2017. *Enciclopédia biosfera*, 16(29): 1149-1160.

Zambelli D, Cunto M (2006). Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, 66: 159–165.

Zambelli D, Prati F, Cunto M, Lacono E, Merlo B (2008). Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, 69: 485–490.

Zorn B, Golob B, Ihan A, Kopitar A, Kolbezen M (2012). Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *Journal Assisted Reproduction Genetics*, 29:357–364.



## **ANEXOS – Artigos publicados**

**Anexo 1** – Magnetic-activated cell sorting improves high quality spermatozoa in bovine semen.

**Anexo 2** – Selection of High-quality Sperms by the Nanotechnological Method of Magnetic Activation in Brazilian Cervids.

## Original Article

# Magnetic-activated cell sorting improves high-quality spermatozoa in bovine semen

Teresinha Inês de Assumpção<sup>1\*</sup>, Neimar Correa Severo<sup>2</sup>, João Pedro Brandão Zandonaide<sup>3</sup> and Gustavo Guerino Macedo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38400902, Brazil,

<sup>2</sup>RevivaH Technical Consultancy, Uberaba 38017200, Brazil,

<sup>3</sup>Alta Genetics, Uberaba 38055010, Brazil,

<sup>4</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070900, Brazil

Received March 22, 2021

Revised April 28, 2021

Accepted June 6, 2021

### \*Correspondence

Teresinha Inês de Assumpção

E-mail: [teassumpcao@ufu.br](mailto:teassumpcao@ufu.br)

### ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-8323-9348>

**ABSTRACT** The objective of this study was to establish a selection process for high quality sperm in bovine semen using sperm separation by magnetic activation (MACS). For this, semen from 21 Nelore bulls was collected using an artificial vagina. To guarantee the presence of pathologies in the ejaculate, animals previously declassified in four consecutive spermogram were used. Semen was analyzed in five statuses: (1) fresh semen (fresh); (2) density gradient centrifugation (DGC), percoll column; (3) non-apoptotic fraction after separation by MACS (MAC); (4) apoptotic fraction from the separation (MACPOOR); and (5) MAC followed by DGC (MACDGC). Using a computerized analysis system (CASA), motility was measured. The sperm morphology was evaluated by phase contrast, and the supravital test was completed with eosin/nigrosin staining. For DGC,  $20 \times 10^6$  cells were used in a gradient of 90% and 45% percoll. MACS used  $10 \times 10^6$  cells with 20  $\mu$ L of nanoparticles attached to annexin V, and filtered through the MiniMACS magnetic separation column. Membrane integrity was assessed with SYBR-14/IP and mitochondrial potential with JC-1 by flow cytometry. Processing sperm by MACDGC, was more effective in obtaining samples with high quality sperm, verified by the total of abnormalities in the samples:  $35.04 \pm 2.29\%$ ,  $21.50 \pm 1.47\%$ ,  $17.30 \pm 1.10\%$ ,  $30.68 \pm 1.94\%$  and  $10.50 \pm 1.46\%$ , respectively for fresh, DGC, MAC, MACPOOR, and MACDGC. The subpopulation of non-apoptotic sperm had a high number of live cells (82.65%), membrane integrity (56.60%) and mitochondrial potential (83.98%) ( $p < 0.05$ ). These findings suggest that this nanotechnological method, that uses nanoparticles, is efficient in the production of high-quality semen samples for assisted reproduction procedures in cattle.

**Keywords:** andrology, bull, ejaculate, fertility, sperm

## INTRODUCTION

Millions of bovine females are inseminated annually around the world, with 80,938,152 females in Brazil inse-

minated in 2020, representing 19.4% of the national female herd (ASBIA, 2021). Despite this high number of inseminations, the probability of conception is around 50%, due low seminal quality and injuries caused by cryopreserva-

tion, which both affect fertilization and/or embryonic development (Sá Filho et al., 2009). The increasing adoption of artificial insemination and cryopreservation of semen has increased the need to develop methods to specify the fertility of bulls. Since the beginning of the 20th century the poor quality of sperm cells has been associated with low fertility, and the evaluation of sperm morphology has been used in the reproductive health examination or research of low fertility of animals (Nöthling and Irons, 2008).

Semen quality is very variable, even in a single individual, which has an impactful relationship with fertility, since any factor capable of altering spermatogenesis results in the production of sperm with morphological changes (de Arruda et al., 2015). Sperm quality is one determinant of successful *in vivo* and *in vitro* reproduction techniques (Rawe et al., 2009; Odhiambo et al., 2014). In human medicine, the separation of viable sperm in the ejaculate is in great demand for embryo production, since human semen has a high number of morphological abnormalities (Berteli et al., 2017). In cattle, density gradient centrifugation (DGC) is used, which separates mobile sperm from the solution (Missio et al., 2018); however, it does not separate head and membrane pathologies and is not viable for large-scale production due to its low efficiency and high cost.

Phosphatidylserine (FTS) is a phospholipid located on the cytosolic side of the sperm cell membrane, and its externalization is considered a sign of apoptosis, as it causes membrane fluidity, breaks the mitochondrial membrane potential, and activates caspases and fragmentation of DNA (Aziz et al., 2007; Tavalae et al., 2012). Thus, FTS externalized (apoptosis) is associated with a decrease in seminal parameters, such as motility, morphology, and concentration, and, consequently, leads to reduced fertility (Said et al., 2008; Rawe et al., 2009; Tavalae et al., 2012). The presence of these apoptosis markers is directly correlated with *in vivo* and *in vitro* fertility failures (Tavalae et al., 2012). Annexin V (ANX) is a protein that specifically binds to FTS and is used to identify cells with altered membranes, beginning at apoptosis (Kurz et al., 2005).

The technique of cell separation by magnetic activation (MACS) is a non-invasive method that uses knowledge of ANX affinity with the FTS membrane. ANX, when coupled to metallic microspheres, binds to sperm with damaged

membranes. By submitting this conjugate (nanoparticles + ANX + sperm) to a high-potency magnetic field in a separation column, it adheres to the column, while non-apoptotic cells with intact membranes pass freely through it (Dirican et al., 2008; Rawe et al., 2009; Manuel et al., 2017), thus separating normal sperm from those with abnormalities. MACS increases the number of normal cells, as well as motility and morphology (Curti et al., 2014) with good results in human *in vitro* fertilization (Manuel et al., 2017), yielding a cell recovery rate in around  $73.8 \pm 12.1\%$  for human species (Said et al., 2006). In animal species, studies using MACS and measuring the efficiency of sperm cells *in vivo* and *in vitro* post-selection are still required.

Thus, the development of a sperm separation technique that does not interfere with sample quality will allow for the production of high-quality semen samples from domestic animals, with a high chance of fertility of the oocyte. This will contribute to the increase in post-insemination reproductive efficiency or the production of embryos *in vitro*. In view of this, the present study aimed to carry out spermatozoa selection through sperm separation by MACS and/or DGC/percoll in fresh bovine semen, evaluating the quality of cells after the sperm selection process.

## MATERIALS AND METHODS

Semen collections were approved by Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Uberlandia, in 22 June 2018, protocol 024/18. This study was carried out in a semen collection and processing center (Alta Genetics, Uberaba, Brazil) with Nellore bulls ( $n = 21$ ), submitted once a week to ejaculate collections using the artificial vagina technique, collecting all the semen produced by the animal. To guarantee the presence of pathologies in the ejaculates, animals declassified in the spermogram were selected (CBRA, 2013), as they have high numbers of cells with abnormalities (above 30%). Semen was analyzed after five steps in the collection/separation process: 1) fresh semen immediately after collection (FRESH); 2) density gradient centrifugation (DGC), percoll column; 3) after separation by MACS (filtered portion was good; MAC); 4) after separation by MACS (portion retained in the column was bad; MACPOOR); and 5) separation by MACS (filtered portion was good), followed

by DGC/percoll (MACDGC) (Fig. 1). In each sample, the following analyses were performed: total and progressive motility by computerized semen analysis (CASA) in IVOS model equipment (Hamilton Thorne®) (Valverde and Madrigal-Valverde, 2018), sperm morphology assessed in a wet chamber under phase contrast optical microscopy (CBRA, 2013); and the supravital test with semen smears stained by eosin-nigrosin (Botuvital®, Botupharma, Botucatu, SP), to verify the proportion of spermatozoa living and dead (Faezah et al., 2014).

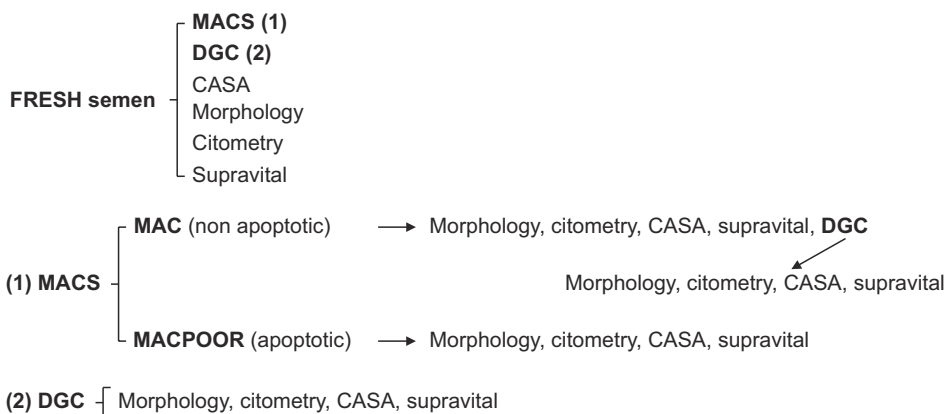
For sperm separation in DGC, a percoll™ stock solution (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was prepared, composed of 90% percoll (pH 7.4; 280-290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), in Eagle's medium modified by Dubelcco concentrate 10 × (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), containing 0.3% BSA (Calbiochem, Darmstadt, Germany), 10 mg/L antibiotic, and 6 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), with the pH adjusted to 7.4. The percoll density gradient was prepared by depositing 200 µL of TALP-SPERM with 200 µL of the 90% percoll solution in a 1.5 mL microtube, thus, forming the 45% percoll layer. Below this, 400 µL of 90% percoll was deposited. Semen containing 20 million sperm was deposited above the column, following the protocol of Missio et al. (2018), with modifications. Microtubes were centrifuged at 900 × G for 5 min at room temperature. The sediment containing the sperm was diluted in 150 µL HEPES for cell analysis (Machado et al., 2009).

For sperm separation by MACS, protocol adapted from the MACS columns' manufacturer (Miltenyi Biotec, Germany) was used, as described by Rawe et al. (2009). From fresh semen, a solution of 1.5 mL of HEPES containing 10 million sperm was prepared, followed by centrifugation at 300 × G for 10 min, to wash the sperm. The pellet formed was resuspended in 150 µL HEPES, and 20 µL of

iron nanoparticles linked to ANX (Miltenyi Biotec, Germany) were added. After incubation for 15 min at room temperature, filtration was performed on the MiniMACS magnetic separation column (Miltenyi Biotec, Germany). The column was hydrated with 500 µL of phosphate buffered saline containing 0.3% BSA. The filtrate, or non-apoptotic fraction, was collected directly from the column in a 2 mL tube (MAC). The apoptotic fraction, joined by microspheres in the column (MACPOOR), was obtained by removing the column from the magnet and adding 300 µL of HEPES with the help of a plunger. Sperm separation by MACS followed by DGC/percoll was a combination of the two methodologies described above.

Plasma membrane integrity was assessed in flow cytometry (Cyflow®) using 10 µL semen with 2 µL propidium iodide (28707-5, St Louis, MO, USA) and 1 µL of SYBR-14 (Sperm Viability kit, L-7011, Molecular Probes, Eugene, USA), with a total of 5,000 cells being evaluated. For the analysis of mitochondrial potential, one million sperm were used, diluted in 150 µL of HEPES with 6 µL of JC-1 (5,5',6,6'-tetrachlor-1,1,3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide; Molecular Probes, T-3168, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). After incubation for 8 min at room temperature, protected from light, the samples were fixed with 4% paraformaldehyde (3 µL) and evaluated by flow cytometry (Cytoflex®); Celeghini et al. (2007) with adaptations.

Statistical analysis was performed with the aid of the Statistical Analysis System for Windows SAS® program (SAS University). Continuous variables were assessed for normality of residues by the UNIVARIATE procedure and subjected to the Bartlett test to verify the homogeneity of variances. The data was submitted to the GLIMMIX procedure, followed by the Tukey test. Normal distribution de-



**Fig. 1.** Experimental design (DGC, density gradient centrifugation; MACS, magnetic cell separation).

pendent variables (parametric) were expressed as adjusted means and standard error of the mean (mean ± SEM). A significant difference was considered when  $p < 0.05$  and trend  $p < 0.10$ .

## RESULTS

Ejaculate volumes ranged from 6 to 10 mL. Concentrations in FRESH semen were  $412 \times 10^6$  to  $2325 \times 10^6$  sperm/mL (mean of  $828 \times 10^6$  per mL). Treatments influenced total and progressive motilities, observing a decrease in motility with increased manipulation of the semen observing an effect of the increased manipulation in the semen in the decrease of motility (Fig. 2). DGC increased the sperm's progressive motility by about 15% in relation to FRESH semen. MAC's motility was more than 30% higher than MACPOOR. Both MACPOOR and MACDGC had the lowest motility values (Fig. 2). Fig. 3 shows the parameters of major, minor, and total abnormalities in both FRESH semen and after the different selection procedures. Larger and total defects, more strongly related to infertility, were present in low quantity after DGC, MAC, and MACDGC. Individually, the DGC and MACS techniques reduced total sperm abnormalities by about 50%; however, the combination of the two methods showed a reduction of more than 70% (Fig. 3).

Abnormalities of sperm tail/intermediate portion of the sperm (Table 1) were influenced by the procedures. MACDGC was able to reduce the proportion of sperm with abaxial/retroaxial implantation. The amount of

sperm with normal isolated heads were reduced after all procedures compared to FRESH semen. DGC, the MAC procedure, and the combination of the two (MACDGC) were effective in reducing sperm with strongly folded and curled tails (Table 1). Regarding abnormalities of the sperm head (Table 1), MACS reduced such deformities efficiently. Acrosome defects were retained in the magnetic column (MACPOOR), reducing its proportion in filtered semen (MAC). Also, sperm with abnormal contour were retained in the column (Table 1), and the number of pyriform sperm was reduced to zero after filtering in the column.

The number of live cells (supravital test) was similar in all the samples, with the exception of MACPOOR (Fig. 4). Membrane integrity did not differentiate between FRESH and DGC samples (Fig. 4), but with the other samples, MAC had a 22% increase over MACPOOR, whereas MACDGC revealed low membrane integrity (32.3%). The mitochondrial potential was similar in the samples, and although MACPOOR showed a 20% reduction, it showed no significant difference from the other samples (Fig. 4).

## DISCUSSION

The tested treatments influenced the total and progressive motilities, observing a decrease in motility with increased semen manipulation. DGC increased progressive sperm motility by about 15% compared to FRESH semen. MAC's motility was over 30% higher than MACPOOR,

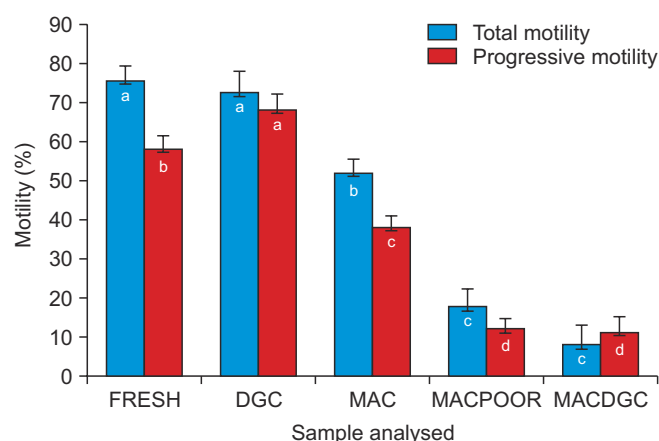


Fig. 2. Total and progressive motility observed in sperm from FRESH, DGC, MAC, MACPOOR, and MACDGC semen samples in Nelore bulls (different letters indicate significant differences,  $p < 0.5$ ).

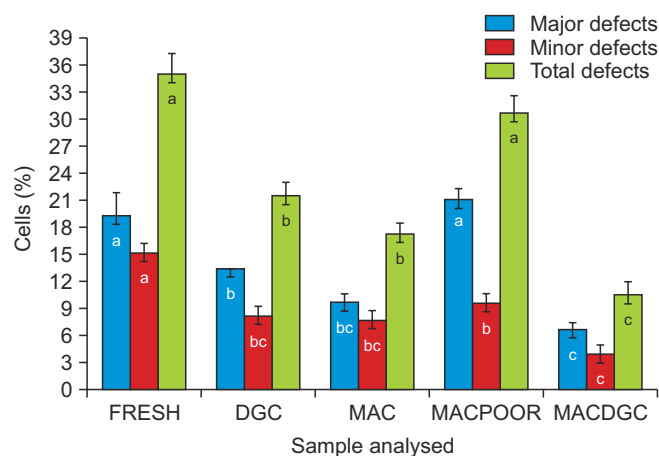
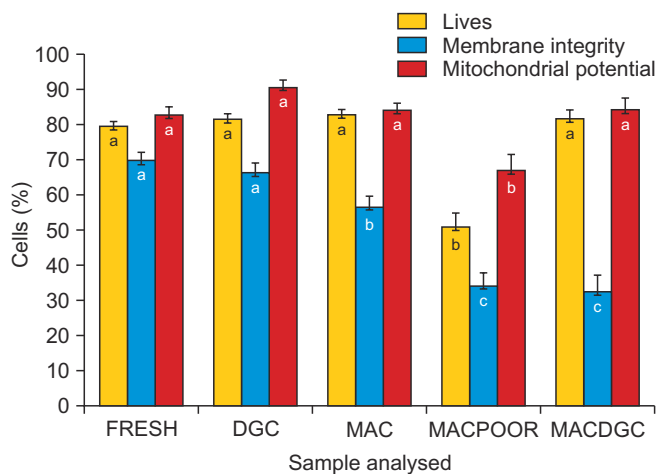


Fig. 3. Major, minor, and total morphological defects seen in sperm from FRESH, DGC, MAC, MACPOOR, and MACDGC semen samples in Nelore bulls (different letters indicate significant differences,  $p < 0.5$ ).

**Table 1.** Individual sperm abnormalities (%) observed in samples of fresh semen, density gradient centrifugation/percoll (DGC), non-apoptotic fraction (MAC), apoptotic fraction (MACPOOR), and MAC followed by DGC/percoll (MACDGC) in Nelore bulls

	FRESH	DGC	MAC	MACPOOR	MACDGC
Midpiece/tail defects					
Abaxial/retroaxial	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
Free normal heads	5.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
Folded tail	5.9 ± 1.5	3.0 ± 0.6	4.4 ± 0.8	4.7 ± 0.9	1.7 ± 0.4
Curled tail	1.1 ± 0.3 <sup>a,b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>a,b</sup>
Strongly folded and curled tail	4.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>b</sup>
Defects of midpiece					
Distal cytoplasmic droplet	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0
Proximal cytoplasmic droplet	0.8 ± 0.3	1.5 ± 0.7	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.7	0.2 ± 0.1
Head defects					
Acrosome	3.2 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	2.4 ± 0.5 <sup>a,b</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>
Abnormal contour	2.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>b</sup>
Narrow	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Narrow at base	0.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a,b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.2 <sup>a,b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
Pyriform	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.0	0.2 ± 0.1	0.0
Pouch formation	2.6 ± 0.1	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.6	0.7 ± 0.3

\*Different letters on the lines indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.



**Fig. 4.** Total live cells, membrane integrity, and mitochondrial potential of sperm cells in semen samples FRESH, DGC, MAC, MACPOOR, and MACDGC in Nelore bulls (different letters indicate significant differences,  $p < 0.5$ ).

and both MACPOOR and MACDGC had the lowest motility values (Fig. 2). Although the DGC technique did not increase total motility, progressive sperm motility was increased by about 15% compared to FRESH semen. This validates the experimental model, since the percoll column was used to select mobile sperm (Berteli et al., 2017; Missio et al., 2018).

The good portion of the MACS filtrate (MAC) showed lower motility than both FRESH semen and that processed

by DGC/percoll, possibly due to increased manipulation of the semen and the need for biochemical adjustments in the filtering medium (Aziz et al., 2007; Berteli et al., 2017). Said and Lang (2011) stated that all advanced methods of sperm selection involve the prolonged exposure of spermatozoa to non-physiological conditions can induce iatrogenic damage, and Rawe et al. (2009) observed that motility decreased by approximately 20% with the passage through the column since this parameter is mainly influenced by the lower number of fast progressive spermatozoa to the detriment of the higher number of slow progressive ones.

However, MACPOOR showed a 30% reduction in motility compared to MAC. This shows the column ability to retain apoptotic immobile sperm (Said et al., 2006; de Vantéry Arrighi et al., 2009). MACDGC, on the other hand, had motility as low as MACPOOR, probably due to the number of procedures to which the cell was subjected. Also, both long times of sperm exposure to the filtration means and percoll and long periods between analyses subjected the cells to mechanical and magnetic forces within the column, which can lead to defects in the tail. This can result in a decrease in motility but a high amount of living cells (Aziz et al., 2007; Rawe et al., 2009; Berteli et al., 2017).

When comparing DGC and MACS techniques, we found that both were effective in reducing total sperm abnormalities, with 40% and 50% drops, respectively. However,

the combination of the two methods showed greater efficiency (reduction of more than 70%), in producing samples with high cell quality, containing only 10.5% with abnormalities (Fig. 3), as also observed by Faezah et al. (2014) and Odhiambo et al. (2014). Like total defects, major and minor defects also differed between samples. MACPOOR has always presented a high number of abnormalities, mainly major defects. In human semen and in this research, several others have also demonstrated the efficiency of MACS in reducing abnormalities and increasing fertilization rates (Said et al., 2008; Gil et al., 2013; Curti et al., 2014; Bucar et al., 2015; Berteli et al., 2017). These results, verified with DGC and MACS, express their action in the selective removal of tail and head defects. The MACS efficiency is validated by the fact that, according to de Vantéry Arrighi et al. (2009), FTS is present in 61.4% of the sperm membranes in all regions (head, intermediate part, and tail) with greater expression in the head.

Abnormalities of the sperm tail (Table 1) decreased significantly after DGC compared to FRESH sperm, including folded (5.9 to 3.0), curled (1.1 to 0.2), and strongly folded and curled (4.4 to 0.8) tails. DGC also contributed to the reduction of other sperm cell defects, though in a more subtle way. Additionally, MACS efficiently reduced sperm head abnormalities (Table 1), with significant decreases in individual defects for MAC compared to FRESH semen: acrosome (3.2 to 0.8), abnormal contour (2.4 to 1.3), narrow (0.9 to 0.2), narrow at the base (0.8 to 0.0), and pyriform (0.1 to 0.0). MAC also reduced tail defects, being very effective in mitigating strongly folded and curled tails (4.4 to 1.4). Head defects, such as acrosome lesions and abnormal and narrow contour at the base, also showed significant differences between samples. Other spermatid defects, such as normal isolated heads, had reductions of 52% with DGC/percoll and 85% in MAC. Pouch formation had a 50% reduction in both techniques, and mid-piece defects reduced by 50% with DGC/percoll but had no variation with MAC; the two techniques did not show good efficiency for proximal and distal cytoplasmic droplet (Table 1). A similar pattern of sperm morphology after DGC and MACS was observed by Aziz et al. (2007) and Dirican et al. (2008) in human semen. Reductions in individual abnormalities show that each technique is selective for certain sperm defects, but both DGC and MACS, separately or together, contributed to improving cell sample

quality.

The number of live cells (supravital test) was similar in the samples, with the exception of MACPOOR, which dropped by 50% (Fig. 4). MAC showed a slight increase of 4% in the number of live cells, in relation to FRESH semen, but without significant differences from the other samples. Grunewald et al. (2006) and Faezah et al. (2014) also observed similar results. MACS works by separating cell subpopulations with intact membranes, and like DGC/percoll, it yields a greater number of living cells, thus proving efficient in removing immobile cells from semen samples and achieving low numbers of dead cells in the medium.

Membrane integrity did not differentiate between FRESH and percoll, but with the other samples, MAC exhibited a significant difference compared to MACPOOR (56.6% and 34.0%, respectively). However, MACDGC revealed low membrane integrity (32.3%), similar to MACPOOR. This may be due, in part, to the high degree of cell handling during the analyses, which may have caused membrane damage (Fig. 4). These results highlight the efficiency of MACS in removing cells with membrane damage, that are possibly already undergoing apoptosis, and leading to a reduction in the oxidative stress of the sample (Paasch et al., 2003; Grunewald et al., 2006; Aziz et al., 2007; Rawe et al., 2009; Faezah et al., 2014; Manuel et al., 2017).

The mitochondrial potential was similar in all samples, with the exception of MACPOOR, where there was a drop of almost 20% (Fig. 4). This behavior indicated that most sperm with mitochondrial lesions must be dead or in the process of apoptosis. The DGC/percoll sample exhibited an 8% increase in mitochondrial potential in relation to the other samples, but with no significant difference from the other samples, indicating that this technique also removes “dead” cells from the medium. Evaluation of the mitochondrial membrane potential serves as a parameter to infer the fertility of the cells because when it is high, we have a good sperm quality, and fertilization capacity of the sperm is linked to motility and is dependent on the mitochondrial function (Kasai et al., 2002; Zorn et al., 2012).

## CONCLUSION

The combination of the two sperm processing methods (DGC and MACS) was very effective in the production of

high-quality sperm samples, and the subpopulation of non-apoptotic sperm (MAC) revealed a morphologically superior quality. These findings suggest that this nanotechnological method, using nanoparticles, is efficient in the production of high-quality semen samples for use in assisted reproduction procedures in cattle.

## CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. Paula A. Navarro, Human Reproduction Division, Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto School for the temporary assignment of MiniMACS equipment. Alta Genetics, Uberaba, MG for the facilities and animals used in the research. This research did not receive any specific scholarship from public, commercial or non-profit sectors. This study was financed in part (english review service) by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Teresinha Inês de Assumpção: Conceptualization, Data Curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Visualization, Supervision, Writing, Writing - Review & Editing.

Neimar Correa Severo: Methodology, Validation, Investigation, Resources.

João Pedro Brandão Zandonade: Methodology, Validation, Investigation, Resources.

Gustavo Guerino Macedo: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing, Writing - Review & Editing.

## AUTHOR'S POSITION AND ORCID NO.

TI Assumpção, Researcher and Professor,  
<https://orcid.org/0000-0001-8323-9348>

NC Severo, Technical consultant,  
<https://orcid.org/0000-0002-6319-6608>

JPB Zandonade, PhD candidate,

<https://orcid.org/0000-0002-4030-336X>

GG Macedo, Researcher and Professor,

<https://orcid.org/0000-0003-3535-6050>

## REFERENCES

- ASBIA. 2021. ASBIA Index 2020. <http://www.asbia.org.br>. Accessed 3 March 2020.
- Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. 2007. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum. Reprod.* 22:1413-1419.
- Berteli TS, Da Broi MG, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. 2017. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology* 5:776-782.
- Bucar S, Gonçalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sá R. 2015. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32:147-154.
- Celeghini ECC, De Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. 2007. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Domest. Anim.* 42:479-488.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3rd ed, CBRA, Belo Horizonte, pp. 103. Portuguese.
- Curti G, Skowronek F, Vernochi R, Rodriguez-Buzzi AL, Rodriguez-Buzzi JC, Casanova G, Sapiro R. 2014. Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS). *Reprod. Biol.* 14:289-292.
- de Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, dos Santos GDC, Leite TG, Oliveira LZ, Lançoni R, Rodrigues MP. 2015. [Bull sperm morphology: interpretation and impact on fertility]. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 39:47-60.
- de Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnens D, de Agostini A. 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:1.
- Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25:375-381.
- Faezah SS, Zuraina FM, Farah JH, Khairul O, Hilwani NI, Iswadi MI, Fang CN, Zawawi I, Abas OM, Fatimah SI. 2014. The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitation status. *Zygote* 22:378-386.
- Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R, Checa MA. 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and



- meta-analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30:479-485.
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. 2006. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank.* 7:99-104.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J. Androl.* 4:97-103.
- Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Müller K. 2005. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 130:615-626.
- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71:1289-1297.
- Manuel TJ, José MM, María CA, Carlos Z, Estela MP. 2017. Use of annexin V based sperm selection in assisted reproduction. *Andrology (Los Angel.)* 6:1000182.
- Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Pavin CIUM, Pinto HF, Cibin FWS, Brum DDS. 2018. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. *Anim. Reprod. Sci.* 192:146-153.
- Nöthling JO and Irons PC. 2008. A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology* 69:603-611.
- Odhiambo JF, DeJarnette JM, Geary TW, Kennedy CE, Suarez SS, Sutovsky M, Sutovsky P. 2014. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biol. Reprod.* 91:97.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J. Androl.* 24:246-252.
- Rawe V, Álvarez G, Uriondo H, Papier S, Miasnik S, Nodar F. 2009. Separación magnética por columnas de anexinas V: "filtrado molecular" para la selección de espermatozoides no apoptóticos. *Reproduccion* 24:104-114. Spanish.
- Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72:210-218.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol. Reprod.* 74:530-537.
- Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J. Androl.* 29:134-142.
- Said TM and Land JA. 2011. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 17:719-733.
- Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. 2012. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J. Assist. Reprod. Genet.* 29:31-38.
- Valverde A and Madrigal-Valverde M. 2018. Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. *Agron. Mesosam.* 29:469-484.
- Zorn B, Golob B, Ihan A, Kopitar A, Kolbezen M. 2012. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29:357-364.

ARTICLE

## Selection of High-quality Sperms by the Nanotechnological Method of Magnetic Activation in Brazilian Cervids

Teresinha Inês Assumpção<sup>1\*</sup> André Luíz Quagliatto Santos<sup>1</sup> José Maurício Barbanti Duarte<sup>2</sup>  
Maurício Foschini<sup>3</sup> Caroline Silva Vieira<sup>1</sup>

1. Teaching and Research Laboratory in Wild Animals, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil

2. Deer Research and Conservation Centre, Department of Animal Science, Sao Paulo State University, Jaboticabal, SP, Brazil

3. Physics Institute, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

*Article history*

Received: 18 April 2021

Accepted: 06 May 2021

Published Online: 11 May 2021

*Keywords:*

Reproduction

Andrology

Fertility

Deer

Ejaculate

Sperm cell

ABSTRACT

Cervids show a high degree of abnormalities in their sperm cells. Thus, this study aimed to select high-quality spermatozoa using magnetic-activated sperm sorting (MASS) compared to density gradient centrifugation (DGC) by assessing the post-selection cell quality. Semen from six *Mazama* deer was collected by electroejaculation after chemical restraint. The semen was analyzed in four samples: Fresh, DGC, SEMgood - non-apoptotic fraction, and SEMpoor - apoptotic fraction. The material was analyzed for motility and vigor (light microscopy), concentration (Neubauer chamber), semen morphology (phase contrast), and supravital staining test (eosin/ nigrosine). The DGC method used 20 x 10<sup>6</sup> cells in 90% and 45% percoll® gradient. The MASS used 10 x 10<sup>6</sup> cells with 20 µl of iron nanoparticles attached to Annexin V and filtration in a magnetic separation column. Both processing methods (DGC and MASS) were effective in producing high-quality sperm samples, with a marked reduction in abnormalities from 41.83 ± 10.25 (fresh) to 14.83 ± 3.17 (DGC) and 12 ± 3.01 (SEMgood), with 80.3% ± 2.06 living cells. These findings suggest that this nanotechnological method, using nanoparticles, effectively produces high-quality semen samples in cervids for use in assisted reproduction.

### 1. Introduction

The preservation of a species depends on the maintenance of populations with good genetic variability, and reproduction is essential in this process. Reproductive biotechniques, such as artificial insemination, embryo

transfer, *in vitro* fertilization, and semen and embryo cryo-preservation, can contribute to this genetic diversity. However, the employment of these techniques is still limited in wild species, mainly due to the lack of basic knowledge in reproductive biology<sup>[1,2]</sup>.

Ejaculate quality is highly variable in wild species

\*Corresponding Author:

Teresinha Inês Assumpção,

Teaching and Research Laboratory in Wild Animals, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil;

Email: [teassumpcao@ufu.br](mailto:teassumpcao@ufu.br)

when natural selection not always guarantees that males with better semen quality have more offspring, but also involves a complex process and requires several attributes so that the sperm cells may reach the fertilization site, penetrate the egg cell, and activate embryo development [3,4].

There are eight cervid species in Brazil, among them the ones belonging to the genus *Mazama*: *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Mazama nana* (Hensel, 1872), and *Mazama bororo* (Duarte, 1996). The species *M. nana* and *M. bororo* are considered vulnerable worldwide, while the remaining species have rapidly declining populations [5].

In cervids, even in wildlife, a high degree of structural abnormalities is observed in sperm cells, with 70% and 43% of abnormalities being verified, respectively, by Assumpção [6] and Assumpção and Santos [7] in *Mazama gouazoubira*, which can be caused by natural selection mechanisms [8] or by the loss of genetic variability due to population decline [9,2]. Something similar occurs with animals in captivity, as demonstrated by Rola [10], who verified 75.5 % of sperm abnormalities in *Mazama americana*, possibly due to management stress, change in the environment, and constant coexistence with other individuals [11,12]. Poor semen quality can lead to decreased fertility in deer species, reducing the efficiency of assisted reproduction and putting at risk “ex situ” conservation programs for these animals.

The cell membrane of the spermatozoon contains phosphatidylserine (PS), a phospholipid located in the cytosolic side, and its externalization is considered a sign of apoptosis, causing membrane fluidity, decreased mitochondrial membrane potential, and DNA fragmentation [13,14,15]. The presence of this apoptotic marker is directly correlated with *in vivo* and *in vitro* fertility problems [16]. This marker (external PS) has been used to separate apoptotic cells from normal cells by techniques such as magnetic-activated cell sorting, contributing to increased motility and integrity of the sperm membrane and optimizing the cleavage and conception rates, which has modified the picture of male sub-fertility and increased the success of assisted reproduction [17].

The magnetic-activated sorting technique is a non-invasive method that uses the knowledge of the affinity of Annexin V (ANX) with the PS in the membrane. Arrighi [14] observed that PS is present in 61.4 % of sperm membranes in all regions, with more expressiveness in the head. ANX, when coupled to microspheres, attaches to the membrane-injured sperm cells and, when subjecting this set to a high-power magnetic field in a separation column,

these sets will adhere to the column, while the non-apoptotic cells will freely pass through it [18,19,20]. Curti [21] and Berteli [22] verified that this type of sperm selection increases the number of cells with normal tails and increases motility and normal morphology.

The development of a sperm separation technique that does not interfere with sperm quality will allow the production of high-quality semen samples from wild animals, increasing the efficiency of assisted reproduction and species preservation. Thus, this study aimed to select high-quality spermatozoa using magnetic-activated sperm sorting (MASS) compared to density gradient centrifugation (DGC) in fresh deer semen samples by evaluating post-selection cell quality.

## 2. Material and Methods

Six adult male deer were used, two of each of the following species: brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), Amazonian brown brocket deer (*Mazama nemorivaga*), and red brocket deer (*Mazama americana*), belonging to the Deer Research and Conservation Centre (NUPECCE), Department of Animal Science of São Paulo State University, Jaboticabal, SP (IBAMA Registration n° 1/35/92/0882-5, SISBIO Registration n° 482.508). The animals were kept in individual stalls (4m x 4m), with auditory and olfactory contact between males and females, and exposed to natural fluctuations of luminosity, temperature, and relative air humidity. Feeding was provided based on the Purina® Omolene Traditional horse feed, totaling up to 500 g/animal/day, along with fresh forage, such as perennial soybean (*Neonotonia wightii*), rami (*Boehmeria nivea*), and mulberry (*Morus alba*), totaling up to 1 kg/animal/day. High-quality water was provided ad libitum.

Semen collection was performed by electroejaculation after chemical restraint. The animals received an intramuscular association of the drugs xylazine hydrochloride (1 mg/kg, Dopalen; Vetbrans Animal Health, Jacareí, Brazil) and ketamine hydrochloride (10 mg/kg, Coopazine, Mallinckrodt Vet, Cotia, Brazil). An electroejaculator (P-T Electronics®; Boring, OR; USA) coupled to a probe with 2.0 cm diameter and 28.0 cm length was used. The animals received increasing stimuli from 250 mA to 750 mA, with an average duration of three seconds and three-second intervals (total of ten stimuli per sequence). Three stimulation sequences were performed, with intervals from one to two minutes during the collection [23,24].

The analyses of sperm progressive motility (percentage) and vigor (scale from 0 to 5) were performed under light microscopy. The semen concentration was measured in a Neubauer chamber, and sperm morphology was evaluated

in a moist chamber under phase-contrast microscopy by verifying the abnormalities individually [25]. For the supravital test (analysis of living/ dead spermatozoa), a semen smear stained with eosin-nigrosine was used (Botuvital®, Botupharma, Botucatu, SP), verifying the percentage of living and dead spermatozoa [26].

The semen was analyzed in four different samples: (1) Fresh – fresh semen; (2) DGC - density gradient centrifugation/ percoll column; (3) SEMgood – non-apoptotic fraction obtained after separation by MASS; (4) SEMpoor – apoptotic fraction obtained after the separation.

A percoll stock solution was prepared for sperm separation by DGC, composed of 90% percoll (pH 7.4; 280-290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) in Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), with 0.3% bovine serum albumin (Calbiochem, Darmstadt, Germany), 10mg/L of antibiotic, and 6mM of HEPES (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). For the percoll density gradient, 200 µl of TALP-SPERM with 200 µl of the 90% percoll solution was used in a 1.5 mL microtube (45% percoll layer), depositing 400 µl of 90% percoll below this layer. Twenty million spermatozoa were deposited over the column (Missio [27], with modifications), followed by centrifugation at 900 X G for 5 minutes, with the sperm pellet being diluted in 150 µl HEPES for cell analysis [28, 29].

The protocol adapted from Rawe [18] was used for sperm separation by MASS. To the sample containing 10 million spermatozoa, 1.5 ml of HEPES were added, followed by centrifugation at 300 X G for 10 min. The pellet was resuspended in 150 µl HEPES, and 20 µl of iron nanoparticles attached to annexin V were added (Miltenyi Biotec, Germany). After incubation for 30 minutes at ambient temperature, filtration in a proper magnetic separation column (MASS) was performed at the controlled

temperature of 37°C (filtration prototype in patent phase). The MASS comprises a column containing a matrix with ferromagnetic spheres and a high-power magnetic field in a separation column. The magnetic field effectively retains the sperms marked with the nanoparticles, and the wide matrix within the column ensures that the non-marked cells can flow easily. The filtrate or non-apoptotic fraction (SEMgood) was collected directly from the column, and the apoptotic fraction, attached to the microspheres (SEM-poor), was obtained by removing the column of the magnet and adding 300 µl of HEPES with the aid of a piston.

The values found were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). The data were assessed for normality of residuals (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances, with significance when  $p < 0.05$ . Comparisons between treatments were performed by the MIXED procedure of the SAS software (version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). The differences between treatments were obtained by Tukey's test, with significance when  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

The mean progressive motility observed in the fresh semen of the deer was  $75 \pm 4.28\%$ , and the vigor was  $2.83 \pm 0.16$ . The motility values observed in this study are similar to those observed in *M. americana* by Rola [10] ( $69.6 \pm 8.92\%$ ), in *M. gouazoubira* by Perroni [30] (80%), and in *M. nana* by Abreu [11] ( $70 \pm 8.16\%$  and vigor  $3.0 \pm 0.67$ ), but higher than in *Ozotocerus bezoarticus*, which was  $45-70\%$  [31].

Table 1 shows the mean values of progressive motility, vigor, and the types of major, minor, and total abnormalities of the sperm cells obtained in the four semen samples analyzed.

**Table 1.** Semen motility and vigor averages and morphological defects in sperm (%) observed in samples of Fresh semen, DGC, SEMgood, SEMbad in three species of deer *Mazama*.

	Treatments			
	Fresh	DGC	SEMgood	SEMbad
Progressive motility	$75 \pm 4.28^a$	$71.66 \pm 7.49^a$	$18.33 \pm 3.07^b$	$16.66 \pm 2.1^b$
Vigor (1-5)	$2.83 \pm 0.16^a$	$2.5 \pm 0.22^a$	$1.66 \pm 0.21^b$	$1 \pm 0^b$
Total defects	$41.83 \pm 10.25^a$	$14.83 \pm 3.17^b$	$12 \pm 3.01^b$	$33.83 \pm 8.49^a$
Major defects	$20.83 \pm 6.63^a$	$8.5 \pm 2.68^a$	$8.5 \pm 2.83^a$	$21.66 \pm 8.04^a$
Minor defects	$21 \pm 5.1^a$	$6.33 \pm 1.14^{ab}$	$3.5 \pm 0.84^b$	$12.16 \pm 1.42^a$

\* Different letters on the lines indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

The progressive motility and vigor of the spermatozoa were similar between the fresh semen and DGC samples, but low in the SEMgood and SEMpoor, maybe due to the higher sensitivity of the sperm cell in the species, the number of procedures to which the cell was subjected, and the long time spent in the analyses. Said and Lang [32] stated that all advanced methods of sperm selection involve elaborate and time-consuming manipulations and that the prolonged exposure of spermatozoa to non-physiological conditions can induce iatrogenic damage. Rawe [18] and Berteli [22] stated that the reduction in sperm motility after magnetic-activated cell sorting occurs due to the mechanic and magnetic forces within the column, which may lead to tail damage and reduction in motility, although with a high number of living cells. Rawe [18] observed that motility decreased by approximately 20% with the passage through the column since this parameter is mainly influenced by the lower number of fast progressive spermatozoa to the detriment of the higher number of slow progressive ones.

The mean total number of abnormalities verified in

the fresh semen of *M. gouazoubira* was 48%, while in *M. nemorivaga* it was 61%, and 14% in *M. americana*, with a mean total of  $41.83 \pm 10.25\%$ . The high number of sperm abnormalities in the fresh semen shows that semen quality is poor in most deer species and highly variable across species. Working with the same species as in this study, Rola [10] verified a higher number of pathologies in *M. americana*, with  $8.37 \pm 3.2\%$  of major defects and  $18.1 \pm 6.5\%$  of minor defects. Higher values were also verified by Perroni [33] in *M. nemorivaga*, with 73% of total defects. In *M. gouazoubira*, higher values compared to the ones of this study were verified by Perroni [33] (59.2% abnormalities) and Assumpção [6] (74%), while Perroni [30], Assumpção and Santos [7], and Assumpção [34] observed similar values of 46%, 43%, and 42.7% total abnormalities, respectively.

The total of abnormalities in the fresh semen was high but similar to the obtained in the SEMpoor sample. However, there was an expressive decrease of this parameter in the DGC and SEMgood samples. A high percentage of

**Table 2.** Individual morphological defects in sperm (%) observed in samples of Fresh semen, DGC, SEMgood, SEMbad in three species of deer *Mazama*.

	Fresh	Percoll	SEMboa	SEMruim
Abaxial/ retroaxial	0.7±0.3	0.2±0.7	0.0	1.2±0.8
Acrosome	0.2±0.1	0.0	0.0	2.3±1.4
Free normal heads	2.3±1.0	2.3±1.1	1.3±0.1	0.7±0.3
Cabeça isolada patológica	7.7±4.9 <sup>a</sup>	2.8±2.1 <sup>b</sup>	0.3±0.4 <sup>b</sup>	0.8±0.8 <sup>b</sup>
Folded tail	6.0±1.4 <sup>a</sup>	2.0±1.1 <sup>b</sup>	1.8±0.5 <sup>b</sup>	5.0±0.8 <sup>a</sup>
Curled tail	6.2±2.6 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	1.2±0.2 <sup>b</sup>	2.8±0.9 <sup>ab</sup>
Strongly folded and curled tail	6.8±2.0 <sup>a</sup>	1.3±0.2 <sup>b</sup>	2.7±0.0 <sup>ab</sup>	4.0±1.5 <sup>a</sup>
Abnormal contour	3.0±2.9 <sup>ab</sup>	2.3±0.3 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	6.8±2.4 <sup>b</sup>
Defects of midpiece	0.8±0.7	0.3±0.1	0.7±0.5	1.0±0.7
Narrow	0.0	0.0	0.8±0.6	1.2±0.5
Narrow at base	1.7±1.7	1.3±0.9	0.3±0.3	2.3±1.6
Distal cytoplasmic droplet	1.5±1.3	0.5±0.5	0.5±0.5	1.3±1.3
Proximal cytoplasmic droplet	3.3±3.3	1.2±0.9	1.3±0.8	3.7±2.9
Pouch formation	0.0	0.0	0.2±0.2	0.7±0.7

\*Different letters on the lines indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Tukey test.

morphological abnormalities can be considered normal in cervids, especially in species without reproductive selection<sup>[24]</sup>. Poor semen quality is a natural characteristic for wild populations that did not undergo artificial selection, domestication, and breeding<sup>[12]</sup>.

When comparing the DGC and MASS techniques, we verify that both were effective in reducing sperm abnormalities, removing mainly tail and head defects. In this study, MASS showed to be very effective in selecting high-quality functional spermatozoa in these cervid species, as also verified by Faezah<sup>[26]</sup> in bovines, and by Aziz<sup>[13]</sup>, Gil<sup>[35]</sup>, Odhiambo<sup>[36]</sup>, and Berteli<sup>[22]</sup> in human semen selected by magnetic activation.

Table 2 shows the mean values of individual abnormalities in the sperm cells obtained in the four semen samples analyzed.

Sperm abnormalities were classified according to the CBRA<sup>[25]</sup> guidelines for bovines since there is still no defect classification proposed for the studied species. We observed 14 types of sperm abnormalities, of which 4.84% were head defects, 10% of isolated heads, and 25.33% of tail and midpiece defects. As in this study, Abreu<sup>[11]</sup> also found, in *Mazama nana*, a higher incidence of tail defects ( $25.95 \pm 6.54$ ) than head defects ( $13.80 \pm 6.10$ ), as observed by Assumpção<sup>[34]</sup> in *M. gouazoubira*, with 4% head abnormalities and 32% tail abnormalities. Peroni<sup>[33]</sup> found similar abnormalities as this study in *M. nemorivaga* and *M. gouazoubira*.

When analyzing the defects individually, it is possible to observe that the tail defects (Table 2) decreased markedly after the DGC in relation to the fresh sample. The DGC also contributed to reducing other defects in the sperm cells, but more subtly. The MASS effectively reduced head defects such as abnormal shape and slender base. Regarding other defects, such as isolated heads, both the DGC and the SEMgood reduced their numbers, showing a significant difference in the case of isolated pathological heads. When analyzing the proximal and distal cytoplasmic droplets, it is noted that the DGC and MASS techniques were not effective in reducing these types of abnormalities.

It is worth noting that the MASS also acted in reducing tail defects of the spermatozoa, such as bent tail, curled tail, and strongly bent and curled tail, in which the SEMgood showed a significant difference compared to the other samples. Arrighi<sup>[14]</sup> observed that the PS is present in 61.4% of sperm membranes in all regions (head, midpiece, and tail), thus explaining the ANX/nanoparticles attachment in the tail region, removing these defects during cell selection by magnetic activation.

Similar results to this study regarding sperm morpholo-

gy were verified by Aziz<sup>[13]</sup> and Dirican<sup>[17]</sup>, with a similar morphology pattern between the density gradient and the non-apoptotic fractions, which showed a low number of abnormal heads, cytoplasmic droplets, and acrosome and midpiece defects, although differing significantly from the apoptotic fraction.

The mean values obtained for the number of living cells in the supravital test of the semen samples were: fresh  $80.5 \pm 1.97\%$ , DGC  $70.8 \pm 2.27\%$ , SEMgood  $80.3\% \pm 2.06$ , and SEMpoor  $26.7 \pm 3.67\%$ . The number of living cells was similar (no difference) in the samples, except the SEMpoor, which decreased by 67% in relation to the SEMgood, thus reaffirming that both the DGC and the MASS techniques are effective in removing dead cells from the semen sample. Although the difference was not significant, the SEMgood showed an 11.8% increase in the number of living cells in relation to the DGC. Faezah<sup>[26]</sup>, in the supravital test, observed that the magnetic separation method selects subpopulations with intact membranes, resulting in a higher number of living cells. Aziz<sup>[13]</sup> and Rawe<sup>[18]</sup>, analyzing membrane integrity, showed that magnetic-activated cell sorting separates cells with an intact membrane and reduces the oxidative stress of the samples. Manuel<sup>[20]</sup> stated that this technique reduces by 60 to 70% the number of apoptotic cells. Rawe<sup>[18]</sup> and Berteli<sup>[22]</sup> stated that despite the reduction in sperm motility observed after magnetic-activated cell sorting, the number of living cells recovered after the procedures is high.

#### 4. Conclusions

Both selection methods, density gradient centrifugation and sperm separation by magnetic activation, were effective in producing high-quality sperm samples, expressively reducing the number of abnormalities, with the subpopulation of non-apoptotic spermatozoa showing high sperm quality and a high number of living cells. These findings suggest that this nanotechnological method, using nanoparticles, is effective in producing high-quality semen samples in *Mazama* cervids.

#### Acknowledgement

To the Deer Research and Conservation Centre, Department of Animal Science, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, for the facilities and animals used in the study. To Prof. Dr. Mauricio Foschini, from the Physics Institute, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, for the development of the sperm separation system by magnetic activation.

## References

- [1] Howard JG. Assisted reproduction techniques in carnivores [M]. In: Zoo and Wild Animal Medicine IV, p. 449-457, Eds. ME Fowler and RE Miller. WB Saunders Co, Philadelphia, 1999.
- [2] Holt WV, Brown JL, Comizzoli P. Reproductive science as an essential component of conservation biology [J]. *Advanced Experimental Medical Biology*; 2014; 753: 3-14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_1).
- [3] Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Leite TG, Oliveira LZ, Lançon R, Rodrigues MP. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade [J]. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*; 2015; 39(1): 47-60. Available at [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Accessed on 2 March 2021.
- [4] Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line [J]. *Reproduction*; 2011; 141:139-150. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0232>.
- [5] IUCN. International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species [R]. 2018. Available at <https://www.iucnredlist.org/>. Accessed on 25 February 2021.
- [6] Assumpção TI, Santos ALQ, Macedo GG, Peixoto LR, Zampini ACA. Coleta e avaliação morfológica dos espermatozoides epididimários de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814 [C]. In: Encontro Sobre Animais Selvagens, 8; Simpósio Sobre Medicina e Conservação da Fauna do Cerrado, 3., 2016, Uberlândia. Anais...Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, p. 49-54. Available at [publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/issue/download/153/8](http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/issue/download/153/8). Accessed on 21 February 2021.
- [7] Assumpção TI, Santos ALQ. Cryopreservation of genetic material collected post-mortem from male gray brocket deer *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814 [J]. *International Journal of Current Science and Technology*; 2017; 5(9): 510-512. Available at <http://journalijcst.com/>. Accessed on 23 February 2021.
- [8] Duarte JMB, González S, Maldonado JE. The surprising evolutionary history of South American deer [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 2008; 49 (1) 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>.
- [9] Wildt DE, Comizzoli P, Pukazhenth BS, Songsasen N. Lessons from biodiversity-the value of nontraditional species to advance reproductive sciences, conservation, and human health [J]. *Molecular Reproduction Development*; 2010; 77(5): 397-409. <https://doi.org/10.1002/mrd.21137>.
- [10] Rola LD, Zanetti ES, Duarte JMB. Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity [J]. *Animal Production Science*; 2013; 53 (5):472-477. <http://dx.doi.org/10.1071/AN12247>.
- [11] Abreu CO, Martinez AC, Moraes W, Juvenal JC, Moreira N. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*) [J]. *Pesquisa Veterinária Brasileira*; 2009; 29: 993-998. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001200007>.
- [12] Christofolletti, M.D.; Pereira, R.J.G.; Duarte, J.M.B. Influence of husbandry systems on physiological stress reactions of captive brown brocket (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) – noninvasive analysis of fecal cortisol metabolites [J]. *European Journal of Wildlife Research*; 2010; 56:561-568. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0350-8>.
- [13] Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index [J]. *Human Reproduction*; 2007; 22(5): 1413-1419. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem016>.
- [14] Arrighi CV, Lucas H, Chardonnens D, Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 2009; 7: 1-12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-1>.
- [15] Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, Kiyani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between fertilization rate and early apoptosis in sperm population of infertile individuals [J]. *Andrologia*; 2014; 46: 36-41. <https://doi.org/10.1111/and.12038>.
- [16] Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique [J]. *Journal Andrology*; 2008; 29: 134-142. <https://dx.doi.org/10.2164/jandrol.107.003632>.
- [17] Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsarı C, Kanyılmaz O, Kaya A, Ünsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction [J]. *Journal Assisted Reproduction Genetics*; 2008; 25: 375-381. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9250-1>.
- [18] Rawe V, Álvarez G, Uriondo H, Papier S, Miasnik S, Nodar F. Separación magnética por columnas de anexinas V: "filtrado molecular" para la selección de espermatozoides no apoptóticos [J]. *Reproducción*; 2009; 24: 104-114. Available at <http://www.samer.org.ar/revista/>. Accessed on 03 March 2021.
- [19] Grunewald S, Paasch U. Sperm selection for ICSI

- using annexin V [J]. *Methods Molecular Biology*; 2013; 927:257–262. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_23).
- [20] Manuel TJ, José MM, María CA, Carlos Z, Estela MP. Use of Annexin V based Sperm Selection in Assisted Reproduction [J]. *Andrology*; 2017; 6(1): 1-10. <https://doi.org/10.4172/2167-0250.1000182>.
- [21] Curti G, Skowronek F, Vernochi R, Rodriguez-Buzzi AL, Rodriguez-Buzzi JC, Casanova G, Sapiro R. Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MASS) [J]. *Reproductive Biology*; 2014; 14: 289-292. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.07.002>.
- [22] Berteli TS, Broi MG, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa [J]. *Andrology*; 2017; 5(4): 776-782. <https://doi.org/10.1111/andr.12372>.
- [23] Duarte JMB, Garcia JM. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros [J]. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*; 1995; 19(1-2): 111-121. Available at [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Accessed on 20 February 2021.
- [24] Zanetti ES, Duarte JMB, Polegato BF, Garcia JM, Canola J. Assisted Reproductive Technology [M]. In: Duarte JMB, Gonzalez S. (Eds.) *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Funep/IUCN: Jaboticabal, SP, pp. 255-270. 2010.
- [25] CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal [M]. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104p. Available at [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Accessed on 20 February 2021.
- [26] Faezah SSM, Zuraina FMY, Farah JHF, Khairul O, Hilwani NI, Iswadi MI, Fang CN, Zawawi I, Abas OM, Fatimah SI. The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitation status [J]. *Zygote*; 2012; 22: 378-386. <https://doi.org/10.1017/s0967199412000597>.
- [27] Missio D, Folchini NP, Leivas FG, Pavin CIUM, Hirya Fernandes Pinto, Cibin FWS, Brum DS. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development [J]. *Animal Reproduction Science*; 2018; 192: 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.002>.
- [28] Makkar G, Ng HY, Yeung SB, Ho PC. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium [J]. *Fertility and Sterility*; 1999; 72(5): 796-802. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00375-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00375-1)
- [29] Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA. Effect of percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos [J]. *Theriogenology*; 2009; 71:1289-1297. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>.
- [30] Peroni EDFC. Inseminação artificial intrauterina por videolaparoscopia em veado catíngueiro (*Mazama gouazoubira*), com sêmen congelado [M]. 56p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2013. Available at <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/98182>. Accessed on 5 February 2021.
- [31] Duarte JMB, Garcia JM. Tecnologia da reprodução para a propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção, p.228-238 [M]. In: Duarte J.M.B. (Ed.). *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastoceros, Ozotoceros e Mazama*. Funep: Jaboticabal, SP, 1997.
- [32] Said TM, Land, JA [J]. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update*; 2011; 17(6): 719-733. <http://dx.doi.org/doi: 10.1093/humupd/dmr032>.
- [33] Peroni EDFC, Zanetti ES, Rola LD, Cursino MS, Duarte JMB. Morfologia espermática dos veados-cinza brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*) mantidos em cativeiro: resultados preliminares [C]. In: XV Congresso ABRAVES, Florianópolis, 2012. Anais..., p.130-133. Available at <https://www.researchgate.net/publication/317039867>. Accessed on 5 February 2021.
- [34] Assumpção TI, Santos ALQ, Cardoso GF. Morfologia dos espermatozoides no trato reprodutivo de veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814 [C]. In: Reunião anual da ABRAA, IV, Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2019, Goiânia. Anais ... p. 263-266. Campo Grande, MS: Editora UFMS, 2019, 269 p. Available at [www.abraa.org.br](http://www.abraa.org.br). Accessed on 21 February 2021.
- [35] Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MASS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis [J]. *Journal Assisted Reproduction Genetic*; 2013; 30:479-485. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9962-8>.
- [36] Odhiambo JF, DeJarnette JM, Geary TW, Kennedy CE, Suarez SS, Sutovsky M, Sutovsky P. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen [J]. *Biology of Reproduction*; 2014; 91(4): 1-10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121897>.