

MÁRCIO MENEZES NUNES

**REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO SUBMETIDO À
SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM COLOIDE DE CAMADA ÚNICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Nunes, Márcio Menezes, 1976-

N972r Refrigeração e congelamento de sêmen equino submetido à
2015 seleção espermática em coloide de camada única / Márcio
Menezes Nunes. – Viçosa, MG, 2015.
v, 28 f. : il. ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Equinos - Espermatozóides. 2. Refrigeração. 3. Equinos -
Inseminação artificial. 4. Reprodução animal. 5. Centrifugação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

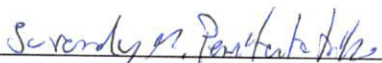
CDD 22. ed. 636.10821

MÁRCIO MENEZES NUNES

**REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO SUBMETIDO À
SELEÇÃO ESPERMÁTICA EM COLOIDE DE CAMADA ÚNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

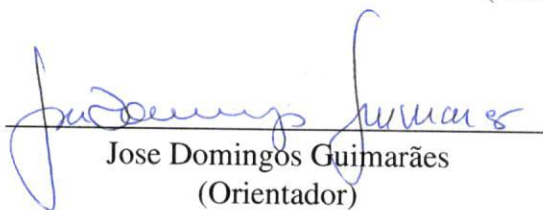
APROVADA: 26 de agosto de 2015.



Jurandy Mauro Penitente Filho



Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)



Jose Domingos Guimarães
(Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A célula espermática.....	4
2.2. A refrigeração.....	5
2.3. Os diluentes e a criopreservação.....	6
2.4. A centrifugação.....	7
2.5. A avaliação computadorizada da motilidade espermática - CASA.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
Effect of storage and Single Layer Centrifugation before cryopreservation on Cryosurvival of stallion sperm	19

RESUMO

NUNES, Márcio Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Refrigeração e congelamento de sêmen equino submetido à seleção espermática em coloide de camada única.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa e José Dantas Ribeiro Filho.

Apesar de haver perda progressiva da qualidade espermática conforme aumenta o intervalo desde a colheita até o processamento do sêmen, muitas vezes não é possível manipular o ejaculado visando o congelamento imediatamente. Nestes casos o armazenamento refrigerado e a centrifugação em coloide de camada única (SLC) antes do congelamento podem melhorar o potencial de criopreservação. Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de investigar se ejaculados de garanhões Crioulos podem ser armazenados por 8 horas nas temperaturas de 5° C ou 15° C antes de serem submetidos à SLC e congelados, mantendo aceitável percentual de motilidade progressiva após o descongelamento. Sêmen de 16 garanhões foi utilizado, sendo um ejaculado de cada animal (n=16) e diluídos com diluente comercial com base em gema de ovo (Gent®) para a concentração de 50×10^6 spz/mL. Cada ejaculado foi dividido em 6 tratamentos, como segue: 1) Centrifugação tradicional e congelamento imediato; 2) SLC e congelamento imediato; 3) Congelamento após centrifugação tradicional com 8h de armazenamento a 5° C; 4) Congelamento após SLC com 8h de armazenamento a 5° C; 5) Congelamento após centrifugação tradicional com 8h de armazenamento a 15° C; 6) Congelamento após SLC com 8h de armazenamento a 15° C. Os *pellets* foram ressuspensos em diluente de congelamento comercial (Equiplus Freeze®) para a concentração de 200×10^6 spz/mL e envazados em palhetas de 0,5mL. A motilidade progressiva (MP) foi avaliada pelo sistema CASA (AndroVision®) nos seguintes momentos: 1) Ejaculado *in natura*; 2) Sêmen diluído; 3) Após refrigeração (para as amostras armazenadas); 4) Imediatamente antes do congelamento; 5) Amostra descongelada. A MP foi maior para as amostras submetidas à SLC em comparação às centrifugadas da forma tradicional em todos os protocolos. A melhor MP pós-descongelamento foi observada quando a SLC e a criopreservação foram feitas imediatamente após a colheita do ejaculado ($p < 0,001$). Não houve diferença na MP entre os dois protocolos com refrigeração

(5° C e 15° C; $P > 0,05$). Um maior percentual de ejaculados apresentou MP $\geq 30\%$ quando submetidos à SLC em comparação ao método tradicional, independente do protocolo ($P < 0,01$). As análises foram realizadas por ANOVA e qui-quadrado. É possível armazenar sêmen de garanhões Crioulos por 8 horas na temperatura de 5° C ou 15° C antes de proceder a SLC e o congelamento, obtendo ainda um aceitável percentual de MP pós-descongelamento, contudo há variação entre garanhões.

ABSTRACT

NUNES, Márcio Menezes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Effect of storage and Single Layer Centrifugation before cryopreservation on Cryosurvival of stallion sperm.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa and José Dantas Ribeiro Filho.

Although sperm quality deteriorates with increasing time between collection and processing, it is not always feasible or practical to process stallion semen for freezing immediately after collection. Semen storage and processing by Single Layer Centrifugation (SLC) prior to freezing may improve cryosurvival. Thus the objective of the present study was to investigate whether stallion semen can be stored for 8h at 5° or 15° C prior to SLC and freezing, and still provide acceptable post-thaw results. Semen was collected from 16 stallions (n=16), diluted with semen extender (Gent©) to 50×10^6 spz/mL and split between the different storage treatments as follows: i) uncentrifuged immediate freezing; ii) SLC, immediate freezing; iii) uncentrifuged storage for 8h at 5°C; iv) storage for 8h at 5°C and SLC; v) uncentrifuged storage for 8h at 15°C; and vi) storage for 8h at 15°C and SLC. Sperm pellets were resuspended in freezing extender (EquiPlus Freeze©) at a concentration of 200×10^6 /mL. Sperm motility was measured by computer assisted sperm analysis (AndroVision©) in the moments: i) in the raw ejaculate immediately after collection; ii) after extension; iii) after cooling (for stored samples only); iv) immediately prior to freezing; v) post-thawing. Progressive motility was higher in the SLC samples than in the corresponding uncentrifuged for all storage protocols, the best progressive motility was seen in the samples where SLC was done immediately after semen collection ($P < 0.001$). There was no difference in the progressive motility between the two storage temperatures, 5°C and 15°C ($P > 0.05$). More ejaculates showed an acceptable post-thaw motility of $\geq 30\%$ after SLC processing than uncentrifuged, regardless of storage protocol ($P < 0.01$). It is possible to store stallion semen for 8h at 5°C or 15°C prior to SLC and freezing, and still obtain acceptable post-thaw motility, although there is variation between stallions.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na reprodução equina assistida frequentemente há demanda para a criopreservação de sêmen em locais de infraestrutura laboratorial precária e em muitas ocasiões esta oportunidade de renda aparece para profissionais em meio às suas atividades durante a estação de monta. Esta época consiste em um período de grande atividade diária envolvida com o controle folicular de éguas, inseminações, lavados uterinos nas rotinas de transferências de embriões e, para muitos, excessivo gasto de tempo com o deslocamento entre as propriedades contratantes. Tamanho conjunto de atividades se torna um obstáculo à aceitação de muitas ofertas para criopreservação de sêmen e, conseqüentemente, há perda de oportunidades que contribuiriam com os ganhos do médico veterinário.

As atividades do controle reprodutivo visando maior eficiência no curto período da estação de monta imprimem à criopreservação de sêmen uma condição desfavorável, pouco prioritária e predominantemente empírica. No entanto, frente às atividades principais do período de monta, esta é a única alternativa para a realização desta tarefa.

Ainda é raro o médico veterinário que se dedique integralmente à criopreservação de sêmen equino, contando com um laboratório móvel completamente equipado para o processamento do ejaculado durante todo o ano e, conseqüentemente, sem a restrição de tempo imposta pela estação reprodutiva. Alguns profissionais possuem equipamentos para este procedimento, transportando-os nas ocasiões previamente agendadas, enquanto outros possuem algum cliente com laboratório bem equipado que utilizam para suas atividades extras. As duas estratégias apresentam inconvenientes e riscos, uma pela exposição dos equipamentos aos danos decorrentes do frequente transporte (microscópio, centrífuga, máquina de congelamento, banho-maria, etc) e a outra pela utilização de materiais de terceiros, algo que pode gerar desacordos comerciais frequentemente.

Ainda que exista disponibilidade de uma central de reprodução bem equipada, um haras que empreste seu laboratório ou mesmo um local na residência onde estejam os equipamentos, a estratégia do transporte dos ejaculados é uma questão que demanda segurança para restringir as oscilações nos resultados desta criopreservação tardia dos ejaculados.

O transporte de sêmen refrigerado é uma atividade rotineira na reprodução equina assistida visando a inseminação artificial. Esta expertise pode, contudo, ser melhor explorada e utilizada também para o transporte de ejaculados destinados à criopreservação. Vale ressaltar que enquanto o envio de doses inseminantes foca inseminações realizadas em até 48 horas, ejaculados para o congelamento precisam apenas ser transportados por período máximo de oito horas. Uma vez considerando os possíveis benefícios financeiros e logísticos do congelamento de sêmen após o transporte refrigerado por um curto período de oito horas, definir a temperatura de transporte é mais uma questão que demanda resposta, pois implica diretamente na longevidade das células espermáticas, reduzindo em menor ou maior grau o metabolismo destas e, conseqüentemente, sua viabilidade. O transporte de doses de sêmen é realizado predominantemente em temperatura de 5° C, estabelecida como ideal para um período de 24 a 48 horas até a inseminação. Resta determinar se esta mesma temperatura de resfriamento é a ideal para o transporte do ejaculado e posteriormente submissão em processo de criopreservação. A temperatura de 15° C, por sua vez, reduz menos o metabolismo celular, contudo é uma alternativa viável para ejaculados que não refrigeram bem e compreende uma alternativa que deve ser testada para o curto transporte de ejaculados destinados a criopreservação. Tal procedimento poderá torna-se uma etapa de refrigeração intermediária no protocolo de congelamento, mantendo certo percentual de atividade espermática e maior interação com o meio diluidor se comparada com a refrigeração de 5° C. Esta prática já demonstrou benefícios em alguns protocolos de criopreservação em comparação com temperaturas inferiores ou mesmo com congelamentos imediatos, sendo esta incubação benéfica para a maior motilidade final do sêmen descongelado em alguns casos já relatados.

A redução da temperatura na refrigeração, assim como na criopreservação tardia ou imediata, é um procedimento danoso aos

espermatozoides, contudo pode ser amenizada com emprego de protocolos mais adequados para estes fins. Desta forma, buscando assegurar o menor dano possível às células espermáticas durante o transporte refrigerado, é importante considerar a utilização de um diluidor com bom potencial de tamponamento, estabilização de membranas celulares, nutrição celular e controle do crescimento microbiológico. Há diversos componentes dispersos em várias combinações comerciais de meios diluidores, porém predominantemente com leite ou gema de ovo, sendo este último, componente apontado como superior em comparação ao leite e suas frações, principalmente no tocante ao seu poder de estabilização de membranas, algo que confere maior longevidade ao sêmen e, possivelmente, melhor qualidade pós-descongelamento.

A centrifugação do sêmen equino é necessária para a criopreservação, sendo outro procedimento indispensável e que gera danos às células, no entanto, há formas de reduzir esta agressão e a perda de qualidade dos espermatozoides. A centrifugação visa eliminar o plasma seminal, possibilitando posterior ressuspensão do *pellet* apenas com o diluente eleito, seja ou não nas situações de congelamento imediato ou para o simples transporte refrigerado, dentre outras finalidades. Como limitação deste procedimento, para a recuperação de bom número de espermatozoides é necessária a centrifugação com grande velocidade, compactando as células no fundo do tubo e causando lesões físicas. Por outro lado, centrifugar com menor velocidade causa a perda de muitas células espermáticas no sobrenadante, reduzindo o número de doses inseminantes.

Visto que a centrifugação é necessária, o plasma seminal precisa ser retirado para melhores resultados e que o mínimo dano às células deve ser causado, a técnica de centrifugação em coloide de camada única aparece como uma solução útil neste contexto e ainda apresenta a vantagem de, além de cumprir estas exigências inerentes à criopreservação, ela também filtra os espermatozoides danificados e que atuam lesionando células íntegras por modificarem a composição do meio, dentre outras ações prejudiciais. Processando apenas espermatozoides com boa qualidade morfológica, maior integridade de DNA e superior qualidade de membranas, as doses produzidas

terão maior qualidade se comparadas àquelas partidas nas quais os espermatozoides foram separados por centrifugação convencional.

Neste cenário, é importante definir a melhor estratégia para o transporte e congelamento tardio de sêmen equino de garanhões comprovadamente férteis, utilizando todos os ejaculados colhidos destes para representar de maneira fiel os variados desafios cotidianos, inclusive as diversas qualidades do sêmen *in natura*, independente de sua motilidade progressiva mínima. Desta forma, será possível entender se em algumas situações há predileção para o congelamento tardio frente ao congelamento direto, ou vice-versa. O período de incubação pode afetar positivamente a motilidade progressiva obtida após o descongelamento em alguns ejaculados, enquanto para outros casos este período de refrigeração pode comprometer sobremaneira o resultado. Além disto, a diferenciada metodologia de centrifugação pode atuar deixando indiferente o momento do processamento, conferindo liberdade para a escolha do horário de manipulação ao médico veterinário com a segurança necessária ao sucesso no descongelamento.

Este estudo tem como objetivo avaliar o congelamento tardio de espermatozoides equinos, verificar a sinergia da diluição do sêmen com meio com base de gema de ovo, a seleção espermática de um coloide de centrifugação e a temperatura de refrigeração pelo período de oito horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A célula espermática

Os espermatozoides são células especializadas para a função de fertilização de um oócito (AURICH, 2008). Tamanha especialização atribuiu igualmente perdas de habilidades e componentes celulares, configurando uma célula com grande capacidade de locomoção, porém de reduzida biossíntese, tornando-a mais frágil se comparada com outras células do organismo (VARNER et al., 1989).

Após a ejaculação os espermatozoides passam por modificações celulares sequenciais, resultando na capacitação espermática e reação acrossômica, sendo eventos fundamentais para a fertilização desde que ocorram no momento correto (ROTA et al., 2004). Células que prematuramente tiverem reação acrossômica ou capacitação estarão inaptas para a fertilização, contudo fatores que retardem demasiadamente estas modificações irão igualmente prejudicar a sua função primordial.

Alterações na estrutura da membrana celular culminam em perda da viabilidade espermática, algo que ocorre em maior ou menor grau durante a criopreservação. A sobrevivência espermática à refrigeração ou congelamento depende da taxa de resfriamento utilizada, assim como a de aquecimento, o tempo em que a célula permaneceu em cada etapa e a consequente troca de substâncias com o meio extracelular (BEDFORD et al., 1995). As lesões ocasionadas neste processo são atribuídas ao efeito da mudança de temperatura sobre a resposta celular à formação de cristais de gelo intracelular, danos oxidativos, alterações na permeabilidade e arranjo da membrana do espermatozoide, além do stress osmótico (WATSON, 2000).

2.2.A refrigeração

A inapropriada manipulação, diluição e refrigeração do ejaculado podem interferir negativamente nestas etapas e no tempo de preparo das células espermáticas para a fertilização (O'CONNELL et al., 2002). A refrigeração dos espermatozoides a 5° C altera o estado das membranas celulares para conformação gelatinosa além de reduzir o metabolismo celular para aproximadamente 10% quando comparado ao armazenamento em temperatura ambiente (PADILLA et al., 1991). Esta redução metabólica prolonga a vida dos espermatozoides por também reduzir consideravelmente a produção de CO₂ e ácido láctico, retardando a acidificação do sêmen e a peroxidação de lipídeos de membrana que acarretam danos celulares permanentes (BAUMBER et al., 2002).

Os danos causados aos espermatozoides pelo choque térmico foram atribuídos principalmente à desorganização da membrana plasmática, fato que estimulou a realização de diversos estudos no intuito de determinar as temperaturas seguras de transporte e a taxa de resfriamento do ejaculado (VARNER et al., 1988; MORAN et al., 1992; LOVE et al., 2012). Temperaturas de transporte de 5 °C, 15 °C e 20 °C são aceitáveis e indicadas, variando conforme o diluente e o período de armazenamento empregado e as características individuais dos ejaculados (VARNER et al., 1989; BEDFORD et al., 1995; BACKMAN et al., 2004).

Varner et al. (1989) verificaram que amostras refrigeradas por 24 horas diluídas em meios contendo componentes de leite apresentaram melhores taxas de fertilidade e motilidade espermática quando mantidas a 5 °C em comparação a 20 °C, sendo corroborados por CROCKETT et al. (2001) que pesquisavam estratégias para o envio de ejaculados sob refrigeração de 5 °C para a criopreservação após 24 horas. No entanto, a influência de diferentes diluentes nestas mesmas temperaturas não foi avaliada ou mesmo o efeito benéfico que pode existir em alguns protocolos com um período de refrigeração antecedendo a criopreservação, como demonstrado por Fürst R. (2006).

2.3. Os diluentes e a criopreservação

Os diluentes de sêmen são desenvolvidos buscando atender às demandas celulares preservando a sua capacidade fecundante. Apesar de o plasma seminal ser próprio do ejaculado, a diluição também visa diminuir a sua concentração e retardar as alterações de membrana por ele catalisadas, além disto, adição de antibióticos, pressão osmótica entre 300 e 400 mOsm, pH próximo de 7 e nutrientes caracterizam o diluente (ENGLAND, 1993; PAGL et al., 2007). Independente se o constituinte-base do diluente é a gema de ovo (MARTIN et al., 1979; CRISTANELLI et al., 1985) ou leite desnatado e seus derivados (KENNY et al., 1975; DOUGLAS-HAMILTON et al., 1987) o balanço apropriado de nutrientes, minerais e a neutralização das substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo celular conferem maior longevidade aos espermatozoides pela estabilização das membranas e seus sistemas enzimáticos.

A criopreservação requer, além de apropriada curva de congelamento (CLULOW et al., 2007), células íntegras e nutrição adequada, assim com eficaz ação do crioprotetor que compõe o diluente, possibilitando a desidratação da célula espermática, com a manutenção da organização das membranas celulares com o menor estresse osmótico possível (OLDENHOF et al., 2013).

Apesar disto, a influência da variabilidade individual na resposta às características do diluente de congelamento foi novamente demonstrada por Rodríguez et al. (2011) para garanhões, corroborando os estudos de Heitland et al. (1996) e Ecot et al. (2000) em comparações entre diferentes percentuais de gema de ovo, componentes do leite e glicerol nas formulações dos diluentes de refrigeração e criopreservação. Desta forma, ainda que exista uma formulação que atenda eficazmente grande parte dos ejaculados, sempre há possíveis composições que servirão para o congelamento ideal de garanhões específicos.

2.4.A centrifugação

A centrifugação no processamento de sêmen equino é utilizada para a separação do plasma seminal das células espermáticas e posterior ressuspensão destas no meio diluidor apropriado ao protocolo desejado. O plasma seminal contém substâncias que são benéficas para os espermatozoides, contudo, não é um meio ideal para a refrigeração e armazenamento destas células. Altas concentrações de plasma seminal são mostradas como deletérias aos espermatozoides (BRINSKO et al., 2000; MORRELL et al., 2012), contudo ainda não foram completamente elucidadas quais são todas as substâncias responsáveis por esta redução da motilidade. Sendo assim, as opções são obter na colheita apenas a fração rica (KATILA et al., 2001) do ejaculado ou centrifugá-lo (MORRELL et al., 2012; NETO et al., 2013; ALVARENGA et al., 2014), havendo correlação positiva entre esta remoção e a subsequente motilidade progressiva.

Considerando a necessidade de remoção do plasma seminal e o dano celular causado por excessiva força de centrifugação, técnicas utilizando o iodixanol para o amortecimento na centrifugação foram testadas (ECOT et al.,

2005; KNOP et al., 2005) obtendo performance eficaz para atender a estas demandas. No entanto, nenhuma técnica realizou de forma prática a seleção espermática das amostras, sendo capaz de separar o plasma seminal sem danos e ainda diferenciar os espermatozoides com melhores características morfológicas, funcionais e que, possivelmente, terão maior viabilidade. Possibilitando, inclusive, a utilização de amostras ruins ou ejaculados que *in natura* apresentam baixo percentual de motilidade espermática (MACPHERSON et al., 2002; MORRELL et al., 2008).

Com este objetivo as metodologias de centrifugação foram desenvolvidas buscando atender à necessidade de separação de diferentes tipos celulares usando coloides de diferentes densidades, sendo posteriormente destinada à separação de células espermáticas de ejaculados suínos por De vries & Colenbrander (1990) utilizando gradientes de polivinilpirrolidona. Sharma et al. (1997) demonstraram a eficiência da técnica na reprodução humana, obtendo melhoria da fertilidade em ejaculados oligospermicos. Em equinos, a centrifugação com coloide (EquiPure[®]) foi relatada por Macpherson et al. (2002) como eficaz para a separação de baixo número de espermatozoides, contudo, demonstrou ser um método pouco prático para a seleção de amostras com grandes volumes. Morrell et al. (2008 a, b) demonstraram que a centrifugação em gradiente de camada única é uma forma mais prática para a seleção de amostras com volumes maiores. Em 2011, Morrell e colaboradores destacaram que os coloides regularmente usados são compostos de sílica em uma mistura de sais, açúcares e tampões, e que a composição destas misturas, o pH e a osmolaridade, assim como a densidade, influenciam no número de espermatozoides recuperados e em sua qualidade.

A centrifugação em camada única consiste em uma técnica na qual espermatozoides móveis com morfologia, membrana celular e cromatina intactas são separados do resto do ejaculado por centrifugação, ocorrendo o mesmo para o plasma seminal (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009). Estes espermatozoides atravessam a solução coloidal impulsionados por uma força de centrifugação inferior à convencional e formam um *pellet* no fundo do tubo cônico. O plasma seminal com as células danificadas e o diluente são retidos

acima da solução coloidal, na interface entre o coloide e a amostra diluída inicial (MORRELL et al., 2011).

Os espermatozoides retidos na interface são imóveis, morfologicamente anormais, com defeitos de cromatina ou membranas celulares lesionadas. Se muitos espermatozoides forem submetidos à centrifugação ao mesmo momento, ou mesmo em quantidade muito elevada de células com defeitos, alguns espermatozoides íntegros poderão ser bloqueados na travessia pelo coloide e serão encontrados na interface entre as duas camadas. O *pellet* terá melhor qualidade espermática que as amostras não selecionadas (MORRELL et al, 2009 a, b), maior motilidade espermática (MORRELL et al, 2010) e potencial de fertilização (LINDAHL et al., 2011) por período mais longo.

2.5.A avaliação computadorizada da motilidade espermática - CASA

A avaliação computadorizada dos parâmetros de motilidade espermática padroniza os critérios que compõem os resultados obtidos e elimina a subjetividade dos dados. Diversas são as medidas que se unem para avaliar a motilidade espermática progressiva e atribuir o percentual médio de motilidade progressiva da amostra (LOOMIS et al., 2008; AMANN et al., 2014).

Centenas de células espermáticas são avaliadas por campo e a velocidade individual é medida em *microns* por segundo, contudo o padrão do deslocamento caracteriza o tipo de velocidade, sendo VCL, VAP e VSL as principais. VCL (velocidade curvilínea) representa a distância completa percorrida no trajeto da cabeça do espermatozoide, VAP é uma velocidade calculada com a distância média entre os pontos percorridos pelo espermatozoide e VSL considera apenas a distância em linha reta entre a cabeça do espermatozoide no início e no final do tempo mensurado (AMANN et al., 1980). Outros importantes parâmetros compostos a partir destas mensurações iniciais são os percentuais de linearidade (LIN; $VSL/VCL \times 100$) e o percentual de movimentação à frente (STR; $VSL/VAP \times 100$) do espermatozoide (LOOMIS et al., 2008).

Considerando que na fisiologia reprodutiva os espermatozoides precisam percorrer um trajeto até o terço médio da ampola para realizarem a fecundação, o parâmetro de motilidade progressiva é estabelecido como um indicador razoável para a avaliação da qualidade da amostra quanto a possibilidade de alcançar o sítio de fecundação. Sendo assim, uma forma objetiva de se obter a motilidade progressiva é definindo uma célula com VAP superior a 50 *microns*/segundo e uma STR maior que 75% (LOOMIS et al., 2008), contudo tais valores de corte podem ser redefinidos pelos técnicos dos laboratórios, considerando o período de aquecimento antes da avaliação da amostra, a utilização ou não de câmaras de contagem e demais fatores que podem incidir na velocidade das células espermáticas (LOOMIS et al., 2008).

Assim como é necessária uma padronização para a classificação de um movimento como progressivo (e não imóvel, local ou circular, por exemplo), é internacionalmente estabelecido que o ejaculado deve apresentar no mínimo de 30% de motilidade espermática progressiva para ser aprovado para uso em programa de inseminação artificial. Este valor, ainda que arbitrário, serve como referência para muitas partidas congeladas (LOOMIS et al., 2008). Certamente este é apenas um valor utilizado por ser mensurável e com o qual se busca prever a fertilidade da amostra, contudo a fertilização é sabidamente o resultado da interação de um conjunto de fatores uterinos, espermáticos e oocitários (SEIDEL et al., 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; NETO, C.R.; PAPA, F.O. Strategies to improve the quality and fertility of stallion sêmen. **Spermova**.v.4(2).p.172-178. 2014.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of Reproduction**. v.23.p.647-56. 1980.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**. v.81.p.5-17. 2014.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**. v.107. p.268-275. 2008.

BACKMAN, T.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.J. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **Journal of Animal Science**. v.82.p.690-4. 2004.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**. v.68.p.181-190. 2001.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. **Theriogenology**. v.58.p.301-302. 2002.

BEDFORD, S.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Use of two extenders to cool stallion spermatozoa to 5 degrees C with and without seminal plasma. *Theriogenology*. v.43(5).p.939-53. 1995.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*.v.54.p.129-136. 2000.

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.A.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. v.108.p.298–308. 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. 2 ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.

CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-edd yolk extender and freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*. v.24.p.681-685. 1985.

CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*. v.55.p.793-803. 2001.

DE VRIES, A.C.; COLENBRANDER, B. Isolation and characterization of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet. *International Journal of Biochemistry*. v.22, p. 519-524. 1990.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; BURNS, P.J.; DRISCOLL, D.D. Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. ***Journal of Reproduction and Fertility***. v.35.p.649-650. 1987.

ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; DELHOMME, G.; VIDAMENT, M. Evaluation of cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. ***Animal Reproduction Science***. v.89.p.245-48. 2005.

ECOT, P.; VIDAMENT, M.; DE MORNAC, A.; PERIGAULT, K.; CLÉMENT, F.; PALMER, E. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. ***Journal of Reproduction and Fertility Supplement***. v.56.p.141-50. 2000.

ENGLAND, G.C. Cryopreservation of dog semen: a review. ***Journal of Reproduction and Fertility Supplement***. v.47.p.243-55. 1993.

FÜRST, R. ***Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino***. 2006. 96f. Tese doutorado - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. ***Equine Veterinary Journal***. v.28.p.47-53. 1996.

KATILA, T.; KARESKOSKI, M.; AKCAY, E.; REILAS, T.; KOSKINEN, E.; CALVETE, J.J. Seminal plasma studies in stallions. ***Havemeyer Foundation Mono Series***.v.18.p.3-5. 2005.

KENNY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. ***Proceedings of American Association of Equine Practitioners***. v.21.p.327-336. 1975.

KNOP, K.; HOFFMANN, N.; RATH, D.; SIEME, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. ***Animal Reproduction Science***. v.89.p.294-297. 2005.

LINDAHL, J.; DALIN, A.M.; MORRELL, J.M. Pregnancies in mares inseminated with spermatozoa selected by single layer centrifugation and stored for 48h or 72h. ***Reproduction of Domestic Animals***. v.46. p.158. 2011.

LOOMIS, P.R., GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. ***Animal Reproduction Science***. v.105.p.119-218. 2008.

LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; VOGEL, J.; BLISS, S.; SUDDERTH, K.; TEAGUE, S.; LaCAZE, K. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. ***Theriogenology***. v.77(9).p.1911-7. 2012.

MACPHERSON, M.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; THOMPSON, J.A.; VARNER, D.D.; Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. ***Theriogenology***. v.58.p.317-320. 2002.

MACPHERSON, M.L.; SHORE, M.D.; FERNANDEZ, M.H.; MILLER, C.D.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa. **Havemeyer Foundation Mono Series**. v.6.p.27-29. 2001.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v.38(6).p.999-1012. 1992.

MORRELL, J.M.; Biomimetics in action: practical applications of single layer centrifugation for equine breeding. **Veterinary Science and Technology**. v.2, p.107. 2011.

MORRELL, J.M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. **Animal Reproduction**. v.5, p.121-126. 2008.

MORRELL, J.M.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. **Equine Veterinary Journal**. v.41. P.53-58. 2009.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. **Reproduction Domestic Animals**. v.44. p.512-517. 2009.

MORRELL, J.M.; MACIAS GARCIA, B.; PENA, F.J.; JOHANNISSON, A. Processing stored stallion sêmen doses by single layer centrifugation. *Theriogenology*. v.76, p.1424-1432. 2011.

MORRELL, J.M.; PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; SAMPER, J.C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Techniques for sperm clean-up and selection of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. v.107, p.333-334. 2008.

MORRELL, J.M.; PIHL, J.; DALIN, A.M.; JOHANNISSON, A. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology*.v.78.p.345-352. 2012.

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

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size: data from 3 breeding seasons. *Equine Veterinary Journal*. v. 42. p. 579-585. 2010.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*. v.17. p. 704-709. 2002.

OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. ***Biology of Reproduction***. v.68.p.1-11. 2013.

PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. ***Journal of Animal Science***. v.69. p.3308-3313. 1991.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. ***Theriogenology***. v.66. p.1115-1122. 2007.

RAPHAEL, C.F. ***Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide eqüino refrigerado***. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.

RODRÍGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; GARCÍA, B.M.; MORRELL, J.M.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. ***Animal Reproduction Science***. v.127(1-2).p.78-83. 2011.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. ***Reproduction Domestic Animals***. v.39.p.103-109. 2004.

SEIDEL, G.E.Jr. Several insights on evaluation of semen. ***Animal Reproduction***. v.9. p.329-332. 2012.

SHARMA, R.K.; SEIFARTH, K.; AGARWAL, A. Comparison of single and two-layer Percoll separation for selection of motile spermatozoa. ***Internal Journal of Fertility in Women Medicine***. v.42. p.412-417. 1997.

SHORE, M.D.; MACPHERSON, M.L.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. ***Theriogenology***. v.50(5). p.693-8. 1998.

STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. ***Theriogenology***, v. 58, p. 397-400. 2002.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. ***Theriogenology***. v.29(5).p.1043-54. 1988.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. ***Theriogenology***. v.28. p.709-723. 1987.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24h at 5 or 20 °C. ***Theriogenology***. v.32. p.515-525. 1989.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. ***Animal Reproduction Science***. v.60-61. p.481-492. 2000.

Effect of storage and Single Layer Centrifugation before cryopreservation on Cryosurvival of stallion sperm

Nunes MM^{1,2}, Morrell JM³, Anselmo A⁴, Santos FCC⁵, Guimarães JD¹

¹ *Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais (MG), Brasil*

² *Minitub of Brazil Ltda, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil*

³ *Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden*

⁴ *Veterinarian practitioner, Cabanha do Parque horsefarm, Canela, RS*

⁵ *Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil*

Summary

Although sperm quality deteriorates with increasing time between collection and processing, it is not always feasible or practical to process stallion semen for freezing immediately after collection. Semen storage and processing by Single Layer Centrifugation (SLC) prior to freezing may improve cryosurvival. Thus the objective of the present study was to investigate whether stallion semen can be stored for 8h at 5° or 15° C prior to SLC and freezing, and still provide acceptable post-thaw results. Semen was collected from 16 stallions (n=16), diluted with semen extender (Gent©) to 50x10⁶ spz/mL and split between the different storage treatments as follows: i) uncentrifuged immediate freezing; ii) SLC, immediate freezing; iii) uncentrifuged storage for 8h at 5°C; iv) storage for 8h at 5°C and SLC; v) uncentrifuged storage for 8h at 15°C; and vi) storage for 8h at 15°C and SLC. Sperm pellets were resuspended in freezing extender (EquiPlus Freeze©) at a concentration of 200x10⁶/mL. Sperm motility was measured by computer assisted sperm analysis (AndroVision©) in the moments: i) in the raw ejaculate immediately after collection; ii) after extension; iii) after cooling (for stored samples only); iv) immediately prior to freezing; v) post-thawing. Progressive motility was higher in the SLC samples than in the corresponding uncentrifuged for all storage protocols, the best progressive motility was seen in the samples where SLC was done immediately after semen collection (P<0.001). There was no difference in the progressive motility between the two storage temperatures, 5°C and 15°C (P>0.05). More ejaculates showed an acceptable post-thaw motility of ≥30% after SLC processing than uncentrifuged, regardless of storage protocol (P<0.01). It is possible to store stallion semen for 8h at 5°C or 15°C prior to SLC and freezing, and still obtain acceptable post-thaw motility, although there is variation between stallions.

Introduction

Protocols for freezing stallion semen usually include a centrifugation step immediately after semen collection to remove most of the seminal plasma and increase the sperm concentration. The resulting sperm pellet is then re-suspended in a cryoextender and is subsequently cooled and frozen in straws (Loomis and Graham, 2008). Thus access to a centrifuge, freezing equipment, liquid nitrogen and trained personnel are needed in order to perform the procedure satisfactorily. Such equipment may not be available on all stud farms where the stallions are kept, which requires semen transportation to a laboratory with these facilities. During transport, sperm samples should be kept under optimum conditions to prevent damage that will result in reduced ability to withstand cryopreservation. These conditions have yet to be optimized for stallion semen.

It has been shown previously that selecting robust spermatozoa with Single Layer Centrifugation (SLC) through a colloid (Hoogewijs et al., 2011) or through several layers of iodixanol of different densities (Stuhtmann et al., 2012) can improve sperm cryosurvival. It has also been shown that SLC-selected sperm samples retain motility during incubation after thawing for longer than controls (Hoogewijs et al., 2012). Reports vary, however, since Mancill et al. (2010) considered that recovery of robust spermatozoa was greater if density centrifugation with EquiPure® was carried out after thawing rather than prior to freezing.

Preliminary studies with stallion semen indicate that better post-thaw sperm quality is seen if the semen is processed by SLC with Androcoll-E or density centrifugation with iodixanol and frozen shortly after semen collection rather than after 24h storage (Heutelbeck et al, 2015). However, other protocols are possible: the semen sample could be stored at a temperature less likely to cause cold-shock, i.e. at 15°C instead of 4°C, and the duration of storage could be reduced. It has been shown that stored semen can be processed by SLC to select robust spermatozoa (Morrell et al., 2011). Thus the purpose of the present study: i) to determine whether stallion semen can be stored for 8h (at 5° and 15°C) prior to SLC and freezing, while still providing acceptable post-thaw results; ii) to investigate the effect of different storage temperatures on post-thaw sperm motility; iii) to compare the centrifugation effect with and without colloid.

Materials and Methods

Semen collection and treatment

Ejaculates from 16 fertile stallions Criollo breed (n=16; one of each male) aged 6 -14 years old were available for semen collection; these stallions were of previous proven fertility in a natural mating situation. The dewormed and properly vaccinated animals were kept into individual paddocks located in Southern America (Canela, Brazil; Latitude 29° 21' 56" S)

Semen was collected during the non-breeding season (August to September) by allowing the stallion to jump on a phantom and ejaculate into an artificial vagina (Hannover model; Minitube, Porto Alegre, Brazil). Semen had been collected 4 times previously in the week preceding the experiment, and discarded to eliminate the extragonadal sperm reserves. (STICH et al., 2002).

The semen for the study was immediately extended in Gent© extender at concentration of 50×10^6 spz/mL and was split between the different storage treatments as follows: i) uncentrifuged immediate freezing; ii) SLC, immediate freezing; iii) uncentrifuged storage for 8h at 5°C; iv) storage for 8h at 5°C and SLC; v) uncentrifuged storage for 8h at 15°C; and vi) storage for 8h at 15°C and SLC. Sperm pellets were resuspended in EquiPlus© Freeze to a concentration of 200×10^6 /mL for freezing.

Semen processing

Sperm motility and concentration were evaluated by the AndroVision sperm motility analyzer (Minitube, Porto Alegre, Brazil) using the manufacturer's settings for "stallion". The semen was loaded into a Leja chamber which was placed on the warm stage (37°C) of the microscope. Motility assessment was made at five time points: i) in the raw ejaculate immediately after collection, ii) after extension, iii) after cooling (for stored samples only); iv) immediately prior to freezing and v) post-thawing. For the purposes of this experiment only progressive motility is reported.

Single Layer Centrifugation

The method was as described by Morrell et al. (2011) using Androcoll-Equine equilibrated to room temperature. Briefly, 15 mL of the colloid was poured into a 15-mL centrifuge tube and 15 mL of extended semen was pipetted on top, taking care not to disturb the

surface of the colloid. After centrifugation for 20 minutes at 300 g, the supernatant was discarded and the sperm pellet was transferred to a clean tube for resuspension in EquiPlus Freeze® to a concentration of 200×10^6 /mL for freezing. After that 0,5mL straws were filled and kept under 5°C degrees for 20 minutes into a semen refrigerator (Minitube, Porto Alegre, Brazil). In the next step they were exposed to Nitrogen vapor during 20 minutes and immediately dropped into Nitrogen.

Statistics

Differences in progressive motility between treatments were analysed by ANOVA using the SAS system employing the Mixed procedure with stallion as fixed effect. The number of ejaculates with progressive motility $\geq 30\%$ (Loomis, 2008) between control and SLC for each protocol was tested by the chi-squared Goodness of Fit test. In all cases the significance level was set at $P < 0.05$.

Results

The mean progressive motility for the raw and extended semen was $74 \pm 13\%$ and $72 \pm 15\%$ respectively; after cooling mean values ranged between $52 \pm 24\%$ for the 5°C storage and $55 \pm 16\%$ for the 15°C storage, which were not significantly different.

Mean progressive motility pre-freeze and post-thaw for the three storage conditions is shown in Figure 2. SLC improved the progressive motility regardless of storage time and temperature (no storage SLC versus control, $P < 0.001$; storage at 5°C SLC versus control $P < 0.05$; storage at 15°C SLC versus control $P < 0.001$), of the three treatments, no storage i.e. freezing as soon as possible after semen collection, resulted in the best post-thaw motility ($P < 0.001$). Mean post-thaw progressive motility was not different between the samples stored at 5° or 15° for 8h ($P > 0.05$).

The number of sperm samples with a post-thaw progressive motility $\geq 30\%$ for each of the different treatments is shown in Table 1. All sperm samples processed by SLC and frozen immediately produced acceptable post-thaw sperm quality i.e. progressive motility $\geq 30\%$, whereas only 10 of the control samples were acceptable ($P < 0.01$). Similarly, more of the samples processed by SLC after storage at 5°C or 15°C were acceptable than the controls at the same storage temperature (6 and 5 versus 2 and 1, respectively; $P < 0.05$). Overall, SLC gave significantly more ejaculates with acceptable post thaw motility than controls (27 versus 13, respectively; $P < 0.01$). Immediate freezing of the samples produced a significantly higher number

of ejaculates with acceptable post-thaw motility in comparison to total of storage samples (SLC 16 versus 11, controls 10 versus 3; $P < 0.01$). Individual ejaculate profiles are shown in table 2.

Discussion

The objective of this study was to determine whether stallion semen can be frozen successfully after storage for 8h at either 5°C or 15°C. The progressive motility results indicate that at least some stallion ejaculates can be frozen successfully after storage under these conditions if SLC is included in the semen processing prior to freezing. These results partly confirm the findings of Heutelbeck et al. (2015) that immediate freezing is better than storing the samples, but differ in that in the present study some ejaculates gave acceptable results after storage for 8h whereas the samples in Heutelbeck's study did not give acceptable results after storage for 24h. Certainly this too long storage allowed higher metabolic accumulation and it led to membrane damages, mainly caused by ROS and other toxic substances into the culture medium.

Note: a progressive motility $\geq 30\%$ (Loomis, 2008) was taken as being acceptable for the purposes of this study.

The present results are similar to those of Hoogewijs et al. (2011) who were able to increase the number of ejaculates with an acceptable post-thaw motility by including SLC in the processing prior to immediate freezing. In their study, the semen was processed by SLC using Androcoll-E immediately after collection and was subsequently frozen using BotuCrio either immediately or after storing for 24h. However, our results are in contrast to those of Mancill et al (2010), who considered that SLC should be done post-thawing rather than prior to freezing, although their experiments used a different colloid (EquiPure©) for the centrifugation than the Androcoll-Equine© used in the present study. Studies by other researchers did not show a difference in pregnancy rate if SLC with EquiPure© was used to process thawed semen before insemination (Cerny et al, 2012).

Research with bull semen suggests that including a prolonged equilibration period at 4°C prior to cryopreservation is not detrimental to sperm cryosurvival and may even enhance it (Anzara et al., 2011). It is suggested that bull sperm membranes stabilize during cooled equilibration. However, there was no indication that stallion sperm membrane compounds react in the same way, at least in the Gent© extender used for storage in the present study. The results of the present study indicate that there was no difference between storage at 5° and 15°C, but no beneficial effect was seen compared to immediate freezing. However, the fact that storage temperature is not critical within the range 5-15°C could be useful when transporting semen under very warm climatic conditions when it is difficult to maintain the semen at 5°C. Thus, according to the average data obtained in this study, it would be possible to transport semen to a laboratory

at some distance from the stud farm for semen freezing, or to store the samples temporarily while waiting for a less busy time of day to do the processing and freezing.

It has been shown previously that SLC-selected samples retain their motility for longer during storage than unselected samples (e.g. Morrell et al., 2010), and can be stored at room temperature for up to six days (Morrell et al, 2009), although there was considerable variation between stallions as to how long the SLC-selected sperm samples survived at this temperature. Semen extender also affects duration of sperm survival (Morrell et al., 2010). This prolonged survival could be attributed, at least in part, to a significantly lower production of reactive oxygen species in the SLC-selected sperm samples than in controls (Morrell et al., in preparation). Reactive oxygen species produced by damaged cells, particularly hydrogen peroxide, may be implicated in poor post-thaw sperm survival (Baumber et al., 2003) affecting badly the normal cells, although Neild et al. (2005) were unable to link lipid peroxidation of stallion sperm membranes with reactive oxygen species.

These preliminary data of acceptable results following storage and SLC prior to freezing warrant further investigation, including an insemination trial, to see if the increase in post-thaw sperm motility and longevity is reflected in increased pregnancy rates after insemination. It may be possible to optimize the storage conditions by varying the duration of storage or using different semen extenders;

Conclusion

The SLC improves the post-thaw motility in despite of previous storage at 5° or 15°C degrees along 8h, but processing the semen with Androcoll-Equine® immediately after collection gave the best results in terms of post-thaw sperm motility.

Acknowledgements

Sincere thanks to “Cabanha do Parque” horse farm for providing the semen and facilities for this study and to Minitube of Brazil for providing the consumables. JMM is funded by the Swedish Foundation for Equine Research, Stockholm (Project number 14-47-008).

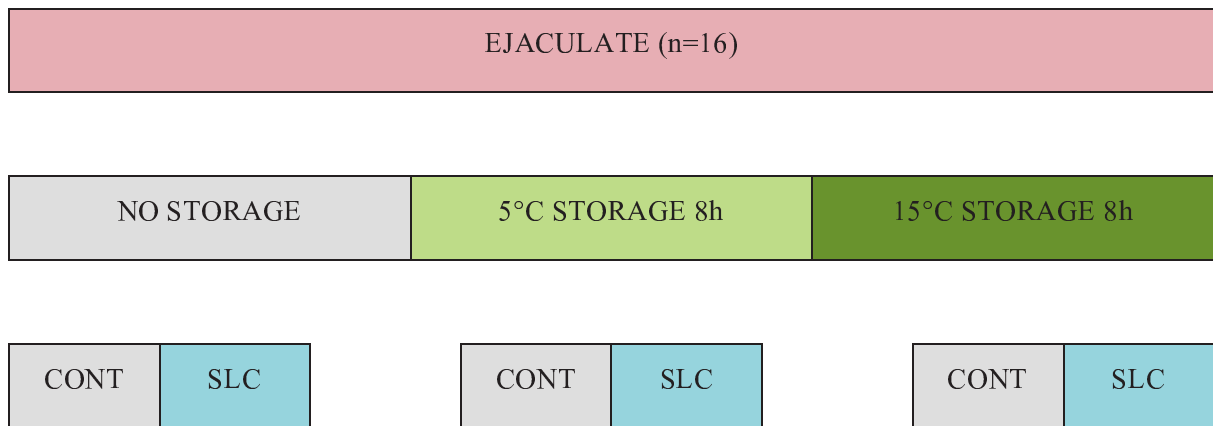
Conflict of Interest Statement

MN is an employee of Minitube of Brazil, which produced Androcoll-Equine. JMM developed both EquiPure© and Androcoll-E and is one of the patent holders for the latter.

References

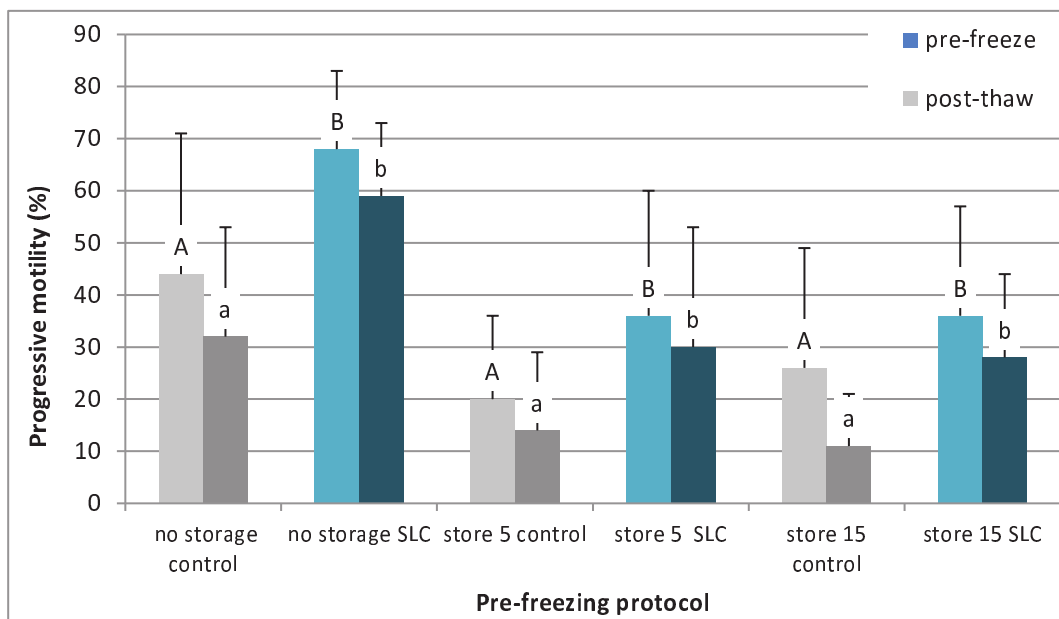
- Anzara, M., Kroetschb, T., Boswalla L. (2011) Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Animal Reproduction Science*. 126, 23–31.
- Cerny, C.L., Hughes, S., Campos, J.R., Coleman, R.J., Troedsson, M.H.T., Squires, E.L. (2012) Fertility of Mares Inseminated With Frozen-Thawed Semen Processed by Single Layer Centrifugation Through a Colloid. *Journal Equine Veterinary Science*. 32, 289-291.
- Heutelbeck, A., Oldenhof, H., Rohn, K., Martinsson, G., Morrell, J.M. and Sieme, H. (2015) Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: perform sperm selection directly after collection or after storage? *Reproduction in Domestic Animals*. 50, 76-83.
- Hoogewijs, M., Morrell, J.M., van Soom, A., Govaere, J., Johannisson, A., Piepers, P., de Schauwer, C., de Kruif, A. and de Vliegheer, S. (2011) Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase post thaw sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal* .43 (Suppl 40) 35-41.
- Hoogewijs, M., Piepers, S., Govaere, J., de Schauwer, C., de Kruif, A. and Morrell, J.M. (2012) Sperm longevity following pre-freeze sperm selection. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32, 489.
- Loomis, P.R., & Graham, JK. (2008) Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105, 119-218.
- Mancill, S.S., Love, C.C., Brinsko, S.P., Edmond, A.J., Foster, M.L., Teague, S.R., Waite, J.A. and Varner, D.D. (2010) Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 1215, 208-209.
- Morrell, J.M., Rodriguez-Martinez, H. and Johannisson, A. (2010) Single Layer Centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size: data from 3 breeding seasons. *Equine Veterinary Journal*. 42, 579-585.
- Morrell, J.M., Macias Garcia, B., Pena, F.J. and Johannisson, A. (2011) Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation. *Theriogenology*. 76, 1424-1432.
- Neild, D.M., Brouwers, J.F.H.M., Coenbrander, B., Agu Ero, A., Gadella, B.M. (2005) Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed spermatozoa- molecular. *Reproduction and Development*. 72, 230-238.
- Stuhtmann, G., Oldenhof, H., Peters, P., Klewitz, J., Martinsson, G., Sieme, H. (2012) Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 133, 184-190.

Figure 1: Experimental design



Experimental design demonstrating the groups (CONT and SLC) and the storage treatment before centrifugation and freezing.

Figure 2: Mean progressive motility for uncentrifuged (CONT; gray bars) and SLC-selected Criollo stallion sperm samples (blue bars) with different processing protocols prior to freezing.



Note 1: Letters A and B demonstrate difference into the same storage protocol between the centrifugation methods in the pre-freeze average data (1 vs 2, $P < 0,01$; 3 vs 4, $P < 0,05$; 5 vs 6, $P < 0,01$)

Note 2: Letters a and b demonstrate difference into the same storage protocol between the centrifugation methods in the post-thaw average data (1 vs 2, $P < 0,001$; 3 vs 4, $P < 0,05$; 5 vs 6, $P < 0,001$)

For all protocols the SLC procedure resulted in higher progressive motility when compared with control in pre-freeze or post-thawed moment of evaluation

Table 1: Number of Criollo breed ejaculates with post-thaw motility $\geq 30\%$ for different storage treatments prior to freezing

NO STORAGE CONT	NO STORAGE SLC	5°C or 15°C CONT	5°C or 15°C storage SLC
10/16 ^a	16/16 ^a	3/32 ^b	11/32 ^b

Note.: Same upper case letters within a treatment denote statistical significance: a P<0.01, b P<0.05.

The SLC demonstrated higher post-thaw progressive motility into no storage protocol and also when storage protocols were combined.

Table 2: Individual Criollo ejaculates profiles

CONTROL Treatments									
	No storage			5°C Storage			15°C Storage		
	Diluted	Centrif	Thawed	After 8h	Centrif	Thawed	After 8h	Centrif	Thawed
1	52,78	41,82	33,72	29,11	8,75	3,33	51,92	19,63	9,22
2	55,88	42,90	32,41	9,21	11,71	4,45	23,80	15,39	8,49
3	70,76	39,54	31,99	40,47	21,42	13,20	47,23	13,00	2,29
4	91,40	90,85	66,66	78,02	39,40	32,12	81,26	61,00	28,40
5	88,90	81,14	65,48	90,68	56,41	49,10	75,18	51,57	19,44
6	67,98	60,48	52,31	39,04	17,51	9,48	38,81	17,71	9,42
7	77,73	49,21	31,25	61,84	3,08	0,0	71,01	10,95	5,21
8	66,41	21,88	14,32	57,22	6,26	2,99	57,27	4,53	0,0
9	74,86	28,20	13,49	46,72	20,45	13,87	44,97	26,57	8,08
10	91,93	80,64	51,23	76,24	41,68	28,64	82,16	64,66	28,47
11	61,42	3,91	0,0	44,32	1,47	0,0	58,66	1,45	0,0
12	87,61	64,46	51,26	70,34	34,28	28,76	76,25	67,52	29,80
13	62,61	13,17	8,21	42,52	7,54	3,24	38,65	18,27	11,12
14	49,14	13,87	8,10	24,07	11,54	7,45	28,48	11,61	4,02
15	87,23	55,81	42,11	88,03	30,06	24,46	54,39	29,06	18,41
16	65,03	10,23	6,36	35,91	2,55	0,27	15,78	4,40	0,0
x	71,98	43,63	31,81	52,11	19,63	13,84	52,86	26,08	11,40
SD	14,20	27,25	21,69	23,65	16,39	14,58	20,66	22,39	10,41

SLC Treatments									
	No storage			5°C Storage			15°C Storage		
	Diluted	Centrif	Thawed	After 8h	Centrif	Thawed	After 8h	Centrif	Thawed
1	52,78	54,81	50,26	43,05	27,45	20,40	48,87	24,49	18,24
2	55,88	68,91	60,21	26,43	25,90	21,26	35,51	25,21	21,41
3	70,76	62,00	56,30	51,90	29,40	22,93	49,81	73,90	41,23
4	91,40	92,04	79,47	80,82	66,85	58,22	84,95	46,13	31,23
5	88,90	82,86	71,59	64,75	70,86	64,24	75,39	53,02	48,10
6	67,98	75,49	63,57	52,22	43,48	34,36	40,91	31,72	22,20
7	77,73	79,76	73,48	53,64	13,50	8,44	62,29	24,46	16,95
8	66,41	64,69	57,30	56,18	17,31	8,08	61,92	24,33	17,48
9	74,86	75,00	64,83	46,67	22,69	17,64	44,15	20,37	16,28
10	91,93	89,04	79,41	79,54	81,94	73,77	78,77	77,45	65,58
11	61,42	48,64	37,28	51,30	4,67	1,23	62,50	15,77	10,97
12	87,61	74,23	66,19	77,98	53,41	44,25	71,42	51,07	38,93
13	62,61	40,71	32,62	28,93	21,94	16,48	40,65	14,38	10,22
14	49,14	54,40	48,30	37,18	24,24	18,91	36,57	24,27	19,79
15	87,23	82,69	68,96	83,42	67,70	61,32	61,12	54,30	48,04
16	65,03	46,82	35,83	25,40	9,41	6,99	25,04	21,76	16,23
x	71,98	68,26	59,10	53,71	36,30	29,91	54,99	36,41	27,68
SD	14,20	15,73	14,87	19,34	24,38	23,19	17,41	20,17	16,07

Percentage of progressive motility of each stallion split according the centrifugation method (SLC or CONT) and moment of evaluation (Diluted, after centrifugation/ resuspension, after 8h of storage 5°C or 15°C and post-thawed samples).