



Cinética e integridade de espermatozoides caprinos criopreservados utilizando Red Cushion® como estratégia de proteção espermática durante a centrifugação do sêmen

Kinetics and integrity of cryopreserved goat sperm using Red Cushion® as a strategy to sperm protection during semen centrifugation

Marcelo Sant'Ana Borges¹, Ana Carolina Silva Teixeira², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua³, Leticia Martins Conti², Joana Larissa Barbosa Born², Fábio Morato Monteiro¹, Kléber Cunha Peixoto Júnior², André Maciel Crespilho²

Instituto de Zootecnia¹, Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil.

Universidade Santo Amaro², UNISA, São Paulo, SP, Brasil.

Universidade Estadual Paulista³, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do gradiente de Iodixanol (Red Cushion®, RC) como método de proteção espermática durante a centrifugação (CE) do sêmen caprino destinado à criopreservação. Foram realizadas colheitas de sêmen de cinco reprodutores caprinos da raça Anglo Nubiana (N= cinco ejaculados/bode). Os ejaculados foram divididos em três grupos experimentais: GC (Controle); G1 (CE utilizado 1ml de RC) e G2 (foi utilizado 0,5mL de RC, misturado ao pellet espermático após a CE). As amostras foram centrifugadas, diluídas, envasadas e criopreservadas. A cinética espermática foi avaliada por sistema computadorizado de análise (CASA) após a descongelação e pós-teste de termoresistência (TTR), e foi avaliada a integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI, %). Não foram observadas diferenças para a motilidade total ($p=0,1849$) avaliada pós-descongelação (GC=45,1%, G1=51,86% e G2=55,28%) ou pós-TTR (GC=10,32%, G1=11,44% e G2=13,16%), bem como para nenhum outro parâmetro cinético avaliado. Também não foram encontradas diferenças para a MPAI (GC=43,70% \pm 16,60; G1=36,68 \pm 17,40; G2=41,72 \pm 14,76; $p=0,2523$). Conclui-se que a utilização de Red Cushion® não promove nenhum benefício à manutenção da cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos a centrifugação previamente ao processo de criopreservação do sêmen.

Palavras-chave: Bodes; Congelamento; Iodixanol; Sêmen, Viabilidade Espermática.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficacy of iodixanol gradient centrifugation (Red Cushion®, RC) as a method of protection of goat semen submitted to centrifugation previously to cryopreservation process. Semen were collected from five Anglo Nubian goats (n = five ejaculates/goat). The ejaculates were divided into three experimental groups: GC (Control; conventional centrifugation); G1 (centrifugation using 1ml RC) and G2 (centrifugation using 0.5 mL RC, mixed to sperm pellet before the cryopreservation). Samples were centrifuged (CE) at 600xg for 10 minutes, diluted, packed and cryopreserved. Sperm kinetics were evaluated using a computer assisted semen analysis (CASA) after thawing and after thermoresistance test (TTR), and the integrity of the plasma and acrosomal membrane was evaluated (MPAI, %). No differences were observed for total motility ($P =0.1849$) assessed after thawing (GC=45.1%, G1=51.86% and G2=55.28%) or post-TTR (GC=10.32%, G1=11.44% and G2=13.16%), as well as for the other kinetic parameters analyzed. Furthermore, no differences for MPAI (CG =43.70% \pm 16.60; G1=36.68 \pm 17.40; G2=41.72 \pm 14.76; $P=0.2523$) were found comparing the different groups. In conclusion, Red Cushion® was not able to improve the kinetics and integrity of the goat semen submitted to the cryopreservation process.

Keywords: Goats; Freezing; Iodixanol; Semen, Sperm Viability.

Introdução

A caprinocultura representa uma importante fonte de renda, principalmente para pequenos e médios produtores rurais. Contudo, a adoção de biotecnologias relacionadas à reprodução ainda é baixa

¹Correspondência: acrespilho@prof.unisa.br

Recebido: 08 de outubro de 2019

Aceito: 29 de novembro de 2019



para essa espécie, havendo emprego ainda restrito de biotécnicas simples como é o caso da inseminação artificial e técnicas de processamento do sêmen caprino (Castelo et al., 2008).

A criopreservação seminal representa uma das biotecnologias mais importantes voltadas à reprodução animal, permitindo a disseminação de material genético de reprodutores melhoradores do ponto de vista zootécnico, garantindo a manutenção do potencial de fertilização de células espermáticas por período indeterminado (Castelo et al., 2008; Leite et al., 2011).

Entretanto, durante todo o processo de criopreservação as células espermáticas são expostas a fatores estressantes, como a redução da temperatura, criopreservação, descongelação, desequilíbrios osmóticos e oxidativos (Lima et al., 2010). Todos esses fatores contribuem para a redução na viabilidade e fertilidade dos espermatozoides submetidos ao processamento (Bezerra, 2010).

O plasma seminal (PS) de bodes possui, dentre suas particularidades, a presença de fosfolípases que são secretadas pelas glândulas bulbouretrais. Essas enzimas são capazes de reagir com lipídeos presentes na gema de ovo e leite, que são componentes essenciais para muitos diluidores de criopreservação disponíveis comercialmente. Através da catálise de processos hidrolíticos essas enzimas convertem os ácidos graxos e isolecitinas presentes nos meios diluidores, gerando substâncias extremamente tóxicas aos espermatozoides (Bezerra, 2010; Jiménez-Rabadán et al., 2012; Santiago-Moreno et al., 2017).

Por essa razão, a maioria dos protocolos de criopreservação do sêmen caprino preconiza a remoção do PS como estratégia para prevenção de possíveis interações deletérias com os constituintes dos meios diluidores (Purdy, 2006; Bezerra, 2010). Dentre as diferentes técnicas de remoção, a centrifugação (CE) tem se destacado como a mais eficaz para separação do PS, garantindo aumento da viabilidade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação (Ritar e Salamon, 1982; Jiménez-Rabadán et al., 2012).

Contudo, além da demanda de tempo para a execução, a CE pode proporcionar perdas de espermatozoides, assim como danos físicos à estrutura das células espermáticas (Purdy, 2006; Campanholi et al., 2017). Para minimizar o efeito mecânico da CE sobre a integridade espermática pode-se utilizar colóides de alta densidade, que possuem a capacidade de conferir amortecimento do impacto durante a centrifugação.

Nesse contexto, o iodixanol representa um coloide utilizado como agente de contraste em exames radiográficos. Entretanto, devido a suas características não iônicas a substância tem se mostrado um agente capaz de promover a proteção de espermatozoides submetidos a centrifugação. O iodixanol já foi testado para o processamento de sêmen de bovinos (Gloria et al., 2016), bubalinos (Swami et al., 2017), equinos (Stuhtmann et al., 2012), ovinos (Cirit et al., 2013) e suínos (Matás et al., 2007), sendo observado resultados favoráveis na proteção das células espermáticas submetidas ao processo de CE.

Como ainda são escassos os trabalhos voltados à avaliação da eficiência e inocuidade do gradiente de iodixanol para a proteção de espermatozoides caprinos, objetivou-se testar o uso do Red Cushion® (RC) para o processamento pré-criopreservação do sêmen de bodes.

Material e Métodos

Animais

Foram selecionados 5 bodes (*Capra hircus*), raça Anglo Nubiana, com idade entre 36 a 48 meses pertencentes à Mini Fazenda da Universidade Santo Amaro, São Paulo/SP. Como critérios para inclusão no experimento foi considerado o histórico clínico e reprodutivo dos animais, além do exame andrológico, segundo CBRA (2013). Nesse sentido, apenas os bodes que apresentaram perímetro escrotal mínimo de 30 cm, motilidade total do sêmen fresco superior a 50%, concentração espermática $\geq 1 \times 10^9$ células por ejaculado, defeitos espermáticos maiores $< 20\%$ e defeitos totais $< 30\%$ foram inclusos na pesquisa. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Santo Amaro (CEUA-UNISA, protocolo N.24/2017), de acordo com Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os animais passaram por um período de adaptação e nivelamento biológico no qual os ejaculados foram colhidos duas vezes por semana durante 30 dias pelo método de vagina artificial. Para execução das avaliações laboratoriais previstas no experimento foram colhidos cinco ejaculados de cada animal, totalizando 25 amostras espermáticas.

Processamento do Sêmen

Após a colheita e avaliação inicial de qualidade, cada ejaculado recebeu tampão fosfato salino



(PBS) aquecido a 37°C de forma a fixar o volume final em 3 mL. Após a expansão do volume os ejaculados foram fracionados em três alíquotas iguais (1 mL cada) para compor três grupos experimentais: GC (controle centrifugado), G1 (Iodixanol Red Cushion® utilizado apenas para centrifugação do sêmen) e G2 (Iodixanol Red Cushion® utilizado para centrifugação e misturado ao pellet espermático após a CE).

Em todos os grupos foi acrescido PBS de forma a completar o volume final de 5 mililitros. Após a diluição, o conteúdo do G1 foi transferido cuidadosamente (sem que houvesse a mistura) para frasco cônico de 15 mL contendo 1 mL de solução comercial de iodixanol (Red Cushion®, Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), enquanto o conteúdo do G2 foi transferido sobre coluna líquida de 0,5 mL da mesma solução.

As amostras dos três grupos experimentais foram submetidas à centrifugação (CE; centrífuga Fanem Baby II®, Guarulhos, Brasil) a 600xg por 10 minutos. Após a CE foi descartado o sobrenadante para recuperação do pellet espermático do GC e G1. Já no G2, após o descarte do sobrenadante, foi realizada a mistura integral do pellet espermático à solução de iodixanol. Após a recuperação dos espermatozoides pós-centrifugação foi acrescido diluidor Botu-Bov® contendo 6,4% de glicerol (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) em todos os grupos experimentais de forma a fixar a concentração espermática final em 80×10^6 células/mL.

Todas as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, France) e refrigeradas em caixa isotérmica modelo Botutainer® sob temperatura constante de 5°C por quatro horas. Decorrido o tempo de refrigeração as palhetas foram colocadas no interior de uma caixa de isopor de 42L contendo 3 cm de coluna líquida de nitrogênio (N₂). A grade de congelação foi mantida por 20 minutos a uma distância de 5 cm da superfície do N₂ e em seguida as palhetas foram criopreservadas por imersão direta no nitrogênio líquido.

Análise do Sêmen

A cinética espermática dos três grupos experimentais foi analisada imediatamente após a descongelação (T₀) e 30 minutos após a incubação em banho-Maria a 46°C/30 minutos (teste de termorresistência). Já a integridade de membrana plasmática e acrossomal foi avaliada no T₀ empregando a técnica de citometria de fluxo.

Análise Computadorizada do Movimento Espermático - método CASA

As amostras de cada grupo experimental foram descongeladas a 36°C/30 segundos e submetidas à avaliação computadorizada do movimento espermático (ISAS® V.1.2, Valencia, Espanha). Foram avaliados os parâmetros motilidade espermática total (MT, %) e progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), retilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) e curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); linearidade (LIN, $\mu\text{m/s}$) e retilinearidade (STR, $\mu\text{m/s}$); porcentagem de espermatozoides exibindo movimento rápido (RAP, %); e o índice de oscilação (WOB, %). Para cada amostra foram observados 5 campos aleatórios em câmara de análise modelo Sperm Tracker® (Valencia, Espanha), avaliando-se um número mínimo de 200 células por campo.

Teste de Termorresistência Rápido (TTR)

As amostras descongeladas foram incubadas em banho-maria sob temperatura de 46°C por 30 minutos. Após o período de incubação foram analisadas pelo método CASA, segundo metodologia exemplificada no tópico anterior, sendo considerados os parâmetros motilidade total (MT-TTR) e progressiva (MP-TTR) após TTR.

Avaliação de Citometria de Fluxo

Para as análises foi utilizado equipamento BD LSR® Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com três fontes de excitação a laser (violeta: 405 nm 50 mw; azul: 488 nm 50 mw; vermelho: 640 nm 40 mw).

Para essa avaliação foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo (PI; P4170, Sigma Aldrich, USA), FITC-PSA (L0770, Sigma Aldrich, USA) e Hoechst 33342 (14533, Sigma Aldrich, USA), segundo Freitas-Dell'Aqua et al., (2012). Amostras de 200 μL de sêmen dos três grupos experimentais foram inicialmente diluídas em TALP-PVA de forma a atender a concentração de 5×10^6 /mL. Após a diluição foram adicionados 5 μL de Hoechst (100 $\mu\text{g/mL}$), 5 μL de PI (50 $\mu\text{g/mL}$) e 1 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 5 minutos ao abrigo da luz.



Após a incubação as amostras foram analisadas segundo método e equipamento descritos anteriormente, permitindo a identificação de quatro subpopulações espermáticas: células portadoras de membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra; membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada; membrana plasmática e acrossomal lesadas; membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI, %). Para as avaliações estatísticas foi considerado apenas o percentual de MPAI, de acordo com cada grupo experimental.

Análise Estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os dados gerados foram avaliados através de modelo linear geral de análise de variância (PROC GLM®, SAS Institute, Cary, USA), considerando-se o efeito dos diferentes tratamentos sobre a cinética e integridade espermática. Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$.

Resultados

Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos para nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados após a descongelamento ou para a motilidade total e progressiva analisados após TTR (Tab.1). Também não foram encontradas diferenças para a integridade de membrana plasmática e acrossomal ($GC=43,70\% \pm 16,60$; $G1=36,68 \pm 17,40$; $G2=41,72 \pm 14,76$; $P=0,2523$).

Tabela 1. Médias (\pm SD) da cinética espermática avaliada após descongelamento, pós-teste de termorresistência rápido (TTR 46°C/30 minutos) e avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal, onde GC: Grupo controle (centrifugação convencional); G1: Grupo 1 (utilização de 1,0 mL de Red Cushion® para centrifugação); G2: Grupo 2 (0,5 mL de Red Cushion® utilizado para centrifugação e misturado ao pellet de sêmen após a centrifugação).

Variável	Grupo Controle	G1	G2	P
MT (%)	45,1 \pm 21,41	51,86 \pm 19,59	55,28 \pm 19,11	0,1849
MP (%)	25,2 \pm 13,88	28,54 \pm 10,93	28,94 \pm 10,16	0,6204
VCL (μ m/s)	79,85 \pm 13,7	81,43 \pm 10,42	81,79 \pm 9,65	0,1459
VSL (μ m/s)	48,88 \pm 12,96	49,88 \pm 8,98	47,58 \pm 8,21	0,6546
VAP (μ m/s)	64,12 \pm 14,38	65,38 \pm 9,36	64,28 \pm 8,35	0,3608
LIN (%)	60,7 \pm 8,97	61,38 \pm 8,15	58,41 \pm 8,78	0,5696
STR (%)	75,72 \pm 5,58	76,14 \pm 5,84	73,86 \pm 6,17	0,3655
WOB (%)	79,78 \pm 6,64	80,31 \pm 4,77	78,67 \pm 5,5	0,7696
RAP (%)	33,2 \pm 20,31	38,28 \pm 17,75	40,65 \pm 17,32	0,3565
MT-TTR (%)	10,32 \pm 10,45	11,44 \pm 16,09	13,16 \pm 14,31	0,6000
MP-TTR (%)	4,36 \pm 5,69	5,2 \pm 9,06	5,92 \pm 8,87	0,6780
MPAI (%)	43,7 \pm 16,60	36,68 \pm 17,40	41,72 \pm 14,76	0,2523

MT, motilidade espermática total; MP, motilidade progressiva; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade retilínea; VAP, velocidade de trajeto; LIN, linearidade; STR, retilinearidade; WOB, índice de oscilação; RAP, espermatozoides rápidos; MT-TTR, motilidade total pós teste de termorresistência rápido; MP-TTR, motilidade progressiva pós teste de termorresistência rápido; MPAI, membrana plasmática e acrossomal íntegras.

Discussão

Frente as particularidades inerentes ao sêmen caprino muitos protocolos voltados à criopreservação dos espermatozoides dessa espécie preconizam a retirada do plasma seminal pela centrifugação, inibindo possíveis reações adversas entre o PS e os componentes dos diluidores de criopreservação (Purdy, 2006; Cseh et al., 2012; Maia, 2015).

Entretanto, estudos anteriores envolvendo as espécies equina (Hoogewijset et al., 2010), bovina (Gloria et al., 2016; Campanholi et al., 2017) e caprina (Azerêdo et al., 2001) demonstraram que o processo convencional de centrifugação pode ser prejudicial, pois as forças mecânicas empregadas sob as células espermáticas diminuem a motilidade, danificam a membrana e podem causar a morte celular. Por essa razão, o uso de substâncias capazes de amortecer o impacto físico e mecânico imposto aos espermatozoides durante a centrifugação (“cushions”) possuem grande potencial para implementação nos



trabalhos de andrologia animal, promovendo a proteção celular durante o processamento (Bliss et al., 2012).

Embora diversos estudos tenham apontado resultados positivos com a utilização de iodixanol para centrifugação do sêmen de diferentes espécies domésticas (Stuhtmann et al., 2012; Cirit et al., 2013; Gloria et al., 2016; Swami et al., 2017), nossos resultados demonstraram que a substância não foi capaz de trazer benefícios adicionais à cinética e longevidade do sêmen caprino criopreservado.

Da mesma forma, não foram observadas diferenças para a integridade de membrana plasmática e acrossomal dos diferentes grupos estudados. Tais resultados se assemelham aos reportados por Saragusty et al. (2009) que não observaram efeitos significativos da incorporação do iodixanol sobre a integridade e motilidade do sêmen bovino pós-descongelamento.

Da mesma forma, Santiago-Moreno et al. (2017) não observaram diferenças para a cinética e integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozóides caprinos centrifugados na presença ou ausência de “cushion”, demonstrando que os adjuvantes de CE não foram capazes de promover maior viabilidade espermática pós-criopreservação.

A integridade de membrana plasmática e acrossomal representa componente fundamental para o processo de fertilização espermática (Silva e Gadella, 2006), refletindo a viabilidade dos espermatozoides submetidos à criopreservação, que sofrem inúmeras injúrias físicas e estruturais, diminuição na fluidez e permeabilidade, edema e mudanças na atividade enzimática em função do processamento (Tartaglione e Ritta, 2004). Dessa forma, na hipótese inicial do nosso trabalho foi postulado que a CE poderia resultar em danos estruturais às células espermáticas caprinas, justificando a utilização do iodixanol para promoção de maior motilidade e integridade espermática, resultados não confirmados em nosso estudo.

Uma das possíveis explicações para os resultados encontrados apoia-se na própria constituição bioquímica da membrana plasmática dos espermatozóides caprinos, que é composta por grande quantidade de lipídeos que em junção com moléculas de colesterol determinam uma elevada estabilidade estrutural (Mocé et al., 2010). Dessa forma, com uma membrana plasmática fisiologicamente mais resistentes, mesmo quando não utilizado o iodixanol (grupo controle) não foram observados danos expressivos aos espermatozóides que pudessem comprometer os padrões cinéticos e estruturais das células. Conclusões semelhantes também foram relatadas por Crespilho et al. (2018) que observaram que mesmo quando empregadas altas forças de centrifugação (acima do preconizado para remoção do plasma seminal de bodes) não foram observados efeitos deletérios sobre a integridade estrutural (membrana plasmática e acrossomal) ou no DNA de espermatozóides caprinos submetidos à criopreservação, resistência associada à grande estabilidade estrutural da célula espermática da espécie.

No segundo grupo experimental (G2) foram incorporados 0,5 mL de iodixanol (volume equivalente ao de um pellet espermático médio formado durante a centrifugação de amostras de sêmen caprino) às células recuperadas pós-CE com objetivo de se avaliar uma possível toxicidade da substância, efeito deletério não comprovado em nosso estudo, segundo metodologia proposta.

Estudos anteriores demonstraram que o iodixanol representa uma substância não iônica, isosmótica, hidrossolúvel e que não possui toxicidade quando adicionado diretamente ao diluidor para o processamento do sêmen de diferentes espécies, como bovinos (Saragusty et al., 2009; Chuawongboon et al., 2017) e equinos (Beehan, 2012). Da mesma forma, baseado nos resultados de cinética e integridade estrutural, pode-se concluir que o Iodixanol na forma do produto comercial Red Cushion® não apresenta toxicidade ao sêmen caprino quando incorporado no volume de 0,5 ml.

Conclusões

Conclui-se que a centrifugação em gradiente de iodixanol não proporciona nenhum benefício adicional à cinética e integridade estrutural de células espermáticas caprinas. Da mesma forma, como adjuvante adicionado diretamente aos espermatozoides a substância também não foi capaz de proporcionar aumento no percentual de células íntegras e móveis pós-descongelamento.

Referências

- Azerêdo GA, Esper CR, Resende KT.** Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rum Res*, v.41, p.257-263, 2001.
- Beehan DP.** The effects of iodixanol present during equine semen cryopreservation. 2012. 68f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Department of Veterinary Clinical Sciences, Baton Rouge, 2012.



- Bezerra FSB.** Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Vet Bras*, v.4, p.S20-S25, 2010.
- Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD.** The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1232-1239, 2012.
- Campanholi SP, Monteiro FM, Dias EAR, Mercadante MEZ, Paz CCP de, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO, Dell'Aqua C de PF, Vantini R, Garcia JM.** Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*, v.89, p.114-121, 2017.
- Castelo DST, Frota TR, Silva AR.** Considerações sobre a criopreservação do semen de caprinos. *Acta b Vet Bras*, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CBRA.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2.ed. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; Belo Horizonte, 1998. 2013.
- Chuwongboon P, Sirisathien S, Pongpeng J, Sakhong D, Nagai T, Vongpralub T.** Effects of supplementation of iodixanol to semen extender on quality and fertilization ability of frozen-thawed Thai native bull sperm. *Anim Sci J*, v.88, n.9, p.1311-1320, 2017.
- Cirit Ü, Bağış H, Demir K, Agca C, Pabuccuoğlu S, Varişli Ö, Clifford-Rathert C, Agca Y.** Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.139, n.1-4, p.38-44, 2013.
- Crespilho AM, Bosco KÁ, Dell'Aqua C de PF, Segabinazzi LG, Papa FO, Brás KMG, Gomes GM, Peixoto Junior K da C.** Can centrifugation force compromise the plasmatic membrane, acrosome and DNA integrity of goat spermatozoa?. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.55, n.3, p.1-11, 2018.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS.** Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, v.130, n.3-4, p.187-192, 2012.
- Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Dell'aqua Junior JA, Papa FO.** Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 4., 2012, Campinas. *Anais...* Campinas: Anim Prod, p.941, 2012. Resumo.
- Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befacchia G, Contri A.** Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *J Anim Sci Biotech*, v.7, n.1, p.1-9, 2016.
- Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Thys M, Hoflack G, Van Soom A, De Kruif A.** Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology*, v.74, p.118-126, 2010.
- Jiménez-Rabadán P, Morrell JM, Johannisson A, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Alvaro-García PJ, Pérez-Guzmán MD, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ.** Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. *Anim Reprod Sci*, v.136, n.1-2, p.47-54, 2012.
- Leite PA, Schreder GG, Almeida CLR de, Zúccari CESN, Silva EVC.** Criopreservação do sêmen bovino. *UNOPAR Cient, Cienc Biol Saúde*, v.13, n.4, p.279-286, 2011.
- Lima LF de, Moura P, Passos PIB, Leal DR, Rumpf R, Neves JP.** Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. *Ci Anim Bra*, v.11, n.4, p.835-844, 2010.
- Maia MS.** Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. In: Congresso Pernambucano De Medicina Veterinária., 6.; Seminário Nordeste de Caprino-Ovinocultura, 7., 2015, Recife. *Anais...* Recife: CRMV-PE, SPEMVE, 2015.
- Matás C, Decuadro G, Martínez-Miró S, Gadea J.** Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*, v.67, n.5, p.1087-1091, 2007.
- Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK.** Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim*, v.45, n.s2, p.57-66, 2010.
- Purdy PH.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res*, v.63, n.3, p.215-225, 2006.
- Ritar AJ, Salamon S.** Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the angora goat. *Aust J Biol Sci*, v.35, n.3, p.305-312, 1982.
- Santiago-Moreno J, Esteso MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Delgado JA, López-Sebastián A.** Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Anim Reprod Sci*, v.181, p.141-150, 2017.
- Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A.** Protective effects of iodixanol during bovine sperm



cryopreservation. *Theriogenology*, v.71, n.9, p.1425–1432, 2009.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

Stuhtmann G, Oldenhof H, Peters P, Klewitz J, Martinsson G, Sieme H. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.133, n.3-4, p.184-190, 2012.

Swami DS, Kumar P, Malik RK, Saini M, Kumar D, Jan MH. The cryoprotective effect of iodixanol in buffalo semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.179, p.20-26, 2017.

Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.62, n.7, p.1245-1252, 2004.
