

Adição de diferentes concentrações de mio-inositol sobre a criopreservação espermática em garanhões

Livia Maria da Silva Paiva¹, Thainara Rodrigues de Oliveira^{2,1}, Thaís de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Gabriela Marques de Rezende², Ana Laura Pasqualinotto², Maria Fernanda Lema Carneiro¹, Henricco Zapparoli¹, André Furugen Cesar de Andrade², Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade de São Paulo
E-mail: livia.paiva@sou.unifeob.edu.br

A criopreservação do sêmen equino provoca danos às células espermáticas, por isso, a escolha do diluente é crucial para proteger os espermatozoides durante os processos de refrigeração, congelação e descongelação. Neste sentido, o mio-inositol tem sido estudado como um componente do diluente com efeitos benéficos sobre o metabolismo e morfologia espermática. Esse efeito benéfico do mio-inositol pode estar relacionado a sua ação como fonte energética e capacidade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de mio-inositol a um diluente comercial sobre a criopreservação de espermatozoides equinos. Para isso, foram utilizados três ejaculados de quatro garanhões. Após a colheita, o sêmen foi diluído (1:2) em meio à base de leite desnatado (Botu-sêmen®, Botupharma) e centrifugado, em seguida o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão com diluidor de criopreservação comercial (Botu-Crio®, Botupharma). Cada ejaculado foi dividido em quatro tratamentos: 1. controle (CON): somente diluidor de criopreservação (n=12); 2. diluidor de criopreservação adicionado de 15 mM (MIO15, n=12); 3. diluidor adicionado de 30 mM (MIO30, n=12) e 4. diluidor adicionado de 45 mM (MIO45, n=12) de mio-inositol. As concentrações de mio-inositol foram baseadas em literatura prévia. Após as diluições, o sêmen foi envasado em palhetas e criopreservado utilizando um sistema automático (TK3000). Ao final, as palhetas foram armazenadas em botijões criogênicos. Duas palhetas de cada partida, garanhão e tratamento foram descongeladas, homogeneizadas e avaliadas quanto às características de motilidade utilizando o sistema computadorizado de análise espermática (SCA – Sperm Class Analyser; CASA), considerando: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade do trajeto (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), deslocamento lateral da cabeça (ALH), índice de oscilação (WOB) e frequência de batimento (BCF). Foram avaliadas integridade das membranas plasmática e acrossomal (iodeto de propídeo - PI, Hoechst 33342 - H342 e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína - FITC-PSA), potencial de membrana mitocondrial (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenimidazolilcarbocianina - JC-1, H342 e PI) e estresse oxidativo (Dihidroetídio - DHE, H342, e YO-PRO-1 - YP), pelo uso de sondas fluorescentes em sistema de citometria de fluxo. Também foi avaliada a morfologia espermática. Os dados obtidos foram avaliados pelo software JASP (versão 0.19) por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ indicativo de diferença significativa. A MT foi similar ($P = 0,836$) entre os tratamentos CON ($49,64 \pm 3,95\%$), MIO15 ($48,21 \pm 3,10\%$), MIO30 ($46,43 \pm 3,80\%$) e MIO45 ($45,36 \pm 3,20\%$). Também não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para as outras características da motilidade espermática (MP, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, WOB e BCF). A integridade da membrana plasmática foi similar ($P = 0,945$) entre os tratamentos (CON = $31,02 \pm 2,0\%$; MIO15 = $29,64 \pm 2,50\%$; MIO30 = $31,44 \pm 6,00\%$; e MIO45 = $28,52 \pm 3,10\%$), assim como a integridade acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, estresse oxidativo e os defeitos morfológicos ($P > 0,05$). Conclui-se que a adição de mio-inositol ao diluente comercial de criopreservação, nas concentrações testadas e sob as condições experimentais descritas, não trouxe benefícios adicionais, também nenhum efeito deletério tenha sido notado sobre a qualidade espermática pós-criopreservação.

Palavras-chave: Equino, membranas espermáticas, motilidade, estresse oxidativo.

Autorizações legais: CEUA: 6864130624

Agradecimentos e financiadores: FAPESP (processo n. 2024/18977-5).

Addition of different concentrations of myo-inositol to sperm cryopreservation in stallions

Livia Maria da Silva Paiva¹, Thainara Rodrigues de Oliveira^{2,1}, Thaís de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Gabriela Marques de Rezende², Ana Laura Pasqualinotto², Maria Fernanda Lema Carneiro¹, Henricco Zapparoli¹, André Furugen Cesar de Andrade², Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ²Universidade de São Paulo
E-mail: livia.paiva@sou.unifeob.edu.br

The cryopreservation of equine semen causes damage to sperm cells; therefore, the choice of extender is crucial to protect spermatozoa during the process of cooling, freezing, and thawing processes. In this context, myo-inositol has been studied as a component of extenders with beneficial effects on sperm metabolism and morphology. This beneficial effect of myo-inositol may be related to its role as an energy source and its antioxidant capacity. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementing different concentrations of myo-inositol to a commercial extender on the cryopreservation of equine spermatozoa. For this purpose, three ejaculates from four stallions were used. After collection, the semen was diluted (1:2) in a skim milk-based medium (Botu-sêmen®, Botupharma) and centrifuged; subsequently, the supernatant was discarded and the pellet resuspended with a commercial cryopreservation extender (Botu-Crio®, Botupharma). Each ejaculate was divided into four treatments: 1. control (CON, n=12): cryopreservation extender only; 2. cryopreservation extender supplemented with 15 mM (MIO15, n=12); 3. extender supplemented with 30 mM (MIO30, n=12); and 4. extender supplemented with 45 mM (MIO45, n=12) of myo-inositol. The concentrations of myo-inositol were based on previous literature. After dilution, the semen was packaged into straws and cryopreserved using an automated system (TK3000). At the end, the straws were stored in cryogenic containers. Two straws from each batch, stallion, and treatment were thawed, homogenized, and evaluated for motility characteristics using a computer-assisted sperm analysis system (SCA – Sperm Class Analyser; CASA), considering: total motility (TM), progressive motility (PM), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), wobble (WOB), and beat-cross frequency (BCF). Plasma and acrosomal membrane integrity (propidium iodide - PI, Hoechst 33342 - H342, and Pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate - FITC-PSA), mitochondrial membrane potential (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide - JC-1, H342, and PI), and oxidative stress (dihydroethidium – DHE, H342, and YO-PRO-1 - YP) were also evaluated using fluorescent probes in a flow cytometry system. Sperm morphology was also assessed. The data obtained were analyzed using JASP software (version 0.19) by ANOVA, and means were compared using Tukey's test, with $p \leq 0.05$ indicating significant difference. TM was similar ($P = 0.836$) among treatments CON ($49.64 \pm 3.95\%$), MIO15 ($48.21 \pm 3.10\%$), MIO30 ($46.43 \pm 3.80\%$), and MIO45 ($45.36 \pm 3.20\%$). No differences ($P > 0.05$) were observed among treatments for other sperm motility parameters (PM, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, WOB, and BCF). Plasma membrane integrity was similar ($P = 0.945$) among treatments (CON = $31.02 \pm 2.0\%$; MIO15 = $29.64 \pm 2.50\%$; MIO30 = $31.44 \pm 6.00\%$; and MIO45 = $28.52 \pm 3.10\%$), as were acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, oxidative stress, and morphological defects ($P > 0.05$). It is concluded that the addition of myo-inositol to the commercial cryopreservation extender, at the tested concentrations and under the described experimental conditions, did not provide additional benefits, and no deleterious effect on post-thaw sperm quality was observed.

Keywords: Equine, sperm membranes, motility, oxidative stress.

Legal authorizations: CEUA: 6864130624

Acknowledgments and funders: FAPESP (process n. 2024/18977-5).

Comportamento sexual de garanhões jovens: capacidade de aprendizagem à colheita de sêmen em manequim mecânico e sua relação com a qualidade espermática

Gabriela Marques de Rezende¹, Rubens Paes de Arruda¹, Gustavo Pagnan Pusch¹, Jheovana Spegiorin Pinheiro Da Silva¹, Luisa Fernanda Duque Gutierrez¹, Giovana Ferraz de Souza¹, Luma Maria Rovina de Brito¹, Livia Maria da Silva Paiva¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: rezendegabimarques@hotmail.com

A puberdade em machos equinos é caracterizada pelo início da expressão do comportamento sexual, associado ao processo de maturação do eixo hipotálamo-hipófise-testicular. Devido a sua complexidade, são escassos os estudos que descrevam de forma sistemática o desenvolvimento do comportamento reprodutivo de garanhões jovens e sua capacidade de condicionamento à colheita de sêmen em manequim mecânico. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre a capacidade de aprendizado de garanhões durante o condicionamento ao salto em manequim mecânico e as características seminais. Foram utilizados oito garanhões, sendo sete da raça Brasileiro de Hipismo e um sem raça definida, com idade média de 30 meses, exceto um animal com 42 meses. O protocolo de condicionamento à colheita do sêmen em manequim mecânico foi conduzido de forma progressiva, respeitando a individualidade de cada animal. Para isso, foi realizada adaptação ao ambiente de colheita, aprendizado por observação de garanhão experiente (três repetições consecutivas), condicionamento à monta em manequim mecânico (sem e com a presença de égua quando necessário). Foi considerado treinado o garanhão após realizar monta completa no manequim mecânico com ejaculação em quatro ocasiões consecutivas. Durante todo o condicionamento, foram conduzidas avaliações comportamentais por meio de etograma individual, contemplando as fases da cópula (reação, ereção, monta, introdução, ejaculação e finalização), sendo todas essas cronometradas, além de mensuradas as respostas ao ambiente e ao manejo. Com base nos parâmetros observados, foi elaborado um escore comportamental composto, considerando número de tentativas sem sucesso, progressão entre etapas e necessidade de intervenções com a égua, com penalização por tentativas falhas. O escore iniciava-se com 100 pontos, que eram perdidos a cada insucesso. O escore médio dos 8 garanhões foi 67. A partir da média dos escores, os animais foram classificados em dois grupos: animais que apresentaram maior dificuldade de aprendizado (DA, n = 4, escore ≤ 67) e animais que apresentaram mais facilidade no aprendizado (FA, n = 4, escore > 67). O sêmen obtido nos quatro primeiros ejaculados bem sucedidos foram avaliados quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Os dados foram avaliados por ANOVA, sendo as médias dos grupos (FA e DA) comparadas pelo teste t de Student, utilizando o software Jasp®. O grupo FA apresentou significativamente maior (p = 0,009) escore comportamental (82,25 ± 5,95) do que o grupo DA (51,00 ± 5,58). Em relação aos parâmetros seminais, os animais do grupo DA apresentaram maior (p = 0,004) volume ejaculado (44,63 ± 2,95 mL) em comparação aos do grupo FA (23,69 ± 3,58 mL). Por outro lado, não foram observadas diferenças (p > 0,05) entre os grupos para concentração espermática (DA: 238,9 ± 98,4 × 10⁶ spz/mL; FA: 359,8 ± 165,8 × 10⁶ spz/mL), motilidade (DA: 66,25 ± 1,35%; FA: 67,50 ± 1,77%), vigor (DA: 2,91 ± 0,14; FA: 2,94 ± 0,06) e defeitos morfológicos (DA: 48,81 ± % 8,21; FA: 41,97 ± 6,11%). Os resultados evidenciam que o desempenho comportamental durante o condicionamento está mais associado ao volume do ejaculado do que a características de qualidade espermática, o que pode estar relacionado ao maior tempo de tentativa de monta do grupo DA durante o condicionamento, com o prolongamento do estímulo sexual favorecendo maior secreção de plasma seminal pelas glândulas sexuais acessórias por maior tempo de exposição ao ambiente de colheita até a ejaculação. A variabilidade observada no processo de condicionamento demonstra que garanhões jovens apresentam diferentes padrões de resposta ao treinamento, o que deve ser considerado na interpretação integrada entre comportamento e parâmetros seminais, reforçando a importância da identificação precoce de perfis de aprendizado e da adoção de estratégias de manejo individualizadas.

Palavras-chave: Equinos, respostas comportamentais, Manequim mecânico, Colheita de sêmen

Autorizações legais: CEUA nº 4158210725

Agradecimentos e financiadores: CAPES

Sexual behavior of young stallions: learning ability for semen collection using a phantom and its relationship with sperm quality

Gabriela Marques de Rezende¹, Rubens Paes de Arruda¹, Gustavo Pagnan Pusch¹, Jheovana Spegiarin Pinheiro Da Silva¹, Luisa Fernanda Duque Gutierrez¹, Giovana Ferraz de Souza¹, Luma Maria Rovina de Brito¹, Lívia Maria da Silva Paiva¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
E-mail: rezendegabimarques@hotmail.com

Puberty in male horses is characterized by the onset of sexual behavior, associated with the maturation of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. Due to its complexity, there are still few studies that systematically describe the development of reproductive behavior in young stallions and their ability to be conditioned for semen collection using a mechanical phantom. In this context, the present study aimed to evaluate the association between the learning ability of stallions during conditioning to mount a mechanical phantom and their seminal characteristics. Eight stallions were used, seven of the Brasileiro de Hipismo breed and one crossbred, with a mean age of 30 months, except for one animal aged 42 months. The conditioning protocol for semen collection using a mechanical phantom was conducted progressively, respecting the individuality of each animal. This included adaptation to the collection environment, observational learning from an experienced stallion (three consecutive sessions), and conditioning to mount the mechanical phantom (without and, when necessary, with the presence of a mare). Stallions were considered trained after performing a complete mount on the mechanical phantom with ejaculation on four consecutive occasions. Throughout the conditioning period, behavioral evaluations were performed using an individual ethogram, covering the phases of copulation (reaction, erection, mounting, intromission, ejaculation, and dismount), all of which were timed, in addition to responses to the environment and handling. Based on these parameters, a composite behavioral score was established, considering the number of unsuccessful attempts, progression between stages, and the need for mare intervention, with penalties applied for failed attempts. The score started at 100 points and decreased with each failure. The mean score of the eight stallions was 67. Based on the mean score, animals were classified into two groups: those with greater difficulty in learning (DL, n = 4, score ≤ 67) and those with greater ease of learning (EL, n = 4, score > 67). Semen obtained from the first four successful ejaculates was evaluated for volume, concentration, motility, vigor, and sperm morphology. Data were analyzed by ANOVA, and group means (EL and DL) were compared using Student's t-test in JASP® software. The EL group showed a significantly higher (p = 0.009) behavioral score (82.25 ± 5.95) compared to the DL group (51.00 ± 5.58). Regarding seminal parameters, the DL group showed a higher (p = 0.004) ejaculate volume (44.63 ± 2.95 mL) compared to the EL group (23.69 ± 3.58 mL). However, no differences (p > 0.05) were observed between groups for sperm concentration (DL: 238.9 ± 98.4 × 10⁶ sperm/mL; EL: 359.8 ± 165.8 × 10⁶ sperm/mL), motility (DL: 66.25 ± 1.35%; EL: 67.50 ± 1.77%), vigor (DL: 2.91 ± 0.14; EL: 2.94 ± 0.06), and morphological defects (DL: 48.81 ± 8.21%; EL: 41.97 ± 6.11%). The results indicate that behavioral performance during conditioning is more closely associated with ejaculate volume than with sperm quality parameters. This may be related to the longer mounting attempts observed in the DL group during conditioning, with prolonged sexual stimulation favoring increased secretion of seminal plasma by accessory sex glands due to extended exposure to the collection environment prior to ejaculation. The variability observed in the conditioning process demonstrates that young stallions exhibit different learning patterns, which should be considered in the integrated interpretation of behavior and seminal parameters, reinforcing the importance of early identification of learning profiles and the adoption of individualized management strategies.

Keywords: Equines, behavioral responses, Phantom, Semen collection

Legal authorizations: CEUA nº 4158210725

Acknowledgments and funders: CAPES

Correlação entre a carga microbiana total e o perfil seminal de garanhões

Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira¹, Milena Amorim dos Santos², Catherine Peixoto Cavalcante³, Paula Junqueira Ferraz⁴, Irma Janet Ortega Chávez⁵, Marcella Tainá Resende Ribeiro⁶, Celso Guimarães Barbosa⁶, Marco Roberto Bourg de Mello⁶, Vera Lucia Teixeira de Jesus⁶, Júlio Cesar Ferraz Jacob⁶

¹Universidade Federal de Uberlândia, ²Universidade Federal de Juiz de Fora, ³Universidade Federal da Bahia, ⁴Jacob Academy, ⁵Universidad de Guadalajara, ⁶Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
E-mail: vitoriacabdalla@ufu.br

A qualidade seminal de garanhões pode ser influenciada pela microbiota presente no ejaculado, incluindo bactérias e fungos capazes de comprometer a viabilidade espermática. Este estudo objetivou correlacionar a carga microbiana com parâmetros de qualidade seminal em garanhões de diferentes raças. Foram avaliados 28 garanhões adultos (5–15 anos), distribuídos entre Brasil (n=18) e México (n=10), ambos em regime de coleta de sêmen regular. Ressalta-se que as análises foram realizadas por dois avaliadores (um em cada país), os quais foram submetidos a treinamento prévio conjunto para padronização dos critérios de avaliação. Antes das coletas, todos os animais tiveram o pênis higienizado com água corrente e secado com papel toalha. As coletas foram realizadas com vagina artificial, seguidas de diluição (1:1) com diluente à base de leite desnatado acrescido de antibiótico. Realizou-se avaliação imediata de volume, motilidade total e progressiva, vigor, concentração espermática e integridade de membrana plasmática. A análise microbiológica foi conduzida por cultivo em meios seletivos e diferenciais, com identificação baseada em características morfológicas e coloração de Gram; para análise fúngica, utilizou-se ágar Sabouraud. Observou-se crescimento bacteriano em 61% (17/28) das amostras, com predominância de *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Proteus* spp. No Brasil, 39% dos animais apresentaram contaminação, enquanto no México a ocorrência foi de 100%, com maior frequência de infecções mistas (70%). Essa disparidade pode estar relacionada a fatores de manejo e ao método de reprodução predominante, visto que no México a monta natural é utilizada com maior frequência. Esse método eleva a exposição do trato reprodutor masculino à microbiota vaginal e a contaminantes ambientais, favorecendo uma maior carga microbiana no momento da coleta. Os fungos foram isolados apenas no Brasil (18% *Candida* sp. e 7% *Aspergillus* sp.), sempre associados à presença bacteriana. Não houve associação significativa entre presença bacteriana e a cinética ou integridade de membrana ($P > 0,05$). Especificamente, a motilidade total ($63,6\% \pm 7,4\%$ vs. $52,1\% \pm 7,3\%$) e a integridade de membrana ($75\% \pm 3,8\%$ vs. $69,8\% \pm 6,5\%$) foram semelhantes entre amostras negativas e positivas, respectivamente. Entretanto, verificou-se correlação significativa entre carga bacteriana e aumento de patologias espermáticas ($P = 0,02$). Amostras com mais de 40% de alterações morfológicas apresentaram maior positividade bacteriana ($49,1\% \pm 6,6\%$) em comparação às amostras negativas ($20,9\% \pm 2,8\%$), indicando impacto na qualidade estrutural dos espermatozoides. Conclui-se que a microbiota seminal varia conforme o ambiente e manejo, com maior carga microbiana associada ao aumento de patologias espermáticas. A presença concomitante de fungos e bactérias reforça a complexidade desse ecossistema e necessidade de rigor nos protocolos higiênicos e estratégias de controle que não comprometam a viabilidade espermática.

Palavras-chave: Sêmen, Equino, Patologia Espermática

Autorizações legais: CEUA/IV: n. do protocolo 100/2014.

Correlation between total microbial load and seminal profile in stallions

Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira¹, Milena Amorim dos Santos², Catherine Peixoto Cavalcante³, Paula Junqueira Ferraz⁴, Irma Janet Ortega Chávez⁵, Marcella Tainá Resende Ribeiro⁶, Celso Guimarães Barbosa⁶, Marco Roberto Bourg de Mello⁶, Vera Lucia Teixeira de Jesus⁶, Júlio Cesar Ferraz Jacob⁶

¹Universidade Federal de Uberlândia, ²Universidade Federal de Juiz de Fora, ³Universidade Federal da Bahia, ⁴Jacob Academy, ⁵Universidad de Guadalajara, ⁶Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
E-mail: vitoriacabdalla@ufu.br

Stallion seminal quality can be influenced by the microbiota present in the ejaculate, including bacteria and fungi capable of compromising sperm viability. This study aimed to correlate microbial load with seminal quality parameters in stallions of different breeds. Twenty-eight adult stallions (5–15 years old) were evaluated, distributed between Brazil (n=18) and Mexico (n=10), both under a regular semen collection schedule. Notably, the analyses were performed by two evaluators (one in each country) who underwent prior joint training to standardize evaluation criteria. Before collection, all animals had their penis sanitized with running water and dried with paper towels. Collections were performed using an artificial vagina, followed by dilution (1:1) with a skim milk-based extender supplemented with antibiotics. Immediate evaluation of volume, total and progressive motility, vigor, sperm concentration, and plasma membrane integrity was performed. Microbiological analysis was conducted by culture on selective and differential media, with identification based on morphological characteristics and Gram staining; for fungal analysis, Sabouraud agar was used. Bacterial growth was observed in 61% (17/28) of the samples, with a predominance of *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus* spp. In Brazil, 39% of the animals showed contamination, while in Mexico the occurrence was 100%, with a higher frequency of mixed infections (70%). This disparity may be related to management factors and the predominant breeding method, as natural cover is more frequently practiced in Mexico. This method increases the exposure of the male reproductive tract to vaginal microbiota and environmental contaminants, favoring a higher microbial load at the time of collection. Fungi were isolated only in Brazil (18% *Candida* sp. and 7% *Aspergillus* sp.), always associated with bacterial presence. No significant association was found between bacterial presence and sperm kinematics or membrane integrity ($P>0.05$). Specifically, total motility ($63.6\% \pm 7.4\%$ vs. $52.1\% \pm 7.3\%$) and membrane integrity ($75\% \pm 3.8\%$ vs. $69.8\% \pm 6.5\%$) were similar between negative and positive samples, respectively. However, a significant correlation was found between bacterial load and increased sperm pathologies ($P=0.02$). Samples with more than 40% morphological abnormalities showed higher bacterial positivity ($49.1\% \pm 6.6\%$) compared to negative samples ($20.9\% \pm 2.8\%$), indicating an impact on the structural quality of the spermatozoa. It is concluded that seminal microbiota varies according to environment and management, with a higher microbial load associated with increased sperm pathologies. The concomitant presence of fungi and bacteria reinforces the complexity of this ecosystem and the need for rigorous hygienic protocols and control strategies that do not compromise sperm viability.

Keywords: Sperm pathology, Semen, Equine

Legal authorizations: CEUA/IV: n. do protocolo 100/2014.

Efeito da rediluição na qualidade estrutural de espermatozoides equinos pós descongelamento

Thatyane Carla de Lima¹, Amanda Melo e Cavalcanti¹, Gilvannya Gonçalves de Sobral¹, Paola Pereira das Neves Snoeck², Ivan Bezerra Allaman², Marcio Menezes Nunes³, Maria Luiza Munhoz⁴, Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Estadual de Santa Cruz, ³German Standard Group, ⁴MK Arabians Stud
E-mail: thatyane.carla@gmail.com

A criopreservação do sêmen equino apresenta vantagens relevantes, como a redução do risco de transmissão de doenças, a superação de barreiras geográficas e a preservação prolongada de material genético. Entretanto, a manutenção da qualidade seminal ainda representa um desafio, devido à elevada sensibilidade dos espermatozoides equinos a estresses térmicos, oxidativos e osmóticos, que afetam diretamente a estrutura das membranas plasmática e acrossomal. Durante o congelamento e descongelamento a formação de cristais de gelo, a desorganização da bicamada lipídica e a alta produção de espécies reativas de oxigênio contribuem para danos estruturais, podendo comprometer eventos essenciais à fertilização, como a reação acrossomal. A eficiência da criopreservação também depende de fatores como taxa de resfriamento, tipo e concentração de crioprotetores e técnicas de manipulação. Neste cenário, a rediluição pós-descongelamento utilizando diluentes contendo crioprotetores, antioxidantes e substratos energéticos têm surgido como uma estratégia promissora para reduzir efeitos tóxicos residuais e favorecer a recuperação metabólica espermática. Porém esta técnica ainda é pouco explorada em equinos. Assim, o presente estudo avaliou o efeito da rediluição sobre a integridade das membranas espermáticas de sêmen equino descongelado. Foram utilizadas amostras de três garanhões da raça Quarto de Milha, descongeladas a 37 °C por 30 s e distribuídas em três tratamentos: sem rediluição (G1), rediluído em meio à base de leite desnatado (G2) e em diluente quimicamente definido de longa ação (G3), armazenadas a 5 °C e 17 °C por 72 h. A integridade da membrana plasmática foi avaliada por CFDA/PI e a acrossomal por FITC-PNA, em microscopia de epifluorescência, com contagem de 200 células por amostra. As análises estatísticas foram realizadas no software R ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a integridade da membrana plasmática apresentou valores moderados ao longo do tempo, com média inicial de 38%, mantendo-se em 32% após 72 h de armazenamento. Já a integridade acrossomal apresentou valores iniciais mais elevados (55%), com discreta redução ao longo do período de avaliação (47%), sem tendência acentuada de deterioração. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que a rediluição não exerceu efeito deletério sobre a integridade estrutural das membranas espermáticas. De modo geral, embora a criopreservação esteja associada à maior susceptibilidade a danos na membrana plasmática e, especialmente, no acrossoma, os resultados deste trabalho sugerem relativa estabilidade de ambas as estruturas após o descongelamento, mesmo sob diferentes condições de rediluição e armazenamento. Esses achados contrastam parcialmente com a literatura, que descreve aumento de acrossomas reagidos e membrana plasmática lesionada após o processo de congelamento dos espermatozoides, com possível comprometimento da capacidade fertilizante. Ressalta-se, no entanto, que a tanto a integridade plasmática quanto acrossomal devem ser interpretadas com cautela, uma vez que alterações funcionais podem ocorrer mesmo na ausência de danos morfológicos evidentes. Neste estudo não foi identificado um diluente capaz de promover melhora consistente da integridade estrutural, sugerindo ausência de efeito biológico sustentado da rediluição desses parâmetros. Assim, embora a rediluição não tenha melhorado a qualidade estrutural, também não comprometeu a integridade das membranas, podendo ser considerada uma estratégia promissora para o teste de novos diluentes com potencial efeito protetor.

Palavras-chave: integridade de membrana, sêmen, diluentes seminais, estresse osmótico, viabilidade celular

Effect of redilution on the structural quality of equine spermatozoa after thawing

Thatyane Carla de Lima¹, Amanda Melo e Cavalcanti¹, Gilvannya Gonçalves de Sobral¹, Paola Pereira das Neves Snoeck², Ivan Bezerra Allaman², Marcio Menezes Nunes³, Maria Luiza Munhoz⁴, Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Estadual de Santa Cruz, ³German Standard Group, ⁴MK Arabians Stud
E-mail: thatyane.carla@gmail.com

Equine semen cryopreservation offers relevant advantages, such as reducing the risk of disease transmission, overcoming geographical barriers, and enabling long-term preservation of genetic material. However, maintaining semen quality remains a challenge due to the high sensitivity of equine spermatozoa to thermal, oxidative, and osmotic stress, which directly affect the structure of plasma and acrosomal membranes. During freezing and thawing, ice crystal formation, lipid bilayer disorganization, and increased production of reactive oxygen species contribute to structural damage, potentially compromising essential fertilization events such as the acrosome reaction. The efficiency of cryopreservation also depends on factors such as cooling rate, type and concentration of cryoprotectants, and handling techniques. In this context, post-thaw redilution using extenders containing cryoprotectants, antioxidants, and energy substrates has emerged as a promising strategy to reduce residual toxic effects and promote sperm metabolic recovery. However, this technique remains poorly explored in equines. Therefore, the present study evaluated the effect of redilution on the integrity of sperm membranes in thawed equine semen. Samples from three Quarter Horse stallions were used, thawed at 37 °C for 30 s and allocated into three treatments: no redilution (G1), redilution in a skim milk-based extender (G2), and in a chemically defined long-acting extender (G3), stored at 5 °C and 17 °C for 72 h. Plasma membrane integrity was assessed using CFDA/PI, and acrosomal integrity using FITC-PNA, under epifluorescence microscopy, with a count of 200 cells per sample. Statistical analyses were performed using R software ($p < 0.05$). The results showed that plasma membrane integrity presented moderate values over time, with an initial mean of 38%, remaining at 32% after 72 h of storage. Acrosomal integrity showed higher initial values (55%), with a slight decrease over the evaluation period (47%), without a marked trend of deterioration. No significant differences were observed among treatments, indicating that redilution did not exert a deleterious effect on the structural integrity of sperm membranes. Overall, although cryopreservation is associated with increased susceptibility to damage in the plasma membrane and especially the acrosome, the results of this study suggest relative stability of both structures after thawing, even under different redilution and storage conditions. These findings partially contrast with the literature, which reports increased acrosome-reacted sperm and plasma membrane damage following the freezing process, potentially impairing fertilizing capacity. It is important to note that both plasma and acrosomal integrity should be interpreted with caution, as functional alterations may occur even in the absence of evident morphological damage. In this study, no extender capable of consistently improving structural integrity was identified, suggesting a lack of sustained biological effect of redilution on these parameters. Thus, although redilution did not improve structural quality, it also did not compromise membrane integrity and may be considered a promising strategy for testing new extenders with potential protective effects.

Keywords: membrane integrity, semen, semen extenders, osmotic stress, cell viability

Impacto da Rediluição na Funcionalidade do Sêmen Equino Criopreservado: Ênfase nos Parâmetros Cinemáticos

Thatyane Carla de Lima¹, Amanda Melo e Cavalcanti¹, Gilvannya Gonçalves de Sobral¹, Paola Pereira das Neves Snoeck², Ivan Bezerra Allaman², Marcio Menezes Nunes³, Maria Luiza Munhoz⁴, Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Estadual de Santa Cruz, ³German Standard Group, ⁴MK Arabians Stud
E-mail: thatyane.carla@gmail.com

As técnicas de reprodução assistida em equinos têm grande importância por impulsionarem o avanço genético, otimizarem os índices reprodutivos e facilitarem a disseminação de material genético de alto valor. Nesse contexto, a inseminação artificial com sêmen criopreservado se destaca por permitir o uso de reprodutores superiores em diferentes localidades, contribuir para o controle sanitário e favorecer o comércio internacional de genética. No entanto, a criopreservação espermática ainda representa um desafio nesta espécie, pois os processos de congelamento e descongelamento induzem alterações estruturais e funcionais que comprometem a qualidade seminal, especialmente a motilidade e a capacidade fertilizante. Diante disso, diversos diluentes contendo crioprotetores, antioxidantes e substratos energéticos têm sido empregados no processamento do sêmen e, mais recentemente, a utilização desses meios após o descongelamento, por meio da rediluição, vem sendo investigada com o intuito de minimizar efeitos tóxicos residuais e fornecer substratos que favoreçam a recuperação metabólica dos espermatozoides. Embora resultados positivos já tenham sido observados em outras espécies, essa abordagem ainda é pouco explorada em cavalos. Neste estudo, avaliou-se o impacto da rediluição sobre a funcionalidade do sêmen equino criopreservado, com ênfase nos parâmetros cinemáticos. Foram utilizadas amostras de três garanhões da raça Quarto de Milha, descongeladas a 37 °C por 30 segundos e distribuídas em três tratamentos: sem rediluição (G1), rediluído em meio à base de leite desnatado (G2) e rediluído em diluente quimicamente definido de longa ação (G3). As amostras foram armazenadas sob duas temperaturas (5 °C e 17 °C) e avaliadas ao longo de 72 horas. A motilidade e a cinemática espermática foram analisadas por sistema CASA (SCA®), incluindo parâmetros como motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) (%); velocidade curvilinear (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média de trajeto (VAP) (µm/s); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz). Também se avaliou a integridade das membranas plasmática e acrossomal, por microscopia de epifluorescência. As análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2026), considerando significância de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a rediluição influenciou predominantemente a funcionalidade espermática, com maior impacto sobre os parâmetros cinemáticos, sem promover alterações expressivas na integridade estrutural das células. As variáveis VCL, VSL e VAP foram as mais sensíveis às condições experimentais, sendo significativamente influenciadas pelo tipo de diluente, tempo de armazenamento e temperatura ($p < 0,05$), sem interação entre esses fatores. Observou-se melhor desempenho cinemático nas primeiras 24 horas, seguido de redução progressiva ao longo do tempo. O diluente quimicamente definido de longa ação (G3) apresentou desempenho superior, possivelmente relacionado a maior disponibilidade energética e melhor suporte metabólico aos espermatozoides. A temperatura de armazenamento exerceu efeito significativo sobre os parâmetros cinemáticos espermáticos (VCL, VSL e VAP), com desempenho superior a 5 °C, indicando melhor conservação da funcionalidade celular em condições de reduzida atividade metabólica. De forma geral, os achados reforçam que a cinemática espermática é um indicador altamente sensível da qualidade funcional do sêmen equino criopreservado, sendo útil para detectar efeitos de intervenções pós-descongelamento. A rediluição, especialmente com diluentes de longa ação, mostra-se como uma estratégia promissora para melhorar a dinâmica e a longevidade espermática, podendo contribuir para a otimização de protocolos de inseminação artificial na espécie equina.

Palavras-chave: Sêmen, Equinos, Criopreservação, diluentes seminais, longevidade espermática

Impact of Redilution on the Functionality of Cryopreserved Equine Semen: Emphasis on Kinematic Parameters

Thatyane Carla de Lima¹, Amanda Melo e Cavalcanti¹, Gilvannya Gonçalves de Sobral¹, Paola Pereira das Neves Snoeck², Ivan Bezerra Allaman², Marcio Menezes Nunes³, Maria Luiza Munhoz⁴, Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, ²Universidade Estadual de Santa Cruz, ³German Standard Group, ⁴MK Arabians Stud
E-mail: thatyane.carla@gmail.com

Assisted reproductive techniques in equines are of great importance as they drive genetic advancement, optimize reproductive performance, and facilitate the dissemination of high-value genetic material. In this context, artificial insemination using cryopreserved semen stands out for enabling the use of superior stallions across different locations, contributing to sanitary control, and supporting the international trade of genetics. However, sperm cryopreservation still represents a challenge in this species, as the processes of freezing and thawing induce structural and functional alterations that compromise semen quality, particularly motility and fertilizing capacity. In light of this, various extenders containing cryoprotectants, antioxidants, and energy substrates have been used in semen processing. More recently, the use of these media after thawing, through redilution, has been investigated in order to minimize residual toxic effects and provide substrates that support the metabolic recovery of spermatozoa. Although positive results have been reported in other species, this approach remains poorly explored in horses. In this study, the impact of redilution on the functionality of cryopreserved equine semen was evaluated, with emphasis on kinematic parameters. Semen samples from three Quarter Horse stallions were used, thawed at 37 °C for 30 seconds and allocated into three treatments: no redilution (G1), redilution in a skim milk-based extender (G2), and redilution in a long-acting chemically defined extender (G3). The samples were stored at two temperatures (5 °C and 17 °C) and evaluated over a 72-hour period. Sperm motility and kinematics were assessed using a CASA system (SCA®), including parameters such as total motility (TM), progressive motility (PM), linearity (LIN), and straightness (STR) (%); curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), and average path velocity (VAP) (µm/s); amplitude of lateral head displacement (ALH, µm), and beat cross frequency (BCF, Hz). Plasma and acrosomal membrane integrity were also evaluated by epifluorescence microscopy. Statistical analyses were performed using R software (R Core Team, 2026), considering significance at $p < 0.05$. The results demonstrated that redilution predominantly affected sperm functionality, with a greater impact on kinematic parameters, without causing marked changes in cellular structural integrity. The variables VCL, VSL, and VAP were the most sensitive to the experimental conditions, being significantly influenced by extender type, storage time, and temperature ($p < 0.05$), with no interaction among these factors. Better kinematic performance was observed within the first 24 hours, followed by a progressive decline over time. The long-acting chemically defined extender (G3) showed superior performance, possibly related to greater energy availability and improved metabolic support for spermatozoa. Storage temperature had a significant effect on sperm kinematic parameters (VCL, VSL, and VAP), with better performance at 5 °C, indicating improved preservation of cellular functionality under conditions of reduced metabolic activity. Overall, the findings reinforce that sperm kinematics is a highly sensitive indicator of the functional quality of cryopreserved equine semen and is useful for detecting the effects of post-thaw interventions. Redilution, especially with long-acting extenders, appears to be a promising strategy to improve sperm dynamics and longevity, potentially contributing to the optimization of artificial insemination protocols in equine species.

Keywords: Semen, equine, cryopreservation, semen extenders, sperm longevity

Vesiculite seminal em garanhão: uso de gradiente para seleção espermática para congelamento de sêmen

Camila Moreira Trinque¹, Lucas Emanuel Ferreira Canuto², Mariana Silva Frasson¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, Thais Spessotto Bello¹, Cássio Luiz Nogueira Trinque³, Pedro Moreira Trinque³, José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Márcio Garcia Ribeiro¹, Frederico Ozanan Papa¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade Federal de Lavras, ³AGROMEN
E-mail: trinque.ca@gmail.com

O trato reprodutivo interno dos garanhões inclui as glândulas sexuais acessórias—bulbouretrais, próstata, vesículas seminais e ampolas dos ductos deferentes—responsáveis pela secreção da maior parte do plasma seminal. Dentre as afecções que acometem essas glândulas, a vesiculite seminal ocorre devido à colonização bacteriana em uma ou ambas as vesículas seminais, levando ao acúmulo de conteúdo purulento, que pode ser eliminado durante a ejaculação. A colheita fracionada de sêmen é uma ferramenta eficaz para diagnóstico e manejo reprodutivo de garanhões acometidos por essa patologia, pois permite a separação do ejaculado em três frações distintas: duas primeiras livres de contaminação e uma terceira, proveniente das vesículas seminais, contaminada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento antimicrobiano sistêmico associado à colheita fracionada e ao processamento seminal com colóide (EquiPure™) na viabilização do sêmen de um garanhão com infecção persistente. Descreve-se o caso de um garanhão Brasileiro de Hipismo, de quatro anos, sem histórico reprodutivo prévio em monta natural ou colheita de sêmen. Na primeira colheita, observou-se homospermia leve, caracterizada por discreta alteração amarronzada do ejaculado. A avaliação microscópica imediata revelou neutrofilia moderada, confirmando processo inflamatório ativo. Na segunda colheita, realizada no dia seguinte, a presença de piospermia tornou-se evidente, com aumento da turbidez e acentuação da coloração amarelada, compatível com exsudato purulento. O diagnóstico inicial foi realizado a campo, com base na avaliação macroscópica e na microscopia direta do sêmen fresco. Portanto, iniciou-se tratamento com enrofloxacin (5 mg/kg, intravenosa, uma vez ao dia, por 15 dias). Durante esse período, as colheitas foram realizadas semanalmente utilizando a colheita fracionada, observando-se melhora progressiva na qualidade do ejaculado perante cinética espermática e avaliação da presença de neutrófilos. Entretanto, 15 dias após o término do tratamento, o ejaculado voltou a apresentar piospermia. Dessa maneira, o ejaculado total foi enviado para cultura e antibiograma ao Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-Unesp, Botucatu-SP, identificando *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Staphylococcus* sp., *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae*. Com base nesses resultados, iniciou-se um segundo tratamento com enrofloxacin (5,7 g, via oral, pasta comestível, 15 g, uma vez ao dia, por 10 dias). Durante o tratamento, observou-se melhora progressiva da qualidade seminal no ejaculado completo, especialmente na cinética espermática e na redução de neutrófilos. Contudo, para fins de congelamento, optou-se por utilizar apenas a última fração da colheita fracionada, por ser a porção menos exposta à contaminação bacteriana residual. Após 10 dias de terapia, o ejaculado foi colhido de forma tradicional, e o sêmen total foi dividido em dois grupos: Grupo A, congelado de forma tradicional, e Grupo B, processado com EquiPure™ (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Uma palheta de cada grupo foi enviada para nova cultura e antibiograma, revelando o isolamento de *Bacillus* sp. apenas no Grupo A, congelado de forma tradicional, sem colóide, enquanto o Grupo B, processado com EquiPure™ não apresentou crescimento bacteriano. Esses achados sugerem que, embora a antibioticoterapia e a colheita fracionada auxiliem no manejo paliativo, o processamento com colóide mostrou-se a estratégia definitiva para a eliminação de contaminantes e viabilização do uso do sêmen em biotécnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Vesiculite, colheita fracionada, garanhão, Brasileiro de Hipismo, criopreservação espermática

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem a CAPES e Botupharma.

Seminal Vesiculitis in a Stallion: Use of Gradient for Sperm Selection for Semen Freezing

Camila Moreira Trinque¹, Lucas Emanuel Ferreira Canuto², Mariana Silva Frasson¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua¹, Thais Spessotto Bello¹, Cássio Luiz Nogueira Trinque³, Pedro Moreira Trinque³, José Antônio Dell'Aqua Jr¹, Márcio Garcia Ribeiro¹, Frederico Ozanan Papa¹

¹Universidade Estadual Paulista, ²Universidade Federal de Lavras, ³AGROMEN
E-mail: trinque.ca@gmail.com

The internal reproductive tract of stallions includes the accessory sex glands—bulbourethral, prostate, seminal vesicles, and ampullae of the ductus deferens—responsible for secreting the majority of the seminal plasma. Among the conditions affecting these glands, seminal vesiculitis occurs due to bacterial colonization in one or both seminal vesicles, leading to the accumulation of purulent content, which may be eliminated during ejaculation. Fractionated semen collection is an effective tool for the diagnosis and reproductive management of stallions affected by this pathology, as it allows for the separation of the ejaculate into three distinct fractions: the first two being contamination-free and a third, originating from the seminal vesicles, being contaminated. The objective of this study was to evaluate the efficacy of systemic antimicrobial treatment associated with fractionated collection and colloid seminal processing (EquiPure™) in the viability of semen from a stallion with a persistent infection. This report describes the case of a four-year-old Brazilian Sport Horse stallion with no prior reproductive history in natural service or semen collection. In the first collection, mild hemospermia was observed, characterized by a slight brownish alteration of the ejaculate. Immediate microscopic evaluation revealed moderate neutrophilia, confirming an active inflammatory process. In the second collection, performed the following day, the presence of pyospermia became evident, with increased turbidity and a more pronounced yellowish coloration, compatible with purulent exudate. The initial diagnosis was made in the field, based on macroscopic evaluation and direct microscopy of fresh semen. Therefore, treatment with enrofloxacin was initiated (5 mg/kg, intravenous, once daily, for 15 days). During this period, collections were performed weekly using fractionated collection, observing progressive improvement in ejaculate quality regarding sperm kinetics and the assessment of the presence of neutrophils. However, 15 days after the end of the treatment, the ejaculate again presented pyospermia. Consequently, the total ejaculate was sent for culture and antimicrobial susceptibility testing at the Laboratory of Microbiological Diagnosis of FMVZ-Unesp, Botucatu-SP, identifying *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Staphylococcus* sp., *Klebsiella oxytoca*, and *Enterobacter cloacae*. Based on these results, a second treatment with enrofloxacin was started (5.7 g, oral, edible paste, 15 g, once daily, for 10 days). During the treatment, a progressive improvement in seminal quality was observed in the complete ejaculate, especially in sperm kinetics and the reduction of neutrophils. However, for freezing purposes, it was decided to use only the last fraction of the fractionated collection, as it was the portion least exposed to residual bacterial contamination. After 10 days of therapy, the ejaculate was collected in the traditional manner, and the total semen was divided into two groups: Group A, frozen traditionally, and Group B, processed with EquiPure™ (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brazil). One straw from each group was sent for a new culture and susceptibility test, revealing the isolation of *Bacillus* sp. only in Group A, frozen traditionally without colloid, while Group B, processed with EquiPure™, showed no bacterial growth. These findings suggest that, although antibiotic therapy and fractionated collection assist in palliative management, colloid processing proved to be the definitive strategy for eliminating contaminants and making the use of semen viable in assisted reproduction biotechnologies.

Keywords: Vesiculitis, fractionated collection, sperm cryopreservation, Brazilian Sport Horse

Legal authorizations: no applicable

Acknowledgments and funders: The authors thank CAPES and Botupharma.