

## Avanços na criopreservação do sêmen suíno: identificação do protocolo ideal de descongelamento para máxima viabilidade espermática – dados preliminares

**Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>, Maria Eduarda Zambelli Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Lucas Augusto Iizuka de Sousa<sup>1</sup>, Evelyn Fernanda Vasconcellos Barbosa<sup>1</sup>, Leriana Garcia Reis<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
 E-mail: gabrielle-primo@usp.br

A utilização do sêmen suíno criopreservado ainda é limitada, principalmente devido à acentuada redução na qualidade espermática após o processo de congelamento e descongelamento. Dentre as etapas da criopreservação, a descongelamento destaca-se como um momento crítico, pois marca a retomada da atividade fisiológica dos espermatozoides. Nesse contexto, é fundamental que esse processo seja realizado sob condições adequadas de tempo e temperatura, uma vez que pode impactar diretamente a viabilidade e funcionalidade espermática e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo. Diante do exposto, o projeto teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes protocolos de temperatura e tempo na etapa de descongelamento, sobre os parâmetros cinéticos e de integridade espermática dos espermatozoides. Foram utilizados três cachacos de linhagem híbrida comercial, com coletas realizadas em quatro momentos. As frações ricas dos ejaculados foram subdivididas em quatro alíquotas de igual volume, criopreservadas e armazenadas em botijões criogênicos até a análise. Para a descongelamento, duas palhetas de cada animal foram submetidas aos seguintes protocolos: I) 37 °C por 30 segundos; II) 40 °C por 30 segundos; III) 50 °C por 20 segundos; e IV) 70 °C por 8 segundos. Após o processo de descongelamento, o sêmen foi avaliado pelo sistema computadorizado (SCA®; SCA Production Software v.5.4.0.0), determinando-se a motilidade total (TMOT, %), motilidade progressiva (MOTP, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz). A integridade da membrana plasmática e acrossomal foi avaliada através da citometria de fluxo (BD FACSAria; BD FACSDiva 6.0). Para esta análise, as amostras foram incubadas com o seguinte conjunto de sondas fluorescentes: Hoechst 33342, iodeto de propídeo (PI) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA). As variáveis foram analisadas por meio de modelos lineares generalizados mistos, utilizando o procedimento GLIMMIX do software SAS (v. 9,4). O delineamento experimental utilizado foi de bloco generalizado, no qual a unidade experimental foi ¼ do ejaculado de cada animal. O modelo estatístico incluiu o efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de animal e coleta. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. Na análise pré-criopreservação, foram observados TMOT (83,51±3,85), PMOT (56,99±8,59), VAP (32,07±4,32), VSL (19,03±2,30), VCL (54,51±8,20), ALH (2,90±0,29), BCF (6,85±0,28), STR (36,45±2,47) e LIN (60,66±2,28). Não houve efeito dos tratamentos sobre a TMOT 37°C/30s (10,49±1,26), 40°C/30s (15,82±3,04), 50°C/20s (15,97±2,42) e 70°C/8s (14,47±2,40) no entanto, a PMOT foi menor no tratamento de 37°C por 30 segundos (0,88±0,24) em comparação aos demais tratamentos 40°C/30s (4,65±1,60), 50°C/20s (4,85±1,15) e 70°C/8s (3,74±0,82). Para as variáveis ALH e STR, o protocolo de descongelamento a 50 °C por 20 segundos apresentou os melhores resultados, com valores significativos de (2,70±0,16 e 29±2,67, respectivamente). Na análise por citometria de fluxo, não houve efeito dos tratamentos sobre a variável de acrossoma lesionado e membrana lesionada (ALML, %), com valores de 37°C/30s (89,37±3,02), 40°C/30s (92,89±1,45), 50 °C/20s (93,15±1,82) e 70°C/8s (86,31±3,01). Entretanto, a variável de membrana plasmática e acrossomal íntegras (AIMI, %) apresentou diferença significativa, sendo os maiores valores observados nos protocolos de 70°C/8s (4,45±1,65) e 37 °C/30s (3,29±2,47), seguidos por 40 °C/30s (1,41±0,26) e 50 °C/20s (0,97±0,81). A partir dos dados obtidos, ainda não foi possível estabelecer um protocolo de tempo e temperatura de descongelamento que melhor preserve simultaneamente a cinética e a integridade dos espermatozoides. O estudo seguirá para com a realização de novas congelamentos, visando a obtenção de dados mais robustos e conclusivos.

**Palavras-chave:** biotecnologia da reprodução, cachaco, congelamento de sêmen, inseminação artificial, qualidade espermática.

**Autorizações legais:** CEUA / FMVZ – USP. Número do protocolo:2833100625; CEP: 05508-270 / FMVZ / USP: n. de protocolo: 2025-1598 (termo de adesão).

**Agradecimentos e financiadores:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2025/24627-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq310486/2023-8).

## Advances in Boar Semen Cryopreservation: Identifying the Ideal Thawing Protocol for Maximum Sperm Viability – preliminary data

**Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>, Maria Eduarda Zambelli Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Lucas Augusto Izuka de Sousa<sup>1</sup>, Evelyn Fernanda Vasconcellos Barbosa<sup>1</sup>, Leriana Garcia Reis<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
 E-mail: gabrielle-primo@usp.br

The use of cryopreserved boar semen is still limited, mainly due to the marked reduction in sperm quality after the freezing and thawing process. Among the cryopreservation steps, thawing stands out as a critical moment, as it marks the resumption of physiological sperm activity. In this context, it is essential that this process be carried out under appropriate time and temperature conditions, since it can directly impact sperm viability and functionality and, consequently, reproductive success. Therefore, this project aimed to evaluate the effects of different temperature and time protocols during the thawing stage on the kinetic parameters and sperm integrity of the spermatozoa. Three boars of a commercial hybrid line were used, with collections performed at four different times. The sperm-rich fractions of the ejaculates were subdivided into four aliquots of equal volume, cryopreserved, and stored in cryogenic tanks until analysis. For thawing, two straws from each animal were subjected to the following protocols: I) 37 °C for 30 seconds; II) 40 °C for 30 seconds; III) 50 °C for 20 seconds; and IV) 70 °C for 8 seconds. After the thawing process, the semen was evaluated using a computerized system (SCA®; SCA Production Software v.5.4.0.0), determining total motility (TMOT, %), progressive motility (MOTP, %), path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), progressive velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), lateral head displacement amplitude (ALH,  $\mu\text{m}$ ), and flagellar beat frequency (BCF, Hz). Plasma and acrosomal membrane integrity was assessed using flow cytometry (BD FACSAria; BD FACSDiva 6.0). For this analysis, samples were incubated with the following set of fluorescent probes: Hoechst 33342, propidium iodide (PI), and fluorescein isothiocyanate-conjugated *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA). Variables were analyzed using generalized linear mixed models, employing the GLIMMIX procedure of SAS software (v. 9.4). The experimental design used was a generalized block design, in which the experimental unit was  $\frac{1}{4}$  of the ejaculate from each animal. The statistical model included the fixed effect of treatment and the random effect of animal and collection. Means were compared using Tukey's test, adopting a significance level of 5%. In the pre-cryopreservation analysis, the following values were observed: TMOT ( $83.51 \pm 3.85$ ), PMOT ( $56.99 \pm 8.59$ ), VAP ( $32.07 \pm 4.32$ ), VSL ( $19.03 \pm 2.30$ ), VCL ( $54.51 \pm 8.20$ ), ALH ( $2.90 \pm 0.29$ ), BCF ( $6.85 \pm 0.28$ ), STR ( $36.45 \pm 2.47$ ) and LIN ( $60.66 \pm 2.28$ ). There was no effect of the treatments on TMOT 37°C/30s ( $10.49 \pm 1.26$ ), 40°C/30s ( $15.82 \pm 3.04$ ), 50°C/20s ( $15.97 \pm 2.42$ ) and 70°C/8s ( $14.47 \pm 2.40$ ) however, PMOT was lower in the 37°C for 30 seconds treatment ( $0.88 \pm 0.24$ ) compared to the other treatments 40°C/30s ( $4.65 \pm 1.60$ ), 50°C/20s ( $4.85 \pm 1.15$ ) and 70°C/8s ( $3.74 \pm 0.82$ ). For the ALH and STR variables, the thawing protocol at 50 °C for 20 seconds showed the best results, with significant values of ( $2.70 \pm 0.16$  and  $29 \pm 2.67$ , respectively). In the flow cytometry analysis, there was no effect of the treatments on the variable of damaged acrosome and damaged membrane (ALML, %), with values of 37°C/30s ( $89.37 \pm 3.02$ ), 40°C/30s ( $92.89 \pm 1.45$ ), 50 °C/20s ( $93.15 \pm 1.82$ ) and 70°C/8s ( $86.31 \pm 3.01$ ). However, the variable of intact plasma and acrosomal membranes (AIMI, %) showed a significant difference, with the highest values observed in the 70°C/8s ( $4.45 \pm 1.65$ ) and 37°C/30s ( $3.29 \pm 2.47$ ) protocols, followed by 40°C/30s ( $1.41 \pm 0.26$ ) and 50°C/20s ( $0.97 \pm 0.81$ ). Based on the data obtained, it was not yet possible to establish a thawing time and temperature protocol that best simultaneously preserves the kinetics and integrity of the spermatozoa. The study will continue with further freezing procedures, aiming to obtain more robust and conclusive data.

**Keywords:** reproductive biotechnology, boar, semen freezing, artificial insemination, sperm quality.

**Legal authorizations:** CEUA / FMVZ – USP. Protocol number: 2833100625; Postal Code: 05508-270 / FMVZ / USP: Protocol number: 2025-1598 (terms of adhesion).

**Acknowledgments and funders:** To the São Paulo Research Foundation (FAPESP- 2025/24627-0) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq310486/2023-8).

## Avanços na gametogênese masculina *in vitro* em suínos utilizando sistema de testículo reconstituído (rTestis)

**Kaiana Recchia<sup>1</sup>, Naira Caroline Godoy Pieri<sup>2</sup>, Laís Vicari de Figueirêdo Pessoa<sup>2</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>3</sup>, Fabiana Fernandes Bressan<sup>2</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, <sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, <sup>3</sup>Ápis Serviços Veterinários,

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

E-mail: kaiana.recchia@usp.br

A geração de células germinativas masculinas *in vitro* representa uma estratégia promissora para o avanço da biotecnologia reprodutiva, particularmente em espécies de interesse zootécnico. No entanto, sua aplicação nessas espécies ainda permanece limitada, apesar do seu grande potencial para melhorar a eficiência reprodutiva e a disseminação genética. Neste estudo, tivemos como objetivo utilizar células-tronco pluripotentes induzidas suínas derivadas de células obtidas da urina (iPSCs-UDCs), inicialmente diferenciadas em pPGCLCs (*pocine* PGCs-like cells), seguidas de um sistema de cocultivo com células suínas gonadais embrionárias masculinas, nomeado testículo reconstituído (rTestis), visando recapitular o desenvolvimento germinativo masculino inicial *in vitro*. As piPSCs-UDCs de um estudo anterior foram utilizadas e transduzidas com o gene repórter GFP. As colônias GFP<sup>+</sup> de piPSC-UDCs foram selecionadas manualmente e mantidas em cultivo em meio iPSCs (DMEM/F12 (Gibco) com 20% KSR (Gibco), 0,1 mM NEAA (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 3,85 µM β-mercaptoetanol (Gibco), 10 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina (Gibco) e 10 ng/mL de bFGF (PeproTech)) a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram diferenciadas em pPGCLCs, com as iPSCs-UDCs inicialmente induzidas a epiblasto-like por meio do plaqueamento de 2,5 x 10<sup>5</sup> células em placas revestidas com fibronectina bovina (16,7 µg/mL), em meio de cultivo N2B27 suplementado com activina A (20 ng/mL), bFGF (12 ng/mL) e KSR (1%). Em seguida, as células foram induzidas a pPGCLCs em meio GK15 (GMEM (Gibco) com 15% KSR, 0,1 mM NEAA, 1 mM piruvato de sódio, 0,1 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, 10 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina, rhBMP4 (500 ng/mL), rhSCF (100 ng/mL), rhBMP8a (500 ng/mL) e rhEGF (50 ng/mL; todas da R&D)) por 4 dias em placas AggreWell, posteriormente as pPGCLCs foram analisadas por imunocitoquímica (ICC) e RT-qPCR. Após inseminação artificial de uma reprodutora, os embriões foram coletados aos 35 dias pós-fertilização, e as gônadas masculinas isoladas foram lavadas duas vezes com PBS (Gibco) e centrifugadas a 300 x g por 5 min. As células gonadais foram dissociadas com TrypLE Express a 37°C por 15 min. Em seguida, as células foram lavadas com tampão de lavagem (DMEM/F-12 com 0,1% de BSA) com DNase I (20 mg/mL) e filtradas por filtros celulares de 70 µm (Falcon), e ressuspensas em meio GK10 (GMEM com 10% KSR, 0,1 mM NEAA, 1 mM piruvato de sódio, 0,1 mM 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 2 mM GlutaMAX e 2,5% FBS (Hyclone)). Posteriormente, as células gonadais embrionárias foram plaqueadas em um poço da microplaca Nunclon Sphera (Thermo Scientific), na proporção de 1:1 com as pPGCLCs, e cultivadas por 16 dias. Após esse período, foi realizada a separação por FACS para selecionar as células GFP<sup>+</sup>, que foram analisadas por RT-qPCR. As pPGCLCs produzidas formaram agregados arredondados com bordas irregulares e apresentaram os transcritos *POU5F1*, *TFAP2C* e *PRDM1*. Além disso, os marcadores esperados de PGCs suínas, *OCT4*, *TFAP2C* e *BLIMP1*, também foram detectados por ICC. Durante o cultivo do rTestis, foram observados agrupamentos GFP<sup>+</sup> circundados por células gonadais embrionárias. Após o *sorting*, apenas as células GFP<sup>+</sup> foram analisadas, sendo observado um aumento na abundância dos transcritos relacionados à identidade germinativa (*DAZL* e *DDX4*), à linhagem espermatogonial (*PLZF*) e aos estágios pré-meióticos/meióticos (*STRA8*, *REC8* e *DMC1*), sugerindo progressão em direção à diferenciação de células germinativas masculinas e ao comprometimento meiótico inicial. Esses achados são inéditos na gametogênese *in vitro* em suínos, fornecendo novos insights para a geração de gametas masculinos viáveis e contribuindo para o avanço da biotecnologia reprodutiva e do melhoramento genético em espécies de interesse zootécnico.

**Palavras-chave:** Suínos, iPSCs, células germinativas primordiais, testículo reconstituído, gametogênese *in vitro*.

**Autorizações legais:** CEUA/USP-FMVZ nº 1239200616 - CEP 05508-270

**Agradecimentos e financiadores:** Essa pesquisa foi financiada pela FAPESP (2020/10503-3, 2019/02811-2; 2015/25564-0, 2015/26818-5; 2013/08135-2), CAPES (2017-616; 001) e CNPq (310486/2023-8).

## Advancing *in vitro* male gametogenesis in porcine through a reconstituted Testis system (rTestis)

**Kaiana Recchia<sup>1</sup>, Naira Caroline Godoy Pieri<sup>2</sup>, Laís Vicari de Figueirêdo Pessôa<sup>2</sup>,  
Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>3</sup>, Fabiana Fernandes Bressan<sup>2</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, <sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, <sup>3</sup>Ápis Serviços Veterinários, <sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
E-mail: kaiana.recchia@usp.br

The generation of male germ cells *in vitro* represents a promising strategy for advancing reproductive biotechnology, particularly in livestock species. However, its application in livestock species remains limited, despite its strong potential to improve reproductive efficiency and genetic dissemination. In this research, we aimed to use porcine induced pluripotent stem cells derived from urine-derived cells (iPSCs-UDCs), first differentiated into pPGCLCs (porcine PGCs-like cells), followed by the establishment of a co-culture system with male embryonic gonadal somatic cells collected from porcine embryos at 35 days post-fertilization, termed reconstituted testis (rTestis), with the aim of recapitulating early male germ cell development *in vitro*. piPSCs-UDCs from a previous study were used and transduced with the GFP reporter gene. After confirmation of GFP expression, GFP<sup>+</sup> piPSC-UDC colonies were manually selected and maintained in culture in iPSC media (DMEM/F12 (Gibco) with 20% KSR (Gibco), 0.1 mM NEAA (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), 3.85 μM β-mercaptoethanol (Gibco), 10 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin (Gibco), and 10 ng/mL bFGF (Peprotech)) at 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub>. The cells were differentiated into pPGCLCs. Briefly, the iPSCs-UDCs were first pre-induced into an epiblast-like state by plating 2.5 x 10<sup>5</sup> cells on plates coated with bovine fibronectin (16.7 μg/mL) in N2B27 culture media supplemented with activin A (20 ng/mL), bFGF (12 ng/mL), and KSR (1%). The cells were then induced into pPGCLCs in GK15 media (GMEM (Gibco) with 15% KSR, 0.1 mM NEAA, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, and 10 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, in the presence of the cytokines rhBMP4 (500 ng/mL), rhSCF (100 ng/mL), rhBMP8a (500 ng/mL), and rhEGF (50 ng/mL; all from R&D)) for 4 days in AggreWell plates, after which the pPGCLCs were analyzed by immunocytochemistry (ICC) and RT-qPCR. A sow was subjected to artificial insemination, and 35 days post-fertilization the embryos were collected, and the isolated male gonads were washed twice with PBS (Gibco) and centrifuged at 300 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded, and the gonadal cells were dissociated with TrypLE Express at 37°C for 15 minutes. The cells were then washed with wash buffer (DMEM/F-12 with 0.1% BSA) supplemented with DNase I (20 mg/mL) and filtered through 70 μm cell strainers (Falcon). The cells were resuspended in GK10 media (GMEM with 10% KSR, 0.1 mM NEAA, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 2 mM GlutaMAX, and 2.5% FBS (Hyclone)). Subsequently, the embryonic gonadal cells were plated in one well of a Nunclon Sphera microplate (Thermo Scientific) at a 1:1 ratio with pPGCLCs and cultured for 16 days. Afterward, the cells were dissociated into single cells, and FACS was performed to select the GFP<sup>+</sup> cells, which were subsequently analyzed by RT-qPCR. The produced pPGCLCs formed rounded clusters with irregular borders and showed abundant expression of the transcripts *POU5F1*, *TFAP2C*, and *PRDM1*. In addition, the expected porcine PGCs markers OCT4, *TFAP2C*, and *BLIMP1* were also detected by ICC. During the rTestis culture, GFP<sup>+</sup> PGC clusters surrounded by embryonic gonadal cells were observed. After cell sorting, only the GFP<sup>+</sup> cells were analyzed and an increased transcript abundance of germ cell identity markers (*DAZL* and *DDX4*), the spermatogonia-associated marker (*PLZF*), and pre-meiotic/meiotic markers (*STRA8*, *REC8*, and *DMC1*) was observed at the end of the protocol suggesting progression toward male germ cell differentiation and early meiotic commitment. These findings are unprecedented in porcine *in vitro* gametogenesis, providing new insights into the generation of viable male gametes and contributing to the advancement of reproductive biotechnology and genetic improvement in livestock species.

**Keywords:** porcine, iPSCs, primordial germ cells, reconstituted testis, *in vitro* gametogenesis.

**Legal authorizations:** CEUA/USP-FMVZ n° 1239200616 - CEP 05508-270

**Acknowledgments and funders:** This research was supported by FAPESP (grant numbers: 2020/10503-3, 2019/02811-2; 2015/25564-0, 2015/26818-5; 2013/08135-2), CAPES (grant number: 2017-616; 001) and CNPq - 310486/2023-8.

## Dinâmica da comunidade microbiana no sêmen suíno: interações entre antimicrobiano e imunonutrição

Carla Guimarães Scherer<sup>1</sup>, Mauricio Egídio Cantão<sup>2</sup>, José Rodrigo Cláudio Pandolfi<sup>2</sup>, Jalusa Kich<sup>2,1</sup>, Janine de Camargo<sup>3</sup>, Silvio de Azeredo Girardi<sup>3</sup>, Ricardo Zanella<sup>3,1</sup>, Mariana Groke Marques<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>IFC, Programa de Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal, <sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, <sup>3</sup>Universidade de Passo Fundo  
 E-mail: carlagscherer@gmail.com

A contaminação bacteriana do sêmen suíno constitui um dos principais fatores limitantes à eficiência reprodutiva em programas de inseminação artificial, impactando negativamente na qualidade espermática e favorecendo o uso recorrente de antimicrobianos em centrais de coleta e processamento de sêmen. Diante das crescentes restrições ao uso desses compostos e da preocupação global com a resistência antimicrobiana, alternativas baseadas na imunonutrição têm sido investigadas. O plasma seco, rico em proteínas funcionais e imunoglobulinas, apresenta propriedades anti-inflamatórias e moduladoras do sistema imune, podendo atuar na estabilização da microbiota e na redução da carga bacteriana seminal. O presente estudo teve como objetivo investigar a microbiota seminal de caçaços em resposta a potenciais agentes moduladores, como o plasma seco e os antimicrobianos, avaliando seus efeitos sobre a estrutura, composição e estabilidade da microbiota ao longo do tempo, em associação com parâmetros de qualidade espermática. Para isso, 60 machos suínos foram distribuídos em quatro tratamentos: Controle, ATB: 5,04 g de norfloxacino por sete dias, ATB + Plasma: norfloxacino por sete dias + 30 g de plasma seco por 40 dias, e Plasma: 30 g de plasma seco por 40 dias. Durante o período experimental (D7 a D40), foram realizadas coletas seriadas de sêmen. As amostras para microbiota foram coletadas nos dias sete (D7) e quarenta (D40) e armazenadas para posterior análise por sequenciamento 16S rRNA. A motilidade progressiva média no dia zero do experimento foi semelhante entre os grupos (Controle: 83,99 ± 6,99%; ATB: 85,04 ± 4,92%; ATB + Plasma: 85,10 ± 3,92%; Plasma: 84,71 ± 6,92%), indicando homogeneidade inicial. No D40, os valores permaneceram elevados e comparáveis entre os tratamentos (Controle: 86,69 ± 3,84%; ATB: 87,06 ± 3,50%; ATB + Plasma: 87,89 ± 2,79%; Plasma: 87,41 ± 2,96%), sugerindo que as intervenções não comprometeram a qualidade espermática ao longo do período experimental. A diversidade microbiana seminal (índice de Shannon) não foi influenciada pelos tratamentos ( $p = 0,431$ ), enquanto o efeito do tempo ( $p = 0,0015$ ) evidenciou variações significativas ao longo do período. A diversidade beta indicou diferenças na composição da microbiota entre os grupos (PERMANOVA,  $p < 0,05$ ), sem interação tratamento × tempo ( $p = 0,502$ ). A análise de dispersão (PERMDISP,  $p < 0,05$ ) revelou variação na estabilidade da microbiota. A análise de abundância diferencial demonstrou que, no D7, o uso de antimicrobianos promoveu aumento de gêneros oportunistas, como *Aeromonas*, *Acinetobacter* e *Enterobacteriaceae*, caracterizando disbiose inicial. A associação com plasma atenuou esse efeito. No grupo Controle, observou-se maior estabilidade da microbiota. No D40, houve reorganização seletiva, com redução de *Acinetobacter* no grupo Plasma em relação ao ATB, enquanto *Pseudomonas* apresentou maior abundância nos grupos tratados em comparação ao Controle. Em conjunto, os resultados indicam que os antimicrobianos induzem disbiose inicial, enquanto o plasma seco promove modulação e reorganização da microbiota, sem comprometer a qualidade espermática. Esses achados reforçam o potencial do plasma seco como estratégia para reduzir o uso de antimicrobianos em sistemas de produção de sêmen suíno.

**Palavras-chave:** microbiota seminal, suínos, imunonutrição, resistência antimicrobiana, plasma seco.

**Autorizações legais:** Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto Federal Catarinense Campus Concórdia, sob protocolo n° 04/2023

**Agradecimentos e financiadores:** APC Brasil

## Microbial community dynamics in boar semen: interactions between antimicrobials and immunonutrition

Carla Guimarães Scherer<sup>1</sup>, Mauricio Egídio Cantão<sup>2</sup>, José Rodrigo Cláudio Pandolfi<sup>2</sup>, Jalusa Kich<sup>2,1</sup>, Janine de Camargo<sup>3</sup>, Silvio de Azeredo Girardi<sup>3</sup>, Ricardo Zanella<sup>3,1</sup>, Mariana Groke Marques<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>IFC, Programa de Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal, <sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, <sup>3</sup>Universidade de Passo Fundo  
 E-mail: carlagscherer@gmail.com

Bacterial contamination of boar semen is one of the main limiting factors affecting reproductive efficiency in artificial insemination programs, negatively impacting sperm quality and promoting the recurrent use of antimicrobials in semen production centers. Given the increasing restrictions on the use of these compounds and the global concern regarding antimicrobial resistance, alternative strategies based on immunonutrition have been investigated. Spray-dried plasma (SDP), rich in functional proteins and immunoglobulins, exhibits anti-inflammatory and immunomodulatory properties and may contribute to microbiota stabilization and reduction of seminal bacterial load. This study aimed to investigate the seminal microbiota of boars in response to potential modulatory agents, such as SDP and antimicrobials, evaluating their effects on microbiota structure, composition, and stability over time, in association with sperm quality parameters. A total of 60 boars were allocated into four experimental groups: Control, ATB: 5.04 g of norfloxacin for 7 days, ATB + Plasma: norfloxacin for 7 days plus 30 g of SDP for 40 days, and Plasma: 30 g of SDP for 40 days. Semen samples were collected throughout the experimental period (D7 to D40), with microbiota analyses performed on samples collected at day 7 (D7) and day 40 (D40), which were stored for subsequent DNA extraction and 16S rRNA sequencing. Progressive motility at day zero (D0) was similar among groups (Control:  $83.99 \pm 6.99\%$ ; ATB:  $85.04 \pm 4.92\%$ ; ATB + Plasma:  $85.10 \pm 3.92\%$ ; Plasma:  $84.71 \pm 6.92\%$ ), indicating initial homogeneity. At D40, progressive motility remained high and comparable across treatments (Control:  $86.69 \pm 3.84\%$ ; ATB:  $87.06 \pm 3.50\%$ ; ATB + Plasma:  $87.89 \pm 2.79\%$ ; Plasma:  $87.41 \pm 2.96\%$ ), suggesting that the interventions did not impair sperm quality over time. Seminal microbial diversity (Shannon index) was not affected by treatments ( $p = 0.431$ ), whereas a significant time effect ( $p = 0.0015$ ) indicated temporal variation, reinforcing the dynamic nature of the seminal microbiota. Beta diversity analysis revealed differences in microbial composition among groups (PERMANOVA,  $p < 0.05$ ), with no treatment  $\times$  time interaction ( $p = 0.502$ ). Dispersion analysis (PERMDISP,  $p < 0.05$ ) indicated variation in microbiota stability. Differential abundance analysis showed that, at D7, antimicrobial use promoted an increase in opportunistic genera such as *Aeromonas*, *Acinetobacter*, and *Enterobacteriaceae*, characterizing an initial dysbiosis. The association with SDP attenuated this effect. The Control group exhibited greater microbiota stability over time. At D40, a selective microbiota reorganization was observed, with reduced abundance of *Acinetobacter* in the Plasma group compared to ATB, while *Pseudomonas* showed higher abundance in treated groups compared to Control. Overall, the results indicate that antimicrobial use induces an initial dysbiosis, whereas SDP promotes microbiota modulation and reorganization over time without compromising sperm quality. These findings highlight the potential of SDP as a strategy to reduce antimicrobial use in boar semen production systems.

**Keywords:** seminal microbiota, boars, spray-dried plasma, immunonutrition, antimicrobial resistance.

**Legal authorizations:** All procedures performed in this study were approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Instituto Federal Catarinense – Concórdia Campus, under protocol no. 04/2023.

**Acknowledgments and funders:** APC Brasil

## Efeito de diferentes diluidores na qualidade espermática de cachaaos

**Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>,  
Thais Eduarda da Silva Gomes<sup>1</sup>, Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, José Antônio Dell'Aqua Jr<sup>2</sup>,  
Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista  
E-mail: luan\_mendes@usp.br

O sêmen de cachaaos refrigerado é amplamente empregado em programas de inseminação artificial em sistemas comerciais de produção de suínos, correspondendo a mais de 95% das inseminações realizadas no país. Para assegurar a viabilidade e a qualidade das doses inseminantes, é imprescindível o rigor no processamento e no armazenamento, desde a coleta e diluição do ejaculado até sua manutenção em conservadora a 17 °C e posterior utilização. Adicionalmente, os diferentes diluidores apresentam características específicas quanto à capacidade de conservação, influenciando diretamente a longevidade das doses. A suplementação de colesterol ao diluidor tem sido proposta como estratégia para estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides, contribuindo para a manutenção de sua funcionalidade, uma vez que o processo de refrigeração promove alterações na organização lipídica da membrana. Nesse contexto, a manutenção da viabilidade espermática por até sete dias é de grande relevância, considerando a logística de distribuição semanal de doses em granjas comerciais. Foram utilizados três cachaaos provenientes da suinocultura da USP de Pirassununga, cujos ejaculados foram coletados em quatro ocasiões e diluídos em três diferentes meios: BotuSuiM (BM), sem adição de colesterol; BotuSuiL (BL), contendo colesterol; e um diluidor comercial (CT). A viabilidade espermática foi avaliada em três momentos: D0 (0 h), D3 (72 h) e D7 (168 h) após a coleta. Os parâmetros espermáticos foram analisados por citometria de fluxo, utilizando o equipamento BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), operado pelo software BD FACSDiva 6.0, com as sondas fluorescentes Hoechst 33342, iodeto de propídeo (IP) e FITC-PSA, permitindo a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal. Adicionalmente, parâmetros de motilidade espermática foram determinados por meio do sistema computadorizado SCA® (SCA Production Software v.5.4.0.0). O delineamento experimental adotado foi em blocos generalizados, com medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico incluiu os efeitos fixos de tratamento, tempo e a interação tratamento × tempo, sendo a autocorrelação entre medidas modelada por estrutura autorregressiva de primeira ordem (AR1). As análises foram conduzidas utilizando o procedimento GLIMMIX do software SAS (v. 9.4), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5%. Os resultados evidenciaram efeito significativo do tempo de armazenamento ( $P < 0,05$ ), com redução progressiva da qualidade espermática, observada tanto na motilidade total (TMOT: D0 =  $81,94 \pm 4,40$ ; D3 =  $73,13 \pm 3,17$ ; D7 =  $68,16 \pm 3,76$ ) quanto na integridade das membranas acrossomal e plasmática (AIMI: D0 =  $91,40 \pm 0,63$ ; D3 =  $87,51 \pm 1,34$ ; D7 =  $85,94 \pm 1,82$ ). Adicionalmente, foram observadas interações significativas entre tratamento e tempo ( $P < 0,05$ ) para Motilidade Progressiva (PMOT) – D0) BL= $59,77 \pm 10,60a$ , BM= $68,13 \pm 9,34a$ , CT= $72,38 \pm 3,37a$ ; D3) BL= $57,05 \pm 7,99a$ , BM= $31,84 \pm 5,73b$ , CT= $51,76 \pm 3,38ab$ ; D7) BL= $46,61 \pm 7,85a$ , BM= $23,05 \pm 6,25b$ , CT= $43,94 \pm 4,20ab$  e AIMI – D0) BL= $92,42 \pm 0,78a$ , BM= $91,95 \pm 1,14a$ , CT= $89,83 \pm 1,22a$ ; D3) BL= $91,47 \pm 1,22a$ , BM= $88,09 \pm 2,51ab$ , CT= $82,98 \pm 2,48b$ ; D7) BL= $90,92 \pm 1,25a$ , BM= $81,29 \pm 4,68b$ , CT= $85,61 \pm 1,98ab$ , indicando diferenças entre diluidores ao longo do período de armazenamento. De modo geral, o diluidor comercial (CT) apresentou melhor desempenho inicial nos parâmetros de motilidade; entretanto, o diluidor contendo colesterol (BL) demonstrou superioridade na manutenção da funcionalidade espermática ao longo do tempo. Esses achados sugerem que a presença de colesterol no diluidor pode contribuir para maior estabilidade de membrana, favorecendo a conservação da qualidade espermática durante o armazenamento refrigerado.

**Palavras-chave:** cachaaos, diluidores, motilidade, integridade de membrana.

**Autorizações legais:** CEUA FMVZ/USP Nº 8153120624; CEP/FMVZ USP: n. 5508-270

**Agradecimentos e financiadores:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2024/09891-0 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8).

## Effect of different diluents on sperm quality in boars

**Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>, Thais Eduarda da Silva Gomes<sup>1</sup>,  
 Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, José Antônio Dell'Aqua Jr<sup>2</sup>,  
 Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista

E-mail: luan\_mendes@usp.br

Boar refrigerated semen is widely used in artificial insemination programs in commercial swine production systems, accounting for more than 95% of inseminations performed in the country. To ensure the viability and quality of insemination doses, strict control of processing and storage is essential, from semen collection and dilution to its maintenance at 17 °C and subsequent use. Additionally, different extenders exhibit specific characteristics regarding their preservation capacity, directly influencing dose longevity. Cholesterol supplementation in extenders has been proposed as a strategy to stabilize the sperm plasma membrane, contributing to the maintenance of sperm functionality, since the cooling process induces changes in membrane lipid organization. In this context, maintaining sperm viability for up to seven days is highly relevant, considering the logistics of weekly semen dose distribution to commercial farms. Three boars from the swine production unit of the University of São Paulo (USP), Pirassununga campus, were used. Ejaculates were collected on four occasions and diluted in three different extenders: BotuSuiM (BM), without cholesterol supplementation; BotuSuiL (BL), supplemented with cholesterol; and a commercial extender (CT). Sperm viability was evaluated at three time points: D0 (0 h), D3 (72 h), and D7 (168 h) after collection. Sperm parameters were assessed by flow cytometry using a BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), operated with BD FACSDiva 6.0 software. Fluorescent probes Hoechst 33342, propidium iodide (PI), and FITC-PSA were used to simultaneously evaluate plasma and acrosomal membrane integrity. In addition, sperm motility parameters were analyzed using a computer-assisted sperm analysis system (SCA®; SCA Production Software v.5.4.0.0). The experimental design was a generalized block design with repeated measures over time. The statistical model included fixed effects of treatment, time, and the treatment × time interaction, with autocorrelation between repeated measures modeled using a first-order autoregressive covariance structure (AR1). Analyses were performed using the GLIMMIX procedure of SAS software (v. 9.4), and means were compared using Tukey's test, adopting a significance level of 5%. The results showed a significant effect of storage time ( $P < 0.05$ ), with a progressive decline in sperm quality, observed in both total motility (TMOT: D0 =  $81.94 \pm 4.40$ ; D3 =  $73.13 \pm 3.17$ ; D7 =  $68.16 \pm 3.76$ ) and acrosomal and plasma membrane integrity (AIMI: D0 =  $91.40 \pm 0.63$ ; D3 =  $87.51 \pm 1.34$ ; D7 =  $85.94 \pm 1.82$ ). Furthermore, significant treatment × time interactions ( $P < 0.05$ ) were observed for progressive motility (PMOT) – D0) BL= $59,77 \pm 10,60a$ , BM= $68,13 \pm 9,34a$ , CT= $72,38 \pm 3,37a$ ; D3) BL= $57,05 \pm 7,99a$ , BM= $31,84 \pm 5,73b$ , CT= $51,76 \pm 3,38ab$ ; D7) BL= $46,61 \pm 7,85a$ , BM= $23,05 \pm 6,25b$ , CT= $43,94 \pm 4,20ab$  and AIMI – D0) BL= $92,42 \pm 0,78a$ , BM= $91,95 \pm 1,14a$ , CT= $89,83 \pm 1,22a$ ; D3) BL= $91,47 \pm 1,22a$ , BM= $88,09 \pm 2,51ab$ , CT= $82,98 \pm 2,48b$ ; D7) BL= $90,92 \pm 1,25a$ , BM= $81,29 \pm 4,68b$ , CT= $85,61 \pm 1,98ab$ , indicating differences among extenders throughout the storage period. Overall, the commercial extender (CT) showed better initial performance in motility parameters; however, the cholesterol-supplemented extender (BL) demonstrated superior performance in maintaining sperm functionality over time. These findings suggest that the presence of cholesterol in the extender may enhance membrane stability, thereby improving sperm quality preservation during refrigerated storage.

**Keywords:** boar spermatozoa, diluents, motility, membrane integrity.

**Legal authorizations:** CEUA FMVZ/USP Nº 8153120624; CEP/FMVZ USP: n. 5508-270

**Acknowledgments and funders:** To the São Paulo Research Foundation (FAPESP-2024/09891-0) and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 310486/2023-8).

## Estratégias de bioinformática utilizadas para seleção de peptídeos antimicrobianos com potencial uso nas biotécnicas reprodutivas

Cristiana Baruel Terra<sup>1</sup>, Camila de Albuquerque Rocha<sup>1</sup>, Daylon Dahmer<sup>1</sup>, Ivan Cunha Bustamante Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Univates  
E-mail: cristiana.terra@universo.univates.br

A contaminação microbiana de gametas e embriões é um problema frequente em biotecnologias reprodutivas, apesar da adoção de boas práticas sanitárias e laboratoriais. O uso de antimicrobianos em diluentes e meios de cultura persiste, mas contribui para o desenvolvimento de resistência microbiana, com riscos à saúde animal e humana. Substâncias alternativas, como peptídeos e fitoextratos, têm sido testadas, mas nenhuma se mostrou viável até o momento. O presente estudo propõe o uso de ferramentas de bioinformática e biologia molecular para prospectar, produzir e validar novos peptídeos antimicrobianos em meios de preservação de gametas e embriões de suínos e bovinos. Para obter peptídeos antimicrobianos (PAMs) candidatos, foram consultadas as bases de dados CAMPR4 e DRAMP 3.0, que fornecem informações sobre sequências naturais ou sintéticas, incluindo características como carga, hidrofobicidade e propriedades físico-químicas, além de ferramentas de triagem. A triagem focou em peptídeos com atividade contra bactérias contaminantes comuns em gametas e embriões bovinos e suínos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* e *Mycoplasma spp.* Foram selecionados PAMs cujo mecanismo de ação envolva interação com lipídios de membrana específicos, como lipopolissacarídeo (LPS), fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL). A partir das triagens, analisaram-se os motivos estruturais mais recorrentes com potencial antimicrobiano usando ferramentas *in silico*, e a ferramenta de *machine learning* "Rational design" do servidor CAMPR4 foi aplicada para realizar substituições de aminoácidos nas sequências dos peptídeos candidatos. Os algoritmos então previram a atividade antimicrobiana dos peptídeos resultantes utilizando modelos como *Random Forest*, *Support Vector Machine* e *Artificial Neural Network*. Dois PAMs foram selecionados (A11 e PMAP-37), os quais foram submetidos a alterações estruturais pontuais visando aumentar seu potencial antimicrobiano. Das diversas alterações testadas, três variantes do PAM A11 e quatro variantes do PMAP-37 foram selecionadas. Estas foram escolhidas com base nos resultados de energia de ligação ( $\Delta G_{transfer}$ ), que indica a força de ligação à membrana plasmática microbiana, além da avaliação *in silico* por modelagem molecular da adesão dos PAMs selecionados sob o ponto de vista estrutural. Estão em andamento os testes *in vitro* de avaliação e validação para a atividade antimicrobiana predita *in silico*. O uso de ferramentas de bioinformática permite acelerar a avaliação de sequências de peptídeos, testar alterações sequenciais e novas construções peptídicas, otimizando e reduzindo custos em testes subsequentes de validação. A identificação de novos PAMs poderá viabilizar a redução ou substituição do uso de fármacos antimicrobianos em meios de preservação e cultivo de gametas e embriões.

**Palavras-chave:** peptídeos antimicrobianos, bioinformática, resistência antimicrobiana, aprendizagem de máquina.

**Autorizações legais:** CEUA-Univates nº42/2024

**Agradecimentos e financiadores:** Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Termos de outorga: 24/2551-0001169-2

## Use of bioinformatics and machine learning tools for the development of novel antimicrobial peptides in reproductive biotechnologies

Cristiana Baruel Terra<sup>1</sup>, Camila de Albuquerque Rocha<sup>1</sup>, Daylon Dahmer<sup>1</sup>, Ivan Cunha Bustamante Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Univates  
E-mail: cristiana.terra@universo.univates.br

Microbial contamination of gametes and embryos remains a frequent challenge in reproductive biotechnologies, even with the adoption of sound sanitary and laboratory practices. The use of antimicrobials in extenders and culture media persists but contributes to the development of microbial resistance, posing risks to animal and human health. Alternative substances, such as peptides and phytoextracts, have been tested, but none have proven feasible to date. This study proposes the use of bioinformatics and molecular biology tools to prospect, produce, and validate novel antimicrobial peptides in preservation media for swine and bovine gametes and embryos. To obtain candidate antimicrobial peptides (AMPs), the CAMPR4 and DRAMP 3.0 databases were consulted, which provide information on natural or synthetic sequences, including characteristics such as charge, hydrophobicity, and physicochemical properties, as well as screening tools. Screening focused on peptides with activity against common contaminating bacteria in bovine and swine gametes and embryos, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, and *Mycoplasma spp.* AMP candidates were selected based on mechanisms of action involving interaction with specific membrane lipids, including lipopolysaccharide (LPS), phosphatidylglycerol (PG), and cardiolipin (CL). From the screenings, the most recurrent structural motifs with antimicrobial potential were analyzed using in silico tools, and the machine learning tool “Rational design” from the CAMPR4 server was applied to perform amino acid substitutions in the candidate peptide sequences. Algorithms then predicted the antimicrobial activity of the resulting peptides using models such as Random Forest, Support Vector Machine, and Artificial Neural Network. Two AMPs were selected (A11 and PMAP-37), which underwent site-directed structural modifications to enhance their antimicrobial potential. Among the various modifications tested, three variants of AMP A11 and four variants of PMAP-37 were selected. These were chosen based on binding energy ( $\Delta G$  transfer) results, which indicate the strength of binding to the microbial plasma membrane, as well as in silico molecular modeling assessment of the adhesion of the selected AMPs from a structural perspective. In vitro tests for evaluation and validation of the predicted in silico antimicrobial activity are ongoing. The use of bioinformatics tools enables accelerated assessment of peptide sequences, testing of sequence alterations, and novel peptide constructs, optimizing and reducing costs in subsequent validation tests. The identification of new AMPs may enable the reduction or replacement of antimicrobial drugs in preservation and culture media for gametes and embryos.

**Keywords:** antimicrobial peptides, bioinformatics, antimicrobial resistance, machine learning.

**Legal authorizations:** Project approved by the CEUA-Univates (Animal Use Ethics Committee of Univates) under protocol No. 42/2024.

**Acknowledgments and funders:** Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), Grant: 24/2551-0001169-2.

## Holding time não altera o fenótipo de congelabilidade em ejaculados suínos

**Ana Carolina Pedrosa<sup>1</sup>, Leriana Garcia Reis<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Christina Ramires Ferreira<sup>2</sup>,  
Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>3</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, <sup>2</sup>Universidade de Purdue, <sup>3</sup>Ápis Serviços Veterinários  
E-mail: pedrosa\_carolina@usp.br

A criopreservação do sêmen suíno permanece limitada pela acentuada variabilidade interejaculados na resposta à congelação. Essa variabilidade reflete diferenças biológicas intrínsecas. O armazenamento prévio do ejaculado a 17 °C por 24 h (holding time, HT) tem sido associado à melhora da qualidade espermática pós-descongelação. No entanto, permanece incerto se esse efeito altera a congelabilidade ou apenas otimiza ejaculados biologicamente competentes. O presente estudo testou a hipótese de que o HT atua de forma dependente do fenótipo estrutural do ejaculado, sem modificar sua congelabilidade intrínseca. Foram avaliados 27 ejaculados provenientes de 27 machos, sendo cada ejaculado considerado unidade experimental. O efeito de macho não foi avaliado separadamente. Cada ejaculado foi dividido e criopreservado imediatamente (0 h) ou após 24 h de HT. A congelabilidade foi determinada com base na redução percentual da qualidade espermática (%RSQ), calculada entre o sêmen in natura e o pós-descongelação após 24 h de HT, integrando motilidade total e integridade de membrana plasmática. Após classificação, 10 ejaculados foram selecionados, sendo 5 bons (GEF) e 5 maus congeladores (PEF). O %RSQ foi menor nos GEF (56,03 ± 2,93%) em comparação aos PEF (68,24 ± 2,26%). Foram avaliados parâmetros funcionais pós-descongelação, incluindo motilidade, integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, peroxidação lipídica e fluidez de membrana. O HT promoveu melhora significativa desses parâmetros apenas nos ejaculados GEF ( $p < 0,05$ ). Os ejaculados PEF mantiveram desempenho inferior, independentemente do tratamento. A hierarquia entre ejaculados foi mantida após o HT, indicando ausência de conversão fenotípica. A análise lipidômica identificou 350 espécies lipídicas no plasma seminal e 191 nos espermatozoides. No plasma seminal, as principais classes incluíram LPS/PS (73 espécies; 20,9%), triacilgliceróis (73; 20,9%), LPC/PC (45; 12,9%), LPG/PG (39; 11,1%), ácidos graxos livres (35; 10,0%) e acilcarnitinas (32; 9,1%). Nos espermatozoides, destacaram-se fosfatidilserinas (30; 15,7%), triacilgliceróis (30; 15,7%), ácidos graxos livres (30; 15,7%), acilcarnitinas (29; 15,2%) e fosfatidilcolinas (26; 13,6%). Ejaculados GEF apresentaram maior abundância relativa de lipídios estruturais de membrana, incluindo fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas e ésteres de colesterol. Em contraste, ejaculados PEF apresentaram maior proporção de lipídios associados à instabilidade, como ácidos graxos livres e triacilgliceróis. O HT induziu remodelamento lipídico coordenado predominantemente nos GEF, incluindo aumento de acilcarnitinas de cadeia longa ( $\geq 18$  carbonos) no plasma seminal e enriquecimento de fosfolipídios estruturais nos espermatozoides. Em contraste, os PEF apresentaram baixa responsividade e maior heterogeneidade lipídica. Diante do exposto, conclui-se que a congelabilidade é uma propriedade intrínseca do ejaculado, associada à organização e plasticidade da arquitetura lipídica da membrana espermática. O HT atua como modulador dependente dessa competência, sem reverter fenótipos estruturalmente desfavoráveis.

**Palavras-chave:** criopreservação, congelabilidade, holding time, lipidômica, membrana espermática.

**Autorizações legais:** não aplicável.

**Agradecimentos e financiadores:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2016/24690-4 e 2024/09891-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-001)

## Holding time does not modify the freezability phenotype in boar ejaculates

**Ana Carolina Pedrosa<sup>1</sup>, Leriana Garcia Reis<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Christina Ramires Ferreira<sup>2</sup>,  
 Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>3</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, <sup>2</sup>Universidade de Purdue, <sup>3</sup>Ápis Serviços Veterinários  
 e-mail: pedrosa\_carolina@usp.br

Swine semen cryopreservation remains limited by pronounced inter-ejaculate variability in response to freezing. This variability reflects intrinsic biological differences. Pre-storage of ejaculates at 17 °C for 24 h (holding time, HT) has been associated with improved post-thaw sperm quality. However, it remains unclear whether this effect alters freezability or merely optimizes biologically competent ejaculates. The present study tested the hypothesis that HT acts in a phenotype-dependent manner at the ejaculate level, without modifying intrinsic freezability. A total of 27 ejaculates from 27 males were evaluated, with each ejaculate considered an independent experimental unit. The male effect was not assessed separately. Each ejaculate was split and cryopreserved either immediately (0 h) or after 24 h of HT. Freezability was determined based on the percentage reduction in sperm quality (%RSQ), calculated between fresh semen and post-thaw samples after 24 h of HT, integrating total motility and plasma membrane integrity. After classification, 10 ejaculates were selected, comprising 5 good (GEF) and 5 poor freezers (PEF). The %RSQ was lower in GEF (56.03 ± 2.93%) compared to PEF (68.24 ± 2.26%). Post-thaw functional parameters were evaluated, including sperm motility, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and membrane fluidity. HT significantly improved these parameters only in GEF ejaculates (p<0.05), whereas PEF ejaculates maintained inferior performance regardless of treatment. The hierarchical ranking among ejaculates was preserved after HT, indicating the absence of phenotypic conversion. Lipidomic analysis identified 350 lipid species in seminal plasma and 191 in spermatozoa. In seminal plasma, the main classes included LPS/PS (73 species; 20.9%), triacylglycerols (73; 20.9%), LPC/PC (45; 12.9%), LPG/PG (39; 11.1%), free fatty acids (35; 10.0%), and acyl-carnitines (32; 9.1%). In spermatozoa, the predominant classes were phosphatidylserines (30; 15.7%), triacylglycerols (30; 15.7%), free fatty acids (30; 15.7%), acyl-carnitines (29; 15.2%), and phosphatidylcholines (26; 13.6%). GEF ejaculates exhibited a higher relative abundance of membrane-structural lipids, including phosphatidylserines, phosphatidylethanolamines, sphingomyelins, and cholesterol esters. In contrast, PEF ejaculates showed a higher proportion of lipids associated with membrane instability, such as free fatty acids and triacylglycerols. HT induced coordinated lipid remodeling predominantly in GEF ejaculates, including an increase in long-chain acyl-carnitines (≥18 carbons) in seminal plasma and enrichment of structural phospholipids in spermatozoa. In contrast, PEF ejaculates exhibited low responsiveness and greater lipidomic heterogeneity. In conclusion, freezability is an intrinsic property of the ejaculate, associated with the organization and plasticity of sperm membrane lipid architecture. Holding time acts as a modulator dependent on this intrinsic competence, without reversing structurally unfavorable phenotypes.

**Keywords:** cryopreservation, freezability, holding time, lipidomics, sperm membrane.

**Legal authorizations:** no applicable.

**Acknowledgments and funders:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2016/24690-4 e 2024/09891-0) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-001)

## Impacto do Uso de Diferentes Diluidores de Refrigeração sobre o Período de Holding Time durante a Criopreservação de Sêmen Suíno

**Lucas Augusto Iizuka de Sousa<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>, Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, Thais Eduarda da Silva Gomes<sup>1</sup>, Maria Eduarda Zambelli Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Felipe Cardozo de Oliveira<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
 E-mail: lucasiizuka24@usp.br

A criopreservação do sêmen é uma das principais biotecnologias aplicadas à reprodução animal. Contudo, em suínos, sua aplicação prática ainda é limitada devido à elevada sensibilidade dos espermatozoides. A etapa de holding time (HT), caracterizada pelo período de estabilização do sêmen diluído a 17°C por 24 horas, tem se mostrado fundamental para aumentar a criotolerância espermática. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso de diferentes diluidores sobre o período de HT na criopreservação do sêmen suíno. Para isso, foi adotado um delineamento experimental em blocos generalizados (fatorial 3×3): diluidor utilizado: Androstar® Plus (A) - controle, Duragem® (D) e Vitasem® (V); e momento da análise: antes do HT (I), depois do HT (II) e depois da descongelação (III). Foram utilizados ejaculados de três cachos de linhagens híbridas comerciais, com coletas semanais ao longo de quatro semanas (n=12). As amostras foram submetidas ao protocolo de criopreservação: coleta da fração rica do ejaculado, diluição nos meios de interesse, centrifugação, diluição em meios de congelamento, envase em palhetas, congelamento em curva controlada de variação da temperatura, armazenamento em nitrogênio líquido e posterior descongelamento. Foram feitas análises de motilidade pelo sistema SCA® (v.5.4.0.0), morfologia e defeitos espermáticos por microscópio DIC, e integridade de membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo (BD FACSAria, software BD FACSDiva 6.0), com o uso das sondas Hoechst 3342 (40 µg/mL), Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL) e FITC-PSA (100 µg/mL). As variáveis foram analisadas por meio de modelos lineares generalizados mistos, utilizando o procedimento GLIMMIX do software SAS (v. 9.4), o modelo estatístico incluiu o efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de animal e animal aninhado em coleta, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Como resultados, obteve-se alterações estatisticamente significativas (P<0,05) para parâmetros como: ALH: (A/I:2,90±0,29a); (D/I:2,56±0,35b); (V/I:2,44±0,30b); (A/II:3,36±0,25a); (D/II:2,54±0,15b); (V/II:2,37±0,14b); (A/III:2,09±0,22); (D/III:1,57±0,19); (V/III:2,00±0,30), STR: (A/I:36,45±2,47b); (D/I:43,18±3,34a); (V/I:45,45±3,02a); (A/II:30,08±1,47b); (D/II:34,95±2,01a); (V/II:37,08±2,84a); (A/III:20,18±1,15); (D/III:19,47±1,26); (V/III:20,55±1,3), VCL: (A/I:54,51±8,20); (D/I:53,55±8,14); (V/I:50,60±7,29); (A/II:64,52±7,15a); (D/II:52,21±4,49b); (V/II:45,91±3,14b); (A/III:23,87±2,38); (D/III:19,97±1,14); (V/III:21,45±2,0), BCF: (A/I:6,85±0,28); (D/I:6,88±0,26); (V/I:7,07±0,18); (A/II:7,23±0,23); (D/II:7,14±0,29); (V/II:7,04±0,26); (A/III:4,00±0,63a); (D/III:3,55±0,67b); (V/III:3,92±0,75a), defeitos de colo: (A/I:0,42±0,12); (D/I:0,71±0,14); (V/I:0,67±0,33); (A/II:0,04±0,04b); (D/II:0,46±0,21a); (V/II:0,25±0,11ab); (A/III:0,29±0,07c); (D/III:0,71±0,30a); (V/III:0,54±0,18b) e AIML = acrossoma íntegro e membrana lesionada: (A/III:3,51±1,17b); (D/III:2,55±1,50b); (V/III:6,07±1,84a). Em contrapartida, não foram observadas alterações relevantes em TMOT = móveis: (A/I:83,51±3,85); (D/I:87,78±3,32); (V/I:86,58±3,32); (A/II:85,90±2,80); (D/II:87,25±2,97); (V/II:84,30±3,07); (A/III:9,92±1,54); (D/III:7,41±0,65); (V/III:8,62±1,22), PMOT = móveis progressivos: (A/I:56,99±8,59); (D/I:62,50±7,50); (V/I:60,78±7,14); (A/II:63,15±6,42); (D/II:63,03±6,54); (V/II:55,82±5,66); (A/III:2,49±0,86); (D/III:0,93±0,21); (V/III:1,59±0,46) e AIMI = acrossoma íntegro e membrana íntegra: (A/III:0,97±0,081); (D/III:1,49±1,24); (V/III:1,18±0,63). De maneira geral, os índices de qualidade espermática após a descongelação foram reduzidos em todos os tratamentos, o que limitou a detecção de diferenças consistentes entre eles. A fim de aprimorar a robustez dos dados e possibilitar conclusões mais assertivas, estudos adicionais, incluindo a repetição do experimento, são necessários para esclarecer de forma definitiva a influência dos diluidores sobre a qualidade espermática durante a criopreservação.

**Palavras-chave:** criopreservação, holding time, suíno, diluidores, avaliação espermática

**Autorizações legais:** CEUA / FMVZ - USP. Número do protocolo: 2833100625; CEP: 05508-270 / FMVZ / USP: n. de protocolo: 2025-1598 (termo de adesão). Termos de outorga - CNPq-Pibic número: 139711/2025-2.

**Agradecimentos e financiadores:** Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2024/09891-0, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8)

## Impact of Different Cooling Extenders on the Holding Time Period during Boar Semen Cryopreservation

**Lucas Augusto Iizuka de Sousa<sup>1</sup>, Henricco Zapparoli<sup>1</sup>, Luan Mendes de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>, Isadora Ribeiro De Martino<sup>1</sup>, Gabrielle Souza Primo<sup>1</sup>, Thais Eduarda da Silva Gomes<sup>1</sup>, Maria Eduarda Zambelli Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Felipe Cardozo de Oliveira<sup>1</sup>, Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo  
E-mail: lucasiizuka24@usp.br

Semen cryopreservation is one of the main biotechnologies applied to animal reproduction. However, in swine, its practical application remains limited due to the high sensitivity of spermatozoa. The holding time (HT) stage, characterized by a stabilization period of diluted semen at 17°C for 24 hours, has been shown to be essential for increasing sperm cryotolerance. This study aimed to evaluate the effect of different extenders on the HT period in swine semen cryopreservation. A generalized block experimental design (3×3 factorial) was adopted: extender used: Androstar® Plus (A) - control, Duragem® (D), and VitaseM® (V); and time of analysis: before HT (I), after HT (II), and after thawing (III). Ejaculates from three commercial hybrid boars were used, with weekly collections over four weeks (n=12). Samples were subjected to the cryopreservation protocol: collection of the sperm-rich fraction, dilution in the respective extenders, centrifugation, dilution in freezing media, packaging into straws, freezing under a controlled temperature curve, storage in liquid nitrogen, and subsequent thawing. Motility was analyzed using the SCA® system (v.5.4.0.0), morphology and sperm defects were assessed by DIC microscopy, and plasma and acrosomal membrane integrity were evaluated by flow cytometry (BD FACSAria, BD FACSDiva 6.0 software), using Hoechst 3342 (40 µg/mL), Propidium Iodide (0.5 mg/mL), and FITC-PSA (100 µg/mL). Variables were analyzed using generalized linear mixed models with the GLIMMIX procedure (SAS v. 9.4), including treatment as a fixed effect and animal and animal nested within collection as random effects; means were compared using Tukey's test. As results, statistically significant differences (P<0.05) were observed for parameters such as: ALH: (A/I:2,90±0,29a); (D/I:2,56±0,35b); (V/I:2,44±0,30b); (A/II:3,36±0,25a); (D/II:2,54±0,15b); (V/II:2,37±0,14b); (A/III:2,09±0,22); (D/III:1,57±0,19); (V/III:2,00±0,30); STR: (A/I:36,45±2,47b); (D/I:43,18±3,34a); (V/I:45,45±3,02a); (A/II:30,08±1,47b); (D/II:34,95±2,01a); (V/II:37,08±2,84a); (A/III:20,18±1,15); (D/III:19,47±1,26); (V/III:20,55±1,3); VCL: (A/I:54,51±8,20); (D/I:53,55±8,14); (V/I:50,60±7,29); (A/II:64,52±7,15a); (D/II:52,21±4,49b); (V/II:45,91±3,14b); (A/III:23,87±2,38); (D/III:19,97±1,14); (V/III:21,45±2,0); BCF: (A/I:6,85±0,28); (D/I:6,88±0,26); (V/I:7,07±0,18); (A/II:7,23±0,23); (D/II:7,14±0,29); (V/II:7,04±0,26); (A/III:4,00±0,63a); (D/III:3,55±0,67b); (V/III:3,92±0,75a); neck defects: (A/I:0,42±0,12); (D/I:0,71±0,14); (V/I:0,67±0,33); (A/II:0,04±0,04b); (D/II:0,46±0,21a); (V/II:0,25±0,11ab); (A/III:0,29±0,07c); (D/III:0,71±0,30a); (V/III:0,54±0,18b); and AIML (intact acrosome and damaged membrane): (A/III:3,51±1,17b); (D/III:2,55±1,50b); (V/III:6,07±1,84a). In contrast, no relevant differences were observed for TMOT (total motility): (A/I:83,51±3,85); (D/I:87,78±3,32); (V/I:86,58±3,32); (A/II:85,90±2,80); (D/II:87,25±2,97); (V/II:84,30±3,07); (A/III:9,92±1,54); (D/III:7,41±0,65); (V/III:8,62±1,22); PMOT (progressive motility): (A/I:56,99±8,59); (D/I:62,50±7,50); (V/I:60,78±7,14); (A/II:63,15±6,42); (D/II:63,03±6,54); (V/II:55,82±5,66); (A/III:2,49±0,86); (D/III:0,93±0,21); (V/III:1,59±0,46); and AIMI (intact acrosome and intact membrane): (A/III:0,97±0,81); (D/III:1,49±1,24); (V/III:1,18±0,63). Overall, sperm quality indices after thawing were reduced across all treatments, which limited the detection of consistent differences between them. In order to improve data robustness and enable more reliable conclusions, further studies, including repetition of the experiment, are required to definitively clarify the influence of extenders on sperm quality during cryopreservation.

**Keywords:** cryopreservation, holding time, boar semen, extenders, sperm quality.

**Legal authorizations:** CEUA / FMVZ – USP. Protocol no.: 2833100625; CEP: 05508-270 / FMVZ / USP: Protocol no.: 2025-1598 (adhesion term). Grant terms under CNPq-PIBIC number: 139711/2025-2.

**Acknowledgments and funders:** The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2024/09891-0), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 310486/2023-8).

## Influência do Dinoprost-Trometamina nos parâmetros seminais de cachaços submetidos à coleta manual ou semiautomática de sêmen

Luciano Bianco do Amaral<sup>1</sup>, Eder Batalha Araujo<sup>2</sup>, Pedro Nacib Jorge-Neto<sup>3</sup>, Dominike Prediger Delazeri<sup>1</sup>, Janine de Camargo<sup>1</sup>, Mariana Groke Marques<sup>4</sup>, **Ricardo Zanella<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de Passo Fundo, <sup>2</sup>Topigs Norsvin, <sup>3</sup>Instituto Reprocon, <sup>4</sup>Embrapa Suínos e Aves  
 E-mail: 107145@upf.br

A qualidade do sêmen é determinante para a eficiência dos programas de inseminação artificial na suinocultura, sendo influenciada por fatores como método de coleta, linhagem genética, intervalo entre coletas e uso de moduladores fisiológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de dinoprost-trometamina (análogo da  $PGF_{2\alpha}$ ), do método de coleta (manual ou semiautomático), da linhagem genética e do intervalo entre coletas sobre parâmetros seminais de cachaços em condições comerciais. Foram avaliados 653 machos das linhagens Large White, Landrace, Duroc e híbridos, totalizando 22.977 coletas ao longo de 12 meses. O delineamento foi longitudinal retrospectivo. Os dados foram analisados por modelos mistos, ANOVA fatorial, teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e análise de regressão, considerando como efeitos o método de coleta, o uso de dinoprost, a linhagem genética e suas interações. A coleta semiautomática resultou em maior volume de ejaculado ( $447 \pm 8,3$  mL; média  $\pm$  erro padrão da média) e maior motilidade espermática ( $87,6 \pm 0,5\%$ ), enquanto a coleta manual apresentou maior concentração espermática ( $203 \pm 7,9$  milhões/mL) ( $P < 0,05$ ). A administração de dinoprost aumentou a motilidade ( $87,3 \pm 0,5\%$ ) e a concentração espermática ( $205 \pm 7,9$  milhões/mL), porém reduziu o volume do ejaculado ( $411 \pm 8,3$  mL) ( $P < 0,05$ ). Observou-se interação significativa entre método de coleta e linhagem genética, indicando respostas específicas por raça. Cachaços híbridos apresentaram aumento da motilidade com o uso de dinoprost. A análise de regressão indicou efeito positivo do intervalo entre coletas sobre a concentração espermática, com incremento de 3,49 milhões/mL por dia adicional de descanso ( $P < 0,05$ ;  $R^2 = 0,04$ ). Não foram observados efeitos significativos do intervalo sobre volume e motilidade ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que o método de coleta, o uso de dinoprost-trometamina, a linhagem genética e o intervalo entre coletas influenciam significativamente a qualidade seminal de cachaços. A coleta semiautomática melhora volume e motilidade, enquanto a coleta manual favorece maior concentração espermática. O uso de dinoprost promove ganhos em motilidade e concentração, com respostas dependentes da linhagem. A adoção de protocolos ajustados a esses fatores pode otimizar a produção de doses inseminantes e aumentar a eficiência reprodutiva em centrais de inseminação.

**Palavras-chave:** dinoprost, sêmen, cachaços.

**Autorizações legais:** CEUA/UPF 005/2023

**Agradecimentos e financiadores:** Os autores agradecem à ACSURS e à Topigs Norsvin pelo apoio e a IMV Technologies. RZ recebeu bolsa de pesquisa do CNPq (Processo: 301636/2022-2).

## Influence of Dinoprost-Tromethamine on Seminal Parameters of Boars Subjected to Manual or Semi-Automatic Semen Collection

**Luciano Bianco do Amaral<sup>1</sup>, Eder Batalha Araujo<sup>2</sup>, Pedro Nacib Jorge-Neto<sup>3</sup>, Dominike Prediger Delazeri<sup>1</sup>, Janine de Camargo<sup>1</sup>, Mariana Groke Marques<sup>4</sup>, Ricardo Zanella<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade de Passo Fundo, <sup>2</sup>Topigs Norsvin, <sup>3</sup>Instituto Reprocon, <sup>4</sup>Embrapa Suínos e Aves  
E-mail: 107145@upf.br

Semen quality is a key determinant of the success of artificial insemination programs in swine production and is influenced by factors such as collection method, genetic background, collection interval, and the use of physiological modulators. This study aimed to evaluate the effects of dinoprost-tromethamine (a prostaglandin F<sub>2α</sub> analogue), collection method (manual or semi-automatic), genetic line, and collection interval on boar semen quality under commercial conditions. A total of 653 boars from four genetic lines (Large White, Landrace, Duroc, and Hybrid) were evaluated over a 12-month period, resulting in 22,977 semen collections. A retrospective longitudinal design was used. Data were analyzed using mixed models, factorial ANOVA, Tukey's test ( $P < 0.05$ ), and regression analysis, considering collection method, dinoprost administration, genetic line, and their interactions. Semi-automatic collection resulted in higher ejaculate volume ( $447 \pm 8.3$  mL) and sperm motility ( $87.6 \pm 0.5\%$ ), whereas manual collection yielded higher sperm concentration ( $203 \pm 7.9$  million/mL) ( $P < 0.05$ ). Dinoprost administration increased sperm motility ( $87.3 \pm 0.5\%$ ) and concentration ( $205 \pm 7.9$  million/mL), but reduced ejaculate volume ( $411 \pm 8.3$  mL) ( $P < 0.05$ ). Significant interactions between collection method and genetic line were observed, indicating breed-specific responses. Hybrid boars showed increased sperm motility following dinoprost administration. Regression analysis indicated a positive effect of collection interval on sperm concentration, with an increase of 3.49 million/mL per additional day of rest ( $P < 0.05$ ;  $R^2 = 0.04$ ), although the low coefficient of determination indicates high variability and influence of other factors. No significant regression effects were observed for ejaculate volume or motility ( $P > 0.05$ ). In conclusion, semen collection method, dinoprost-tromethamine administration, genetic line, and collection interval significantly influence boar semen quality. Semi-automatic collection improves ejaculate volume and motility, while manual collection favors higher sperm concentration. Dinoprost enhances sperm motility and concentration in a breed-dependent manner. Adjusting collection protocols according to these factors may optimize semen dose production and improve reproductive efficiency in commercial boar studs.

**Keywords:** dinoprost, boars, semen collection.

**Legal authorizations:** Animal Ethics Committee (CEUA) UPF under protocol number 005/2023

**Acknowledgments and funders:** The authors acknowledge ACSURS and Topigs Norsvin for their support and IMV Technologies. RZ received a research fellow from CNPq Process: 301636/2022-2.