

Efeito da rediluição pós-descongelamento sobre a qualidade espermática de garanhões: uma abordagem experimental

Effect of post-thaw redilution on stallion sperm quality: an experimental approach

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

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMV/UFRPE), Recife, PE, Brasil

²Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil

³German Standard Group, Dubai, UA, ⁴MK Arabians Stud, Ajman, UAE

*E-mail: gustavo.ferrer@ufrpe.br

Resumo

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado é uma ferramenta estratégica para o melhoramento genético em equinos, porém a criopreservação pode comprometer a viabilidade e a funcionalidade espermática devido a danos estruturais e estresse oxidativo. Nesse contexto, a rediluição pós-descongelamento tem sido proposta para reduzir a toxicidade dos crioprotetores e favorecer a recuperação celular. Este estudo avaliou o efeito da rediluição pós-descongelamento sobre parâmetros espermáticos de garanhões Quarto de Milha. Amostras de três garanhões, criopreservadas em palhetas de 0,5 mL, foram descongeladas a 37 °C/30 s e avaliadas sem rediluição (G1) ou após rediluição em diluente à base de leite desnatado (G2) ou extensor de longo prazo (G3), sob duas temperaturas (5 °C e 17 °C) por até 72 h. A motilidade e a cinemática espermática foram avaliadas por CASA, e a integridade das membranas plasmática (CFDA/PI) e acrossomal (PNA-FITC/PI) por microscopia de epifluorescência. A rediluição influenciou principalmente a funcionalidade espermática, sem alterações significativas na integridade estrutural. O G3 apresentou melhor desempenho cinemático. Assim, os resultados indicam que a rediluição pós-descongelamento, especialmente com extensores de longo prazo, pode melhorar a dinâmica e a longevidade espermática e pode auxiliar na otimização de protocolos de IA com sêmen congelado em equinos.

Palavras-chave: equino, sêmen, criopreservação, extensores seminais, longevidade espermática

Abstract

Artificial insemination (AI) with frozen semen is a strategic tool for genetic improvement in the equine species; however, cryopreservation may compromise sperm viability and functionality due to structural damage and oxidative stress. In this context, post-thaw redilution has been proposed as a strategy to reduce the residual toxicity of cryoprotectants and promote the recovery of cellular quality. This study evaluated the effect of post-thaw redilution on sperm parameters of frozen semen from Quarter Horse stallions. Samples from three stallions, cryopreserved in 0.5 mL straws, were thawed at 37 °C for 30 s and evaluated without redilution (G1) or after redilution in a skim milk-based extender (G2) or a long-term extender (G3), under two storage temperatures (5 °C and 17 °C) and post-thaw periods of up to 72 h. Sperm motility and kinematic parameters were assessed using a CASA system, while plasma membrane (CFDA/PI) and acrosomal membrane (PNA-FITC/PI) integrity were evaluated by epifluorescence microscopy. Redilution mainly influenced sperm functionality, with no significant changes in the structural integrity of the cells. The long-term extender (G3) showed superior performance in kinematic parameters compared with the other groups. Overall, the results indicate that post-thaw redilution, particularly when associated with long-term extenders, may improve sperm dynamics and longevity, representing a promising strategy to optimize AI protocols using frozen semen in equine reproduction.

Keywords: equine; semen; cryopreservation; semen extenders, sperm longevity.

Introdução

As biotécnicas de reprodução assistida na espécie equina desempenham papel estratégico ao promover o melhoramento genético, aumentar a eficiência reprodutiva e ampliar a difusão de material genético superior (Alvarenga et al., 2016).

Dentre essas biotécnicas, a criopreservação de sêmen equino destaca-se, pois permite o armazenamento de espermatozoides a temperaturas ultrabaixas por longos períodos e viabiliza o comércio internacional de material genético. Entretanto, os processos de congelamento e descongelamento submetem os espermatozoides a estresses físicos, químicos e osmóticos que podem comprometer sua viabilidade e funcionalidade. Durante essas etapas, ocorrem alterações estruturais e bioquímicas relevantes, incluindo formação de cristais de gelo, desorganização da bicamada lipídica, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), danos mitocondriais e alterações na permeabilidade da membrana plasmática (Wang et al., 2014; Amidi et al., 2016). Esses eventos resultam na redução da motilidade espermática, aumento da proporção de células inviáveis e diminuição da capacidade fertilizante, impactando diretamente as taxas de prenhez obtidas com sêmen equino congelado (Loomis e Graham, 2008).

Entretanto, é importante destacar que a fertilidade é um fenômeno multifatorial, influenciado não apenas pela qualidade espermática pós-descongelamento, mas também por fatores relacionados ao processamento seminal, ao manejo reprodutivo dos garanhões e à variabilidade individual entre reprodutores (Ball, 2008; Peña et al., 2011; Al-Kass e Morrell, 2024; Morris, Hartveld e Gibb, 2024).

Diante das limitações em relação à utilização do sêmen congelado, diversas estratégias têm sido investigadas com o objetivo de mitigar os danos celulares e preservar a funcionalidade espermática após o descongelamento. Entre elas destaca-se a manipulação das condições de armazenamento e do processamento pós-descongelamento do sêmen. Estudos demonstram que a motilidade espermática e a estabilidade da membrana dos espermatozoides podem ser mantidas em níveis satisfatórios após o descongelamento quando o sêmen é armazenado sob refrigeração controlada (Cuervo- Arango et al., 2015).

Adicionalmente, diferentes diluentes têm sido utilizados, formulados com substâncias crioprotetoras (como glicerol e amidas), antioxidantes e fontes energéticas. Embora tradicionalmente empregados durante o processamento seminal, seu uso também tem sido investigado na etapa pós-descongelamento, por meio da rediluição. Essa técnica consiste na adição de diluentes imediatamente após o descongelamento, com o objetivo de reduzir a toxicidade residual dos crioprotetores e favorecer a recuperação da funcionalidade espermática. Estudos com bovinos e asininos apontam efeitos positivos dessa prática sobre a motilidade e integridade das membranas, entretanto sua aplicação em equinos ainda é pouco explorada (Zimmerman et al., 2009; Figueira, 2018; Bustani, Baice, 2021; Lagares et al., 2022).

Nesse contexto, abordagens complementares têm sido propostas, como o uso de sistemas de armazenamento líquido em temperatura ambiente, baseados em meios livres de proteína. Esses sistemas demonstram potencial para aumentar a longevidade de espermatozoides previamente congelados e descongelados, ao reduzir os efeitos deletérios do estresse térmico e oxidativo (Clulow e Gibb, 2022).

Diante disso, a investigação de novos compostos ou aditivos capazes de melhorar a qualidade espermática após o descongelamento representa uma abordagem promissora para otimizar a taxa de prenhez em equinos. Portanto, considerando os avanços na criobiologia espermática e a necessidade de protocolos otimizados para inseminação artificial em equinos com sêmen congelado, o presente estudo avaliou os efeitos da adição de diferentes diluentes e proporções de rediluição sobre a qualidade do sêmen equino imediatamente após o descongelamento visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes aplicáveis à reprodução equina.

Material e Métodos

Aspectos éticos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob condições laboratoriais controladas de temperatura, umidade e assepsia. Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de três garanhões da raça Quarto de Milha, fornecidas pela Central Monte Verde (Registro MAPA PE 000263-1). Todos os procedimentos foram realizados por equipe treinada, com equipamentos calibrados e ambiente climatizado (22–25 °C).

Descongelamento e tratamentos experimentais

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 s. Após homogeneização, o sêmen foi distribuído entre os tratamentos experimentais: grupo controle sem rediluição (G1), rediluição em diluente à base de leite desnatado (G2) e rediluição em extensor de longo prazo quimicamente definido (G3). Para cada diluente foram testadas duas proporções de diluição (1:1 e 1:2; sêmen:diluente), totalizando

cinco grupos experimentais.

As amostras foram avaliadas imediatamente após o descongelamento (tempo zero – T0) e após 12, 24, 36, 48 e 72 h de armazenamento. Para avaliação do efeito da temperatura na longevidade espermática, as amostras foram mantidas a 5 °C ou 17 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata, por um único operador cego quanto aos tratamentos.

Motilidade Espermática

A motilidade e a cinemática espermática foram avaliadas por sistema computadorizado CASA (SCA – Sperm Class Analyzer®), previamente calibrado para sêmen equino. Os parâmetros de captura foram: 25 imagens/s; tamanho de partículas entre 4 e 75 μm^2 ; espermatozoides considerados imóveis (<10 $\mu\text{m/s}$), lentos (<45 $\mu\text{m/s}$), médios (45–90 $\mu\text{m/s}$) e rápidos (>90 $\mu\text{m/s}$). As amostras foram incubadas por 10 min a 37 °C antes da análise em câmara aquecida.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) (%); velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média de trajeto (VAP) ($\mu\text{m/s}$); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz).

Integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada por coloração com carboxifluoresceína diacetato (CFDA) e iodeto de propídio (PI), conforme Figueira (2018), imediatamente após o descongelamento e após 24 e 36 h de armazenamento. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência (450–490 nm), sob aumento de 400 \times , com contagem de 200 células por amostra. Espermatozoides com fluorescência verde foram considerados viáveis (CFDA+/PI-), enquanto aqueles com fluorescência vermelha foram classificados como inviáveis (CFDA-/PI+).

Integridade acrossomal

A integridade da membrana acrossomal foi avaliada por coloração com lectina Peanut Agglutinin conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA), imediatamente após o descongelamento e após 24 e 36 h de armazenamento. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (450–490 nm), sob aumento de 1000 \times com óleo de imersão, com contagem de 200 células por amostra. Espermatozoides com fluorescência intensa na região acrossomal foram considerados com acrossoma íntegro, enquanto aqueles sem fluorescência ou com marcação parcial foram classificados como reagidos ou lesionados.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2026). Após verificação dos pressupostos, MT e MP foram analisadas por modelo linear generalizado com distribuição Tweedie, considerando os efeitos de tempo, diluente e temperatura. As variáveis cinemáticas (VCL, VSL, VAP, LIN e STR) foram avaliadas por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). Adicionalmente, os tempos de 12 e 24 h foram analisados separadamente por ANOVA, com comparação de médias pelo teste de Tukey (5%).

Resultados e Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que a adição de diferentes compostos ao sêmen equino pós-descongelamento influencia predominantemente a funcionalidade espermática, especialmente os parâmetros cinemáticos, sem promover alterações significativas na integridade estrutural das células, corroborando achados previamente descritos na literatura (Ortiz-Rodríguez et al., 2019; Morris, Hartveld e Gibb, 2024).

Os parâmetros de cinemática espermática (VCL, VSL e VAP) foram os mais sensíveis às condições experimentais, sendo significativamente influenciados pelo tipo de diluente, tempo de armazenamento e temperatura ($p < 0,05$), sem interação entre esses fatores. Os maiores valores foram observados nos tempos iniciais, com destaque para 24 horas, com valores médios de 60,52 $\mu\text{m/s}$ para VCL, 20,41 $\mu\text{m/s}$ para VSL e 30,99 $\mu\text{m/s}$ para VAP, seguidos por redução progressiva ao longo do tempo,

atingindo os menores valores em 72 horas (36,53 $\mu\text{m/s}$, 10,76 $\mu\text{m/s}$ e 17,25 $\mu\text{m/s}$, respectivamente.) Esta diminuição gradual da funcionalidade espermática após o descongelamento também foi descrita por Castro et al. (2020), que observaram redução na qualidade seminal (vigor, motilidade) durante o armazenamento.

Entre os diluentes avaliados, o G3 apresentou desempenho superior em todos os parâmetros cinemáticos ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos G1 e G2. Esse padrão sugere maior capacidade de deslocamento espermático, possivelmente associado ao aumento da captação de glicose e produção de ATP (Sweng et al., 2016). Efeito semelhante foi observado na motilidade total, especialmente após 24 horas de armazenamento, corroborando os achados de Brito et al. (2025), que relataram menor declínio da motilidade e maior estabilidade dos parâmetros cinemáticos com o uso do G3 durante o armazenamento prolongado.

Por outro lado, os tratamentos com G1 e G2 apresentaram, de modo geral, menores valores nos parâmetros cinemáticos, indicando menor eficiência funcional dos espermatozoides nestas condições experimentais. Prell et al. (2020) observaram que o sêmen equino rediluído em meios comerciais manteve a motilidade estável por cerca de 24 horas a 5 °C. No presente estudo, observou-se que no tempo de 12 h de armazenamento, o grupo G1 sem diluente apresentou maiores valores de motilidade total, sugerindo que a ausência de manipulação adicional do sêmen descongelado pode preservar temporariamente a motilidade.

A temperatura de armazenamento influenciou predominantemente os parâmetros cinemáticos espermáticos (VCL, VSL e VAP), com melhores resultados observados a 5 °C, evidenciando maior preservação da funcionalidade celular em condições de menor atividade metabólica, conforme relatado para o armazenamento de sêmen fresco (Brito et al., 2025). Porém, esse resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que estudos prévios demonstram que a interação entre temperatura e diluente pode modificar essa resposta, com relatos de melhor desempenho a 17 °C quando utilizados meios com maior suporte metabólico (Munhoz et al., 2025).

Em relação ao tempo pós-descongelamento, observou-se redução progressiva da funcionalidade espermática, com melhores resultados nos tempos iniciais (12 e 24 horas) e queda acentuada em períodos mais prolongados, como observado em outros trabalhos que armazenaram sêmen pós-descongelamento (Prell et al., 2020; Morris, Hartveld e Gibb, 2024). Apesar disso, os dados obtidos nos tempos mais tardios apresentaram elevada variabilidade, sendo considerados menos consistentes, o que limita interpretações mais robustas nesses momentos, aspecto frequentemente observado em estudos com sêmen equino devido à alta variabilidade biológica da espécie.

Destaca-se ainda a escassez de estudos que avaliem o armazenamento prolongado de sêmen equino após o descongelamento, reforçando a relevância do presente trabalho. A motilidade progressiva não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, indicando menor sensibilidade desse parâmetro às condições experimentais avaliadas. Por outro lado, a motilidade total foi influenciada pela interação entre tempo e diluente ($p < 0,05$), evidenciando a necessidade de considerar múltiplos parâmetros na avaliação da qualidade espermática, destacando o caráter multifatorial dessa análise, uma vez que a motilidade isoladamente não prediz o potencial fertilizante (Morris, Hartveld e Gibb, 2024).

A integridade de membrana plasmática e do acrossoma são parâmetros importantes da qualidade espermática (Hernández-Avilés, 2023). No presente estudo, a integridade de membrana plasmática apresentou valores médios de 30–40% no tempo zero, mantendo-se entre 30–35% após 72 horas. Já a integridade acrossomal variou de 50–60% inicialmente, permanecendo entre 40–50% ao longo do tempo, sem tendência consistente de redução. Esses parâmetros não possuem valores de referência universais, e, no sêmen equino pós-descongelamento, valores intermediários são frequentemente observados, como descrito por Avanzi et al. (2011). De modo geral, a criopreservação tende a reduzir esses indicadores, especialmente a integridade de acrossoma, que é mais suscetível a danos (Hernández-Avilés, 2023; Bugno-Poniewierska et al., 2025).

Apesar de variações pontuais, não foi identificado um diluente que promovesse melhora consistente da integridade estrutural dos espermatozoides, indicando ausência de efeito biológico sustentado da rediluição sobre esses parâmetros. Esse achado contrasta com Figueira (2018), que observou maior comprometimento estrutural após diluição, mas também reforça que esses efeitos podem ser específicos e limitados, conforme descrito por Otero et al. (2026).

A ausência de diferenças estatísticas em alguns parâmetros pode estar associada à elevada variabilidade intrínseca do sêmen equino e à natureza multifatorial dos processos envolvidos. Além disso, efeitos biológicos sutis podem não ser detectados estatisticamente em modelos que incluem múltiplos fatores.

Considerações Finais

Em conjunto, os achados reforçam que a cinemática espermática é um dos indicadores mais sensíveis da qualidade seminal, sendo capaz de detectar alterações decorrentes de intervenções pós-descongelamento e refletir diretamente a capacidade funcional dos espermatozoides. Em conjunto, os resultados apontam para um potencial aumento da longevidade espermática pós-descongelamento, o que pode ampliar a aplicabilidade do sêmen congelado em condições de campo. Esse efeito tem implicações relevantes para a reprodução equina, ao possibilitar maior flexibilidade temporal e potencial eficiência nos protocolos de inseminação artificial.

Referências

- Al-Kass Z, Morrell JM.** Freezing Stallion Semen—What Do We Need to Focus on for the Future? *Vet Sci.* v.11, 2024.
- Alvarenga MA, Papa FO, Ramires NC.** Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*, v. 32, n. 3, p. 521-530, 2016.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S** The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.
- Avanzi BR, Ramos RS, Nichi M, Fioratti J, Wenceslau FS, Papa FO** Avaliação da cinemática espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, p. 226-236, 2011.
- Ball BA.** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4): 257-267, 2008.
- Brito LFC, Linardi RL, Rosales LAS, Balamurugan NS, Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L.** Evaluation of a chemically defined, long-term extender for liquid storage of stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 60, e70126, 2025.
- Bugno-Poniewierska M, Bielecka M, Pietras N, Kij-Mitka B, Podstawski Z, Dlugosz B** Influence of cryopreservation on the acrosome reaction in Hucul stallion spermatozoa. *Animals*, v. 15, 1915, 2025.
- Bustani GS, Baiee FH.** Semen extenders: an evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, v.14, n.5, p.1220-1233, 2021.
- Castro FS, Pimentel AM, Mattos RC, Rechsteiner SMF.** Utilização de leite com diferentes concentrações de gordura como diluentes para sêmen equino refrigerado. *Ciência Animal Brasileira*, v. 21, e-44262, 2020.
- Clulow J, Gibb Z.** Liquid storage of stallion spermatozoa—past, present and future. *Anim Reprod Sci.* 2022;247:107088.
- Cuervo-Arango J, Nivola K, Väihkönen L, Katila T.** The effect of storage temperature of stallion semen on pregnancy rates. *J Equine Vet.* 2015;35:611-6.
- Figueira MEB.** Efeito da diluição pós-descongelamento sobre a viabilidade espermática de sêmen congelado de jumentos da raça Pêga. 2018. 47 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- Hernandez-Avilés C, Ramírez-Agamez L, Varner DD, Love CC** The stallion sperm acrosome: considerations from a research and clinical perspective. *Theriogenology*, v.196, p.121-149, 2023.
- Lagares MA, Da Silva GC, Cortes SF, Moreira FHM, Neves FCD, Alves NC, Viegas RN, Diniz TF, Lemos S, Rezende ASC, Freitas MM, Stahlberg R, Nicolino RR.** L-carnitine added to post-thawed semen acts as an antioxidant and a stimulator of equine sperm metabolism. *Andrologia*, v.54, n.3, p.1-11, 2022.
- Loomis PR, Graham JK.** Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* 105, 119-128, 2008.
- Morris L, Harteveld R, Gibb Z** A simplified fixed-time insemination protocol using frozen-thawed stallion spermatozoa stored at 17 °C for up to 24 h before insemination. *Equine Veterinary Journal*, p. 1-9, 2024.
- Munhoz M, Nunes M, Gallelli M, Carneiro G, Miragaya M** Successful pregnancy using stallion semen stored at 17°C for 6 days. *Clinical Theriogenology*, v.17, 13213, 2025.
- Ortiz-Rodriguez JM, Balao da Silva C, Masot J, Redondo E, Gazquez A, Tapia JA, Gil C, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ.** Rosiglitazone in the thawing medium improves mitochondrial function in stallion

spermatozoa through regulating Akt phosphorylation and reduction of caspase 3. *PLoS ONE*, v.14, n. 7, e0211994, 2019.

Otero JC, Neild DM, Ferrante AA, Gambarotta MC, Caldevilla ML Effect on equine sperm of post-thaw glycerol dilution using two different semen extenders. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.156, 105747, 2026.

Peña FJ, Macías-García B, Samper JC, Aparicio I, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa during cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(Suppl. 2): 78–83, 2011.

Prell MJ, McCue PM, Moffett PD, Graham JK Motility and fertility evaluation of thawed frozen stallion semen after 24 hours of cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.90, 102983, 2020.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2026.

Swegen A, Lambourne SR, Aitken RJ, Gibb Z. Rosiglitazone improves stallion sperm motility, ATP content, and mitochondrial function. *Biology of Reproduction*, 2016.

Wang P, Wang YF, Wang H, Wang CW, Zan LS, Hu JH, Li QW, Jia YH, Ma GJ. HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote*, v.22, p.239-245, 2014.

Zimmermann AM, Neves MM, Dávila TT, Neves APM, Dávila AMR. Sobrevida das células espermáticas equinas criopreservadas após descongelamento e diluição utilizando-se dois diluentes comerciais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.1, p.58–63.
