

O impacto de diferentes concentrações de urina na viabilidade e cinética de espermatozoides criopreservados de garanhões

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Marina Lucena Frédou^{2*}, Bruna Merci de Zutter², Amanda Carvalho Silva², Pedro Henrique de Oliveira², Leticia dos Santos Rebelo², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro^{1,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: marina.fredou@unesp.br

A contaminação do sêmen equino por urina durante a ejaculação, conhecida como urospermia, representa a segunda principal causa de disfunção ejaculatória em garanhões, comprometendo significativamente a fertilidade. Esse efeito prejudicial é atribuído ao pH alcalino, à elevada osmolaridade e à capacidade inflamatória da urina sobre o ambiente uterino. A criopreservação do sêmen constitui uma ferramenta fundamental na biotecnologia reprodutiva, e a presença de urina no ejaculado pode comprometer a viabilidade espermática após o descongelamento. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de urina em diferentes concentrações sobre a cinética espermática e a integridade da membrana plasmática após a descongelamento. Amostras de urina foram coletadas de cinco garanhões, sendo analisadas quanto às suas propriedades físico-químicas e microbiológicas, posteriormente homogeneizadas para padronização. Foram utilizados ejaculados de 12 garanhões clinicamente saudáveis, previamente submetidos a exame andrológico completo. As amostras de sêmen foram divididas em seis grupos experimentais: Controle (CT, sem adição de urina), U10 (10% de urina), U20 (20%), U30 (30%), U40 (40%) e U50 (50%). Após a adição da urina, as amostras foram submetidas a diluição, centrifugação e criopreservadas conforme metodologia padronizada. A motilidade espermática foi avaliada por meio de análise assistida por computador (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis), enquanto a integridade da membrana plasmática foi determinada por microscopia de epifluorescência. As avaliações foram realizadas imediatamente após o descongelamento (0h), e após 1h e 2h de incubação a 37°C. Para a análise estatística, modelos lineares generalizados mistos foram empregados, considerando os efeitos da concentração de urina e do tempo de incubação. Os resultados demonstraram uma redução significativa ($P < 0,05$) na motilidade total (MT) e na motilidade progressiva (MP) conforme o aumento da concentração de urina. Enquanto os grupos CT, U10 e U20 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para MT e MP, cujo os valores foram respectivamente: 32,1%; 26,4%; 26,1 de MT e 14,3%; 10,4%; 10,5% de MP, já a partir do grupo U30, observou-se uma redução expressiva ($P < 0,05$), com MT 48,2% e MP 21,8%. Os parâmetros de velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média do trajeto (VAP) seguiram um padrão semelhante, evidenciando redução progressiva com o aumento da concentração de urina, e, após 2h de incubação, os valores se tornaram equivalentes entre os grupos experimentais. A análise da integridade da membrana plasmática revelou que, imediatamente após o descongelamento (0h), o grupo U20 (29,1%) já apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle (39,3) ($P < 0,05$), sugerindo um efeito deletério progressivo da contaminação urinária. Após 2h de incubação, os grupos CT (23,5%) e U10 (20,2%) permaneceram estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$), enquanto os grupos U20 (17,5%), U30 (16%), U40 (11,3%) e U50 (8,1%) apresentaram redução significativa na integridade espermática ($P < 0,05$). Conclui-se que a presença de urina no sêmen equino compromete de forma significativa a viabilidade espermática após a criopreservação, sendo que concentrações superiores a 20% impactam adversamente a motilidade e a integridade da membrana plasmática. Esses achados são relevantes para a compreensão dos efeitos da urospermia sobre a qualidade seminal e podem contribuir para o aprimoramento das técnicas de manuseio e preservação do sêmen na reprodução equina.

Palavras-chave: Urospermia, infertilidade, andrologia, equino.

Agradecimentos: CNPq e FAPESP

The impact of different urine concentrations on the viability and kinetics of cryopreserved sperm from stallions

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Marina Lucena Frédou^{2*}, Bruna Merci de Zutter², Amanda Carvalho Silva², Pedro Henrique de Oliveira², Leticia dos Santos Rebelo², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro^{1,2}

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: marina.fredou@unesp.br

Contamination of equine semen by urine during ejaculation, known as urospermia, is the second leading cause of ejaculatory dysfunction in stallions, significantly compromising fertility. This detrimental effect is attributed to the alkaline pH, high osmolarity and inflammatory capacity of urine on the uterine environment. Semen cryopreservation is a fundamental tool in reproductive biotechnology, and the presence of urine in the ejaculate can compromise sperm viability after thawing. The aim of this study was to evaluate the effects of adding urine in different concentrations on sperm kinetics and plasma membrane integrity after thawing. Urine samples were collected from five stallions and analyzed for their physicochemical and microbiological properties, then homogenized for standardization. Ejaculates from 12 clinically healthy stallions who had previously undergone a complete andrological examination were used. The semen samples were divided into six experimental groups: Control (CT, no urine added), U10 (10% urine), U20 (20%), U30 (30%), U40 (40%) and U50 (50%). After adding urine, the samples were diluted, centrifuged and cryopreserved according to standardized methodology. Sperm motility was assessed using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), while plasma membrane integrity was determined using epifluorescence microscopy. Evaluations were performed immediately after thawing (0h), as well as after 1h and 2h of incubation at 37°C. For the statistical analysis, generalized linear mixed models were used, considering the effects of urine concentration and incubation time. The results showed a significant reduction ($P < 0.05$) in total motility (TM) and progressive motility (PM) as urine concentration increased. While the CT, U10 and U20 groups did not show statistically significant differences for MT and MP, whose values were: 32.1%; 26.4%; 26.1 MT and 14.3%; 10.4%; 10.5% MP, respectively, from the U30 group onwards there was a significant reduction ($P < 0.05$), with MT 48.2% and MP 21.8%. The parameters of curvilinear velocity (VCL), progressive linear velocity (VSL) and mean path velocity (VAP) followed a similar pattern, showing a progressive reduction with increasing urine concentration, and after 2 hours of incubation, the values became equivalent between the experimental groups. Analysis of plasma membrane integrity revealed that, immediately after thawing (0h), the U20 group (29.1%) already showed a significant difference compared to the control group (39.3) ($P < 0.05$), suggesting a progressive deleterious effect of urinary contamination. After 2 hours of incubation, the CT (23.5%) and U10 (20.2%) groups remained statistically similar ($P > 0.05$), while the U20 (17.5%), U30 (16%), U40 (11.3%) and U50 (8.1%) groups showed a significant reduction in sperm integrity ($P < 0.05$). It is concluded that the presence of urine in equine semen significantly compromises sperm viability after cryopreservation, with concentrations above 20% adversely impacting motility and plasma membrane integrity. These findings are relevant to understanding the effects of urospermia on seminal quality and may contribute to improving semen handling and preservation techniques in equine reproduction.

Keywords: Urospermia, infertility, andrology, equine.

Centrifugação com gradiente de densidade como abordagem alternativa para o processamento de sêmen equino refrigerado contaminado por diferentes concentrações de urina

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Vinicius Guilherme de Araújo², Bruna Merc de Zutter², Amanda Carvalho Silva², Leticia dos Santos Rabelo², Izabella Regina da Silva Marcelino², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil
E-mail: gabriel.a.monteiro@gmail.com

A urospermia, frequentemente associada à incompetência do colo da vesícula urinária, é responsável por prejuízos importantes na viabilidade espermática. Embora seja uma ocorrência comum, ainda não existem protocolos padronizados e eficazes para a prevenção e o processamento dessas amostras seminais. Nesse sentido, o trabalho em questão objetivou testar a centrifugação e a utilização de Equipure® (Botupharma, Brasil) como alternativas para refrigerar sêmen com diferentes concentrações de urina. Para tal, foi utilizado 1 ejaculado de 12 garanhões e cada amostra foi dividida em três alíquotas, sendo elas: grupo controle (Ct), adição de 20% de urina (G20), e adição de 50% de urina (G50). As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e novamente divididas em três grupos cada: grupo diluído (Di) em diluente à base de leite desnatado (BotuSêmen®, Botupharma); grupo centrifugado (Cg), no qual as amostras foram diluídas na proporção 1:1 em BotuSêmen® e centrifugadas a 600g por 10 minutos; e grupo Equipure® (Eq), no qual as amostras foram diluídas na proporção 1:1 em BotuSêmen®, adicionadas em falcon de 10 mL contendo 2 mL de Equipure® e centrifugadas a 400g por 20 minutos. Nos grupos Cg e Eq, após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets ressuspensos em BotuSêmen®, e nos três grupos a concentração final foi de 40 milhões de espermatozoides por mL. Todos os 9 grupos de cada animal foram avaliados quanto a cinética espermática e integridade de membrana no momento zero (0h) e após 24 horas de refrigeração em BotuTainer® a 5°C, além da recuperação do número de espermatozoides e morfologia espermática para os grupos Di, Cg e Eq. Para a avaliação de cinética foi utilizado o aparelho CASA (Computer Assisted Semen Analysis, CASA, Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelone, Spain), enquanto a integridade de membrana foi avaliada utilizando as sondas fluorescentes carboxifluoresceína (C5041, Sigma-Aldrich®) e iodeto de propídeo (PI; P4170, Sigma-Aldrich®). Para todas as concentrações de urina, o processamento com Equipure® resultou em valores mais altos ($p < 0,001$) de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP), sendo que os grupos Ct e G20 apresentaram valores próximos entre si, enquanto o grupo com 50% de urina acrescida sofreu uma queda significativa na qualidade, mas também apresentou superioridade do grupo Eq em relação aos tratamentos Di e Cg. Na refrigeração, os grupos Eq foram superiores aos tratamentos Di e Cg em G20 e G50 para MT, MP, RAP, VAP, VCL e IMP ($p < 0,05$). No grupo Ct, o tratamento Di foi superior ao Cg, mas sem diferenças em relação ao Eq. Em relação à recuperação espermática, os valores foram estáveis para o tratamento Ct, enquanto para Eq houve uma relação inversamente proporcional de concentração de urina e recuperação espermática. Para morfologia espermática, o processamento Eq manteve uma média menor de defeitos que os demais tratamentos. Nesse sentido, é possível apontar o Equipure® como alternativa para processamento de sêmen contaminado com urina.

Palavras-chave: Urospermia, subfertilidade, emissão, ejaculação, distúrbio.

Agradecimentos: CNPq e FAPESP.

Density gradient centrifugation as an alternative approach for processing refrigerated equine semen contaminated with different urine concentrations

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Vinicius Guilherme de Araújo², Bruna Merc de Zutter², Amanda Carvalho Silva², Leticia dos Santos Rabelo², Izabella Regina da Silva Marcelino², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil;
E-mail: gabriel.a.monteiro@gmail.com

Urospermia, often associated with incompetence of the neck of the urinary vesicle, is responsible for significant losses in sperm viability. Although it is a common occurrence, there are still no standardized and effective protocols for the prevention and processing of these seminal samples. The aim of this study was to test centrifugation and the use of Equipure® (Botupharma, Brazil) as alternatives for cooling semen with different concentrations of urine. For this purpose, 1 ejaculate from 12 stallions was used and each sample was divided into three aliquots: control group (Ct), addition of 20% urine (G20), and addition of 50% urine (G50). Samples were incubated at 37°C for 10 minutes and further divided into three subgroups: diluted (Di) in skim milk-based extender (BotuSêmen®, Botupharma); centrifuged (Cg), where samples were diluted 1:1 in BotuSêmen® and centrifuged at 600g for 10 minutes; and Equipure® (Eq), in which the samples were diluted 1:1 in BotuSêmen®, added to a 10 mL falcon containing 2 mL of Equipure® and centrifuged at 400g for 20 minutes. In the Cg and Eq groups, after centrifugation, the supernatant was discarded and the pellets resuspended in BotuSêmen®, and in all three groups the final concentration was 40 million sperm per mL. All 9 groups from each animal were assessed for sperm kinetics and membrane integrity at time zero (0h) and after 24 hours of refrigeration in BotuTainer® at 5°C, in addition to the recovery of sperm numbers and sperm morphology for the Di, Cg and Eq groups. The CASA device (Computer Assisted Semen Analysis, CASA, Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Spain) was used to assess kinetics, while membrane integrity was assessed using the fluorescent probes carboxyfluorescein (C5041, Sigma-Aldrich®) and propidium iodide (PI; P4170, Sigma-Aldrich®). For all urine concentrations, processing with Equipure® resulted in higher values ($p < 0.001$) for total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), linear velocity (VSL), percentage of rapid sperm (RAP) and plasma membrane integrity (IMP), with the Ct and G20 groups showing values close to each other, while the group with 50% added urine suffered a significant drop in quality, but the Eq group was also superior to the Di and Cg treatments. In refrigeration, the Eq groups were superior to the Di and Cg treatments in G20 and G50 for MT, MP, RAP, VAP, VCL and IMP ($p < 0.05$). In the Ct group, the Di treatment was superior to Cg, but with no differences in relation to Eq. With regard to sperm recovery, the values were stable for the Ct treatment, while for Eq there was an inversely proportional relationship between urine concentration and sperm recovery. In terms of sperm morphology, the Eq treatment maintained a lower average number of defects than the other treatments. In this sense, it is possible to point to Equipure® as an alternative for processing semen contaminated with urine.

Keywords: Urospermia, subfertility, emission, ejaculation, disorder.

Acknowledgments: CNPq and FAPESP.

Influência da refrigeração por 24h a 5°C no sistema de refrigeração passiva “BOTUFLEX” sob os parâmetros espermáticos com diferentes diluentes em sêmen congelado de garanhões

Luiza Padovani Zanlorenzi-Silva¹, Leonardo de Mendonça Siqueira², Beatriz Silva Carriel³, Marina Lucena Fredou⁴, Vinicius Guilherme de Araújo⁵, Amanda Carvalho Silva⁶, Camila Moreira Trinque⁷, Bruna de Mercı Zutter⁸, Mariana Silva Frasson⁹, Gabriel Augusto Monteiro¹⁰, Frederico Ozanam Papa¹¹

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – FMVZ Botucatu
E.mail: luiza.zanlorenzi@unesp.br

Sabe-se que a refrigeração e a criopreservação de sêmen são biotécnicas amplamente utilizadas na reprodução equina, permitindo o cruzamento entre animais sem necessidade de deslocamento e reduzindo riscos sanitários. No entanto, o choque térmico associado ao resfriamento e congelamento pode comprometer a integridade espermática, afetando parâmetros como motilidade, viabilidade e morfologia. Com isso, busca-se estratégias que minimizem os efeitos adversos do processo de criopreservação. Uma abordagem promissora é a refrigeração prévia a 5°C por 24 horas, que pode atuar como etapa de adaptação térmica antes da congelação. Essa técnica é especialmente útil para haras e propriedades que não dispõem de equipamentos adequados para a congelação imediata, como centrífugas e microscópios. Nesses casos, o sêmen pode ser diluído e acondicionado em caixas de refrigeração passiva com gelo reciclável, como o sistema Botuflex®, e transportado até um local com infraestrutura adequada para o congelamento. Além disso, o tipo de diluente utilizado pode influenciar diretamente na proteção celular durante essas etapas. Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da refrigeração passiva com o sistema Botuflex® por 24h a 5°C sobre os parâmetros espermáticos de sêmen congelado de garanhões, utilizando diferentes diluentes comerciais. Foram utilizados três ejaculados de quatro garanhões de diferentes raças e fertilidade comprovada. As coletas foram realizadas por meio de vagina artificial modelo Botucatu®. Após avaliação inicial, os ejaculados foram diluídos em quatro diluentes comerciais: BotuSpecial® (BSP), BotuSêmen® (BSEM), BotuSêmen-Gold® (BG) e BotuTurbo® (BT). As amostras foram divididas em dois grupos experimentais: o grupo Congelado (C), no qual o sêmen diluído foi submetido à centrifugação, reconcentração, diluição final, equilibrado por 20 minutos a 5°C e 20 minutos sobre o nitrogênio líquido antes da congelação; e o grupo Refrigerado (R), no qual o sêmen diluído foi armazenado por 24 horas a 5°C em caixa de refrigeração passiva Botuflex® (Botupharma, Brasil), sendo posteriormente submetido ao mesmo protocolo de congelamento do grupo C. A cinética espermática pós descongelação foi avaliada em aparelho computadorizado de avaliação espermática (CASA); a estabilidade de membrana plasmática (EMP) e o potencial mitocondrial (PM) foram avaliados por citometria de fluxo e a morfologia espermática foi avaliada por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). A análise estatística foi feita em Kolmogorov-Smirnov, ANOVA E Teste de Tukey. Para motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP), não houve diferença significativa entre os diluentes no grupo C ($P < 0,05$). No grupo R, o diluente BotuSêmen-Gold® (BG) apresentou melhores resultados para MT e RAP, enquanto BG e BotuSpecial® (BSP) se destacaram na MP ($P < 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C e R para esses parâmetros ($P < 0,05$). Em relação à estabilidade de membrana plasmática (EMP) e ao potencial mitocondrial (PM), o diluente BG mostrou-se superior em ambos os grupos, e o BSEM também apresentou bons resultados no grupo C ($P < 0,05$). Quanto à morfologia espermática, não houve diferenças significativas entre os grupos ou entre os diluentes testados ($P < 0,05$). Dessa forma, conclui-se que a refrigeração passiva a 5°C por 24 horas utilizando o sistema Botuflex® é uma alternativa viável à congelação imediata, especialmente quando utilizados os diluentes BotuSpecial® e BotuSêmen-Gold®. Essa técnica mostra potencial para facilitar a coleta de sêmen em propriedades sem infraestrutura adequada, possibilitando transporte e posterior congelação com qualidade preservada.

Influence of 24-Hour Refrigeration at 5°C Using the Passive Cooling System “BOTUFLEX” on Sperm Parameters with Different Extenders in Frozen Stallion Semen

Luiza Padovani Zanlorenzi-Silva¹, Leonardo de Mendonça Siqueira², Beatriz Silva Carriel³, Marina Lucena Fredou⁴, Vinicius Guilherme de Araújo⁵, Amanda Carvalho Silva⁶, Camila Moreira Trinque⁷, Bruna de Mercı Zutter⁸, Mariana Silva Frasson⁹, Gabriel Augusto Monteiro¹⁰, Frederico Ozanam Papa¹¹

São Paulo State University (UNESP) – FMVZ Botucatu
E-mail: luiza.zanlorenzi@unesp.br

Semen refrigeration and cryopreservation are widely used biotechnologies in equine reproduction, allowing animal breeding without transportation and reducing sanitary risks. However, thermal shock associated with cooling and freezing may compromise sperm integrity, affecting parameters such as motility, viability, and morphology. Therefore, strategies to minimize the adverse effects of cryopreservation are constantly being investigated. One promising approach is prior refrigeration at 5°C for 24 hours, which may serve as a thermal adaptation phase before freezing. This technique is especially useful for stud farms and facilities lacking equipment for immediate cryopreservation, such as centrifuges and microscopes. In such cases, semen can be diluted and stored in passive cooling boxes with reusable ice packs—such as the Botuflex® system—and transported to a facility with adequate infrastructure for freezing. Furthermore, the type of extender used may directly influence cellular protection during these stages. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of passive refrigeration using the Botuflex® system at 5°C for 24 hours on sperm parameters in frozen stallion semen, using different commercial extenders. Three ejaculates from four stallions of different breeds and proven fertility were used. Collections were performed using a Botucatu® model artificial vagina. After initial evaluation, the ejaculates were diluted in four commercial extenders: BotuSpecial® (BSP), BotuSemen® (BSEM), BotuSemen-Gold® (BG), and BotuTurbo® (BT). Samples were divided into two experimental groups: the Frozen group (C), in which diluted semen was centrifuged, reconcentrated, subjected to final dilution, and equilibrated for 20 minutes at 5°C and 20 minutes over liquid nitrogen vapor before freezing; and the Refrigerated group (R), in which diluted semen was stored for 24 hours at 5°C in a Botuflex® passive refrigeration container (Botupharma, Brazil), then frozen using the same protocol as group C. Post-thaw sperm kinetics were assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA); plasma membrane stability (PMS) and mitochondrial potential (MP) were analyzed by flow cytometry, and sperm morphology was evaluated using differential interference contrast (DIC) microscopy. Statistical analysis was performed using the Kolmogorov–Smirnov test, ANOVA, and Tukey's test. For total motility (TM), progressive motility (PM), and percentage of rapid spermatozoa (RAP), no significant differences were observed among extenders in group C ($P < 0.05$). In group R, the BotuSemen-Gold® (BG) extender yielded superior results for TM and RAP, while both BG and BotuSpecial® (BSP) showed higher values for PM ($P < 0.05$). However, no significant differences were found between groups C and R for these parameters ($P < 0.05$). Regarding PMS and MP, BG was superior in both groups, with BSEM also presenting good results in group C ($P < 0.05$). No significant differences in sperm morphology were observed between groups or extenders ($P < 0.05$). In conclusion, passive refrigeration at 5°C for 24 hours using the Botuflex® system is a viable alternative to immediate freezing, especially when using BotuSpecial® and BotuSemen-Gold® extenders. This technique shows promise for enabling semen collection in facilities lacking the necessary infrastructure, allowing for transportation and subsequent freezing with preserved quality.

Influência de diferentes métodos de processamento seminal na morfologia espermática de amostras contaminadas com urina e submetidas à refrigeração

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Bruna Merc de Zutter^{2*}, Amanda Carvalho Silva², Vinicius Guilherme de Araujo², Iara Macêdo Petelinkar², Gabriel Sasso Perea Martins², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: bruna.zutter@unesp.br

A qualidade espermática é um fator crítico para o sucesso das biotecnologias reprodutivas aplicadas à espécie equina. A contaminação seminal por urina compromete a viabilidade espermática, tornando imprescindível a adoção de técnicas eficientes para a remoção de substâncias deletérias. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de processamento seminal na preservação da morfologia espermática de amostras contaminadas com urina e submetidas à refrigeração. Para tanto, foram coletados ejaculados de 12 garanhões, dos quais uma fração foi destinada à experimentação. As amostras foram distribuídas em três grupos experimentais: grupo controle (CT), sem adição de urina; grupo U20, com adição de 20% (v/v) de urina; e grupo U50, com 50% (v/v) de urina. Após incubação a 37°C por 10 minutos, os grupos foram submetidos a três diferentes protocolos de processamento seminal: diluição simples (DIL), centrifugação (CENT) e seleção espermática por gradiente de densidade coloidal (EQUIP). Posteriormente, o sêmen foi refrigerado a 5°C por 24 horas e reaquecido a 37°C por 10 minutos antes da análise. A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada por microscopia de contraste de fase, após fixação em formol-salina, com contagem de 200 células por amostra. Os resultados indicaram que a seleção espermática pelo gradiente de densidade coloidal (EQUIP) resultou na menor incidência ($P < 0,05$) de defeitos morfológicos em comparação aos métodos DIL e CENT em todos os grupos. A presença de urina nas amostras foi associada a um aumento significativo na prevalência de anormalidades espermáticas, sendo as mais frequentes cauda dobrada/enrolada, gota citoplasmática distal e cauda fortemente dobrada. O grupo U50 apresentou um aumento expressivo ($P < 0,05$) na frequência de defeitos maiores e menores, tanto antes (28,33%) quanto após a refrigeração (29,5%) em comparação ao grupo controle nos mesmos momentos (15,17 e 17,83%), evidenciando um efeito deletério progressivo da urina sobre a integridade morfológica dos espermatozoides. A técnica CENT resultou em maior incidência de defeitos morfológicos no grupo U50 em 0h (29,75%) e 24h (29,42%), particularmente cauda fortemente dobrada/enrolada (5,75 e 5,67%) e gota citoplasmática proximal (3,92 e 4,17%). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DIL e CENT para a maioria das anormalidades avaliadas ($P > 0,05$). Dessa forma, os achados do presente estudo ressaltam a importância da escolha do método de processamento seminal na manutenção da integridade morfológica dos espermatozoides. A seleção espermática por gradiente de densidade coloidal Equipure® demonstrou ser a abordagem mais eficiente na minimização de danos estruturais, especialmente em amostras contaminadas com urina. Esses resultados sugerem que o uso dessa técnica confere proteção superior contra alterações morfológicas, reduzindo os impactos negativos da contaminação urinária e da manipulação seminal, o que pode ter implicações diretas na melhoria dos protocolos de reprodução assistida em equinos.

Palavras-chave: Urospermia, seleção espermática, defeitos morfológicos, fertilidade.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Capes pelo auxílio financeiro.

Influence between different seminal processing methods on the sperm morphology of urine-contaminated samples submitted to refrigeration

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Bruna Merci de Zutter^{2*}, Amanda Carvalho Silva², Vinicius Guilherme de Araujo², Iara Macêdo Petelinkar², Gabriel Sasso Perea Martins², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹School of Veterinary, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

*E-mail: bruna.zutter@unesp.br

Sperm quality is a critical factor for the success of reproductive biotechnologies applied to the equine species. Seminal contamination by urine compromises sperm viability, making it essential to adopt efficient techniques to remove deleterious substances. The aim of this study was to evaluate the influence of different seminal processing methods on the preservation of sperm morphology in urine-contaminated samples submitted to refrigeration. To this end, ejaculates were collected from 12 stallions, of which a fraction was destined for experimentation. The samples were divided into three experimental groups: control group (CT), with no urine added; group U20, with 20% (v/v) urine added; and group U50, with 50% (v/v) urine added. After incubation at 37°C for 10 minutes, the groups were subjected to three different seminal processing protocols: simple dilution (DIL), centrifugation (CENT) and sperm selection by colloidal density gradient (EQUIP). The semen was then refrigerated at 5°C for 24 hours and reheated at 37°C for 10 minutes before analysis. Sperm morphology was assessed using phase contrast microscopy after fixation in formalin-saline, with a count of 200 cells per sample. The results indicated that sperm selection by colloidal density gradient (EQUIP) resulted in the lowest incidence ($P < 0.05$) of morphological defects compared to the DIL and CENT methods in all groups. The presence of urine in the samples was associated with a significant increase in the prevalence of sperm abnormalities, the most frequent being kinked/coiled tail, distal cytoplasmic drop and strongly kinked tail. The U50 group showed a significant increase ($P < 0.05$) in the frequency of major and minor defects, both before (28.33%) and after refrigeration (29.5%) compared to the control group at the same times (15.17 and 17.83%), showing a progressive deleterious effect of urine on the morphological integrity of the sperm. The CENT technique resulted in a higher incidence of morphological defects in the U50 group at 0h (29.75%) and 24h (29.42%), particularly strongly bent/wound tails (5.75 and 5.67%) and proximal cytoplasmic droplets (3.92 and 4.17%). No significant differences were observed between the DIL and CENT groups for most of the abnormalities assessed ($P > 0.05$). Therefore, the findings of this study highlight the importance of the choice of seminal processing method in maintaining the morphological integrity of the sperm. Sperm selection by Equipure® colloidal density gradient proved to be the most efficient approach in minimizing structural damage, especially in samples contaminated with urine. These results suggest that the use of this technique provides superior protection against morphological alterations, reducing the negative impacts of urinary contamination and seminal manipulation, which could have direct implications for improving assisted reproduction protocols in horses.

Keywords: Urospermia, sperm selection, morphological defects, fertility.

Acknowledgements: The authors are grateful to Capes for financial assistance.

Efeito do BotuMix Garanhão Plus® na qualidade seminal de garanhões

Lizandra Pires da Silva¹, Maria Isabela Ziminiani Padovani¹, Thaini Barbosa Costa^{2*}, Felipe Rydygier de Ruediger³

¹Discente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil; ²Pós-Graduanda em Reprodução Animal - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil; ³Docente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

*E-mail: thainibarbosa27@gmail.com

A espécie equina possui baixa fertilidade comparada as demais espécies domésticas. O sêmen de todas as espécies domésticas possui ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), os ácidos docosaheptaenóico (DHA; 22:6n-3, um ácido graxo ômega 3) e ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-6, um ácido ômega 6) que são essenciais para a estrutura, função e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. A L-carnitina possui um papel importante no metabolismo dos espermatozoides, afetando de forma positiva a motilidade, a maturação e a espermatogênese, sendo sintetizada no fígado, rim e cérebro através da modificação de dois aminoácidos, que são a lisina e metionina. O objetivo do presente projeto de pesquisa foi avaliar o efeito do BotuMix Garanhão Plus® na qualidade seminal de garanhões. Foram utilizados dois garanhões, SRD, com idade média de 9,3±3,4 anos de vida, pesando 432±37 kg. Os animais foram avaliados quanto sua aptidão reprodutiva segundo as normas preconizadas pelo CBRA. Em um intervalo de 15 dias foram realizadas duas colheitas seminais e então se iniciou a suplementação com o nutracêutico, sendo fornecido 50 mL, via oral por animal/dia, por um período de 60 dias, nesse período os animais seguiram um regime de coleta de sêmen 1x/semana. Após coletadas, as amostras seminais foram avaliadas para os aspectos macroscópicos e microscópicos do sêmen como: volume, cor, odor, aspecto, motilidade, vigor, concentração espermática e morfologia espermática. Os aspectos macroscópicos, como cor se mantiveram branco acinzentado, o odor sui generis e o aspecto aquoso ao longo do tempo, e referente ao volume não obtivemos diferença ao longo do tempo. Já, os aspectos microscópicos apresentaram resultados diferentes ao longo do tempo. A motilidade variou de 80 ± 0% nas semanas 1 e 2, para 85 ± 5% entre as semanas 3 e 8 e 90 ± 0% nas semanas 9 e 10 (p<0,05), o vigor variou de 3 nas 6 primeiras semanas para 4 nas semanas seguintes (p<0,05), a concentração de espermatozoides viáveis no ejaculado apresentou diferença ao longo do tempo (p<0,05), variando de 1,8 x 10⁹ ± 1,1 x 10⁹ na primeira semana para 6,2 x 10⁹ ± 2,9 x 10⁹ na décima semana. Houve uma redução significativa dos defeitos espermáticos maiores e menores ao longo do tempo (p<0,05), assim como para os defeitos espermáticos totais, que apresentaram 17,05±6,25% na primeira semana e 7,07±2,45% na décima semana (p<0,05). A partir dos dados obtidos, conclui-se que o uso do Botumix Garanhão Plus® influenciou positivamente nos aspectos específicos da qualidade seminal dos garanhões, especialmente na motilidade espermática e à redução de defeitos espermáticos.

Palavras-chave: Equinos, ômega 3, L-carnitina, sêmen.

Agradecimentos: À Universidade do Oeste Paulista (Unoeste, processo 8717/2023) pelo fomento fornecido para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Effect of BotuMix Garanhão Plus® on the Seminal Quality of Stallions

Lizandra Pires da Silva¹, Maria Isabela Ziminiani Padovani¹, Thaini Barbosa Costa^{2*},
Felipe Rydygier de Ruediger³

¹Undergraduate Student at Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil, ²Postgraduate Student in Animal Reproduction – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil; ³Faculty Member at Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

*Email: thainibarbosa27@gmail.com

The equine species has lower fertility compared to other domestic species. Semen from all domestic species contains polyunsaturated fatty acids (PUFAs), including docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3, an omega-3 fatty acid) and docosapentaenoic acid (DPA; 22:5n-6, an omega-6 fatty acid), which are essential for the structure, function, and integrity of the sperm cell membrane. L-carnitine plays an important role in sperm metabolism, positively affecting motility, maturation, and spermatogenesis. It is synthesized in the liver, kidneys, and brain through the modification of two amino acids: lysine and methionine. The objective of the present research project was to evaluate the effect of BotuMix Garanhão Plus® on the seminal quality of stallions. Two mixed-breed stallions, with an average age of 9.3±3.4 years and an average weight of 432±37 kg, were used in the study. The animals were assessed for their reproductive aptitude according to the standards recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA). In a 15-day interval, two semen collections were made, after which supplementation with the nutraceutical began. The animals were administered 50 mL of the product orally per day for 60 days, with weekly semen collection during this period. After collection, semen samples were evaluated for both macroscopic and microscopic aspects, including: volume, color, odor, aspect, motility, vigor, sperm concentration, and sperm morphology. The macroscopic aspects, such as color, remained a grayish-white, with a sui generis odor and watery appearance throughout the study period. No differences in semen volume were observed over time. However, microscopic aspects showed different results over time. Motility increased from 80 ± 0% during weeks 1 and 2 to 85 ± 5% during weeks 3 and 8, and 90 ± 0% during weeks 9 and 10 (p<0.05). Vigor increased from 3 in the first 6 weeks to 4 in the following weeks (p<0.05). The concentration of viable sperm in the ejaculate showed a significant difference over time (p<0.05), varying from 1.8 x 10⁹ ± 1.1 x 10⁹ in the first week to 6.2 x 10⁹ ± 2.9 x 10⁹ in the tenth week. A significant reduction in major and minor sperm defects was observed over time (p<0.05), as well as for total sperm defects, which decreased from 17.05±6.25% in the first week to 7.07±2.45% in the tenth week (p<0.05). Based on the data obtained, it can be concluded that the use of BotuMix Garanhão Plus® positively influenced specific aspects of seminal quality in stallions, especially sperm motility and the reduction of sperm defects.

Keywords: Equines; omega-3; L-carnitine; sêmen.

Acknowledgments: To the Universidade do Oeste Paulista (Unoeste, process 8717/2023) for the funding provided for the development of this research.

Efeito de diferentes concentrações de urina em sêmen equino fresco incubado a 37°C

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Amanda Carvalho Silva^{2*}, Bruna Mercic de Zutter², Marina Lucena Frédou², Rogeiro Araújo de Almeida Filho², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil
*E-mail: amanda.carvalho-silva@unesp.br

A urospermia, disfunção reprodutiva responsável pela contaminação do sêmen com urina, é uma das principais causas de subfertilidade em equinos, além de acarretar perdas econômicas. A micção induzida ou utilização de fármacos para aumentar o tônus do esfíncter uretral externo, para evitar a micção ou alterar a produção de urina, são algumas alternativas de manejo para animais urospérmicos. Entretanto, nenhuma das abordagens garante a não-contaminação do sêmen. Nesse sentido, faz-se necessária a compreensão dos efeitos deletérios da urina no sêmen e de processamentos que possam ser feitos para minimizar esses efeitos. O presente estudo utilizou 12 garanhões, sendo um ejaculado de cada, cada amostra seminal foi dividida em 5 alíquotas: grupo controle (Ct), sem acréscimo de urina; grupo com adição de 5% de urina (G5); grupo com adição de 10% de urina (G10); grupo com adição de 20% de urina (G20); e grupo com adição de 50% de urina (G50). As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e divididas em dois grupos, um grupo denominado puro no qual se mantiveram como estavam (Pu), e um grupo Diluído (Di) no qual foram diluídas em BotuSêmen® (Botupharma, Brasil) na proporção 1:1. As amostras dos 10 grupos permaneceram incubadas a 37°C por 6 horas e foram avaliadas a cada 60 minutos quanto a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP). Para as análises foram utilizados o aparelho CASA (Computer Assisted Semen Analysis, CASA, Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelone, Spain) e microscopia de fluorescência utilizando carboxifluoresceína (C5041, Sigma-Aldrich®) e iodeto de propídeo (PI; P4170, Sigma-Aldrich®). Para a análise estatística os grupos foram agrupados por similaridade entre grupos 0-2h e 3-6h. Nos dois momentos e para todas as concentrações de urina, os grupos diluídos apresentaram resultados significativamente superior aos grupos puros ($p < 0,001$). Para MT, não houve diferença estatística entre os grupos CT e G5 nos grupos diluído e puro ($82,0 \pm 11,7$; $77,0 \pm 13,6$ e $60,1 \pm 25,3$; $51,0 \pm 30,5$) no primeiro intervalo, mas houve superioridade dos diluídos em relação aos puros para os mesmos grupos. Esses padrões se repetem para MP e RAP (MP: $28,4 \pm 12,8$; $24,8 \pm 13,5$ e $13,3 \pm 11,6$; $11,0 \pm 12,0$; RAP: $48,5 \pm 17,0$; $41,7 \pm 18,2$ e $26,6 \pm 21,6$; $21,7 \pm 21,6$). A partir de 3 horas o grupo controle já se destaca em relação aos outros, mas ainda com superioridade das amostras diluídas em relação às puras. A contaminação do sêmen com urina altera o pH e a osmolaridade da solução, dessa forma, é esperado que quanto maior a contaminação, maiores os efeitos deletérios à célula espermática. Além disso, alguns autores sugerem que a presença de urina no sêmen seja capaz de induzir a capacitação pela maior força iônica da solução. Dessa forma, é possível observar e concluir que os efeitos deletérios da urina no sêmen apresentam uma relação inversamente proporcional ao aumento da concentração, intensificando com o passar do tempo. Nesse sentido, a diluição do sêmen contaminado deve ser feita para equilibrar o pH e a osmolaridade e conferir maior proteção. Amostras livres de contaminação e contaminadas com até 5% de urina não apresentam diferença estatística quanto à motilidade total, progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos, quando diluídas e avaliadas até 2h após a coleta. Mais estudos devem ser realizados para avaliar se diferentes proporções de diluição podem aumentar o tempo de viabilidade dessas amostras contaminadas ou conferir melhor proteção em amostras com maior porcentagem de urina.

Palavras-chave: Garanhão, urospermia, espermatozoide.

Agradecimentos: Agradecimentos às agências de fomento CAPES e FAPESP

Effect of different urine concentrations on fresh equine semen incubated at 37°C

Thayná Grazielle Rodrigues Miranda¹, Anna Júlia Souza de Oliveira¹, Pedro Thomaz Ladislau¹, Amanda Carvalho Silva^{2*}, Bruna Merc de Zutter², Marina Lucena Frédou², Rogeiro Araújo de Almeida Filho², Fernanda Saules Ignacio², Gabriel Augusto Monteiro²

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: amanda.carvalho-silva@unesp.br

Urospermia, a reproductive dysfunction responsible for semen contamination with urine, is one of the main causes of subfertility in horses, in addition to causing economic losses. Induced urination or the use of medicine to increase the tone of the external urethral sphincter, to prevent urination or alter urine production, are some management alternatives for urospermic animals. However, neither approach guarantees that semen will not be contaminated. In this sense, it is necessary to understand the deleterious effects of urine on semen and the processes that can be performed to minimize these effects. This study used 12 stallions, one ejaculate from each, each seminal sample was divided into 5 aliquots: control group (Ct), without addition of urine; group with addition of 5% urine (G5); group with addition of 10% urine (G10); group with addition of 20% urine (G20); and group with addition of 50% urine (G50). The samples were incubated at 37°C for 10 minutes and divided into two groups, a group called pure in which they were kept as they were (Pu), and a Diluted group (Di) in which they were diluted in BotuSêmen® (Botupharma, Brazil) in the proportion 1:1. The samples from the 10 groups remained incubated at 37°C for 6 hours and were evaluated every 60 minutes for total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), mean path velocity (VAP), linear velocity (VSL), percentage of fast sperm (RAP) and plasma membrane integrity (IMP). The CASA (Computer Assisted Semen Analysis, CASA, Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Spain) and fluorescence microscopy using carboxyfluorescein (C5041, Sigma-Aldrich®) and propidium iodide (PI; P4170, Sigma-Aldrich®) were used for the analyses. For statistical analysis, the groups were grouped by similarity between the 0-2h and 3-6h groups. At both times and for all urine concentrations, the diluted groups had significantly superior results to the pure groups ($p < 0.001$). For MT, there was no statistical difference between the CT and G5 groups in the diluted and pure groups (82.0 ± 11.7 ; 77.0 ± 13.6 and 60.1 ± 25.3 ; 51.0 ± 30.5) in the first interval, but there was superiority of the diluted groups in relation to the pure groups for the same groups. These patterns are repeated for MP and RAP (PM: 28.4 ± 12.8 ; 24.8 ± 13.5 and 13.3 ± 11.6 ; 11.0 ± 12.0 ; RAP: 48.5 ± 17.0 ; 41.7 ± 18.2 and 26.6 ± 21.6 ; 21.7 ± 21.6). After 3 hours, the control group already stands out in relation to the others, but still with superiority of the diluted samples in relation to the pure ones. Contamination of semen with urine alters the pH and osmolarity of the solution, thus, it is expected that the greater the contamination, the greater the deleterious effects on the sperm cell. Furthermore, some authors suggest that the presence of urine in semen is capable of inducing capacitation due to the greater ionic strength of the solution. Thus, it is possible to observe and conclude that the deleterious effects of urine on semen are inversely proportional to the increase in concentration, intensifying over time. In this sense, contaminated sperm should be diluted to balance pH and osmolarity and provide greater protection. Samples free of contamination and contaminated with up to 5% urine do not present statistics regarding total and progressive motility and percentage of fast sperm when diluted and evaluated up to 2 hours after collection. Further studies should be conducted to evaluate whether different dilution proportions can increase the sampling time of these contaminated samples or provide better protection in samples with a higher percentage of urine.

Keywords: Stallion, urospermia, sperm.

Agradecimentos: Thanks to the funding agencies CAPES and FAPESP

Comportamento de garanhões durante a coleta de semen pré e pós- suplementação com compostos naturais e antioxidantes

Joyce Augusto Macedo¹, Cássia Maria Barroso Orlandi¹, Gian Franco Zanon², Kathery Brennecke¹, Vando Edésio Soares¹, Cely Marini Melo e Oña³, Carla Fredrichsen² Cynthia Pieri Zeferino¹

¹Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP, Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP. ²Universidade Federal do Mato Grosso³, UFMT, Cuiabá, MT. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UNICENTRO, Guarapuava, PR⁴

*E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Resumo

Foram utilizados quatro garanhões adultos da raça Quarto de Milha, com pesos entre 416 a 505 kg e maturidade sexual ativa (6 a 24 anos), durante a rotina de colheita de semen. O período pré e pós-suplementação consistiram em oito colheitas de semen sucessivas, com intervalo de 48 horas. Entre o período inicial e final de suplementação (75 dias), os animais receberam 6 kg/dia de ração comercial peletizada, com suplementação (45 g do produto/dia) à base de L-carnitina (334g/kg), beta caroteno (44,5 g/kg), ácido fólico (1200 mg/kg), vitamina C (22,3 g/kg) e vitamina E (27800 UI/kg). O repertório comportamental (intervalo e número) foi registrado por meio de avaliação dos vídeos gravados durante a colheita, considerando desde a higienização, monta, coleta de semen ao término do procedimento. O modelo “quase experimento” foi utilizado no delineamento, sendo os dados avaliados por meio da comparação entre os tratamentos nos diferentes momentos e as médias das variáveis submetidas ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de 5% ($P < 0,05$) de probabilidade. No período pós-suplementação, os garanhões expuseram o pênis ao chegarem na sala de coleta ou mesmo ao saírem da baía de maneira mais rápida. No entanto, similaridade no tempo de lavagem, com dispersão homogênea no período pós-suplementação foi observada. Os garanhões foram conduzidos ao manequim para a monta de forma menos demorada durante o período pós-suplementação; no qual os dados se comportaram de forma mais homogênea. Tal fato representa regularidade quanto a monta e a coleta na vagina artificial; o que contribui para o manejo e possivelmente resulta em colheita de semen menos variável, com maior previsibilidade das reações à equipe e ambiente. A variável intervalo de tempo (segundos) para contração glútea, movimento de cauda e sapatamento, foram similares entre os períodos pré e pós-suplementação. No entanto, resultados sugerem que os garanhões pós-suplementados realizaram o mesmo número de movimentos em menor período de tempo durante a monta. Desta forma, resultando em ejaculação após a monta no manequim, de maneira mais rápida. Fato o qual, pode influenciar positivamente na colheita de semen, quanto características do ejaculado (quantidade de gel, volume e concentração). Tais comportamentos estão diretamente relacionados à performance reprodutiva e foram influenciados positivamente pelo condicionamento e suplementação.

Palavras-chave: Ejaculado. Equino. Etologia. Nutracêutico. Performance. Reprodução

Agradecimentos: À Noveq, saúde e nutrição animal, Descalvado SP; pelo fornecimento do suplemento e Centro de Reprodução de Garanhões, Gian Zanon, Araraquara SP, pelo fornecimento da infra- estrutura e dos animais.

Stallion behavior during semen collection pre and post- supplementation with natural compounds and antioxidant

Joyce Augusto Macedo¹, Cássia Maria Barroso Orlandi¹, Gian Franco Zanon², Kathery Brennecke¹, Vando Edésio Soares¹, Cely Marini Melo e Oña³, Carla Fredrichsen² e Cynthia Pieri Zeferino¹

¹Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP. ²Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP. ³ Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, MT. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UNICENTRO, Guarapuava, PR⁴
*E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Abstract

The stallion performance and semen processing out of the breeding season period is essential for optimizing reproductive service and management. The study described the reproductive behavior of stallions during semen collection pre and post-supplementation with natural compounds and antioxidant. Four adult Quarter Horse stallions weighing between 416 and 505 kg and active sexual maturity (6 to 24 years) were used during the routine of semen collection in a breeding center. The experiment performed in a commercial stud farm, located in the city of Araraquara, SP. The pre and post-supplementation (suppl) period consisted of eight successive semen collections, with an interval of 48 hours. Between the initial and final period (75 days), the animals received 6 kg/day of commercial pelleted feed, with supplementation (45 g of the product/day) based on L-carnitine (334g/kg), beta carotene (44, 5 g/kg), folic acid (1200 mg/kg), vitamin C (22.3 g/kg) and vitamin E (27800 IU/kg). The behavioral repertoire (interval and number) was registered by evaluating the videos recorded during the collection, considering variables since hygiene management, mounting, semen collection and completion of the procedure. A “Quasi- Experimental Design” compared conditions and stallion behavior pre and post suppl. The behavior repertoire data was evaluated by comparing treatment in different moments and the variable means were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis test, at the level of 5% (P<0.05) of probability. Stallions penis exposure was more rapid after suppl, specialty when animals were out of the stalls, and entering the collection area. However, lavage timing were similar, presenting homogeneous dispersion post suppl. Conduction of stallions was less timing – consuming post suppl; with homogeneous data. Thus, regularity regarding mounting and artificial vagina collection were detected; which contribute for management and possible less variable semen collection, leading to more predictability reactions to the ambiance and team working. The time interval (seconds) for gluteal contraction, tail movement and tap dancing were similar between pre and post suppl. However, results suggested that at post suppl, the stallion presented the same numbers of movement within a reduced time period during mounting, resulting in rapid ejaculation. This fact can positively influence semen collection, as far as ejaculate characteristics (gel, volume and concentration). The behavior described are direct related to reproductive performance and were influenced positively by conditioning and suppl.

Keywords: Ejaculated. Equine. Ethology. Nutraceutical. Performance. Reproduction.

We wish to thank, Noveq Animal health and nutrition, Descalvado SP; which provides the supplementation and also we would like to thank's The Stallion Reproductive Center, Gian Zanon, Araraquara SP, which provided infrastructure and animals.

Influência da ambiência na concentração e volume de sêmen de garanhões da raça Quarto de Milha

Bárbara Martins Duarte¹; Cássia Maria Barroso Orlandi²; Gian Franco Zanon³; Cynthia Pieri Zeferino²; Vando Edésio Soares²; Gerson Carlos Schalch Franceschini⁴; Cely Marini Melo e Oña⁵ e Kathery Brennecke²
¹De Cillo Equine Clinic, Hempstead Texa, USA; ²Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal

Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP; ³Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP; ⁴Noveq, Descalvado SP;
⁵Universidade Federal do Mato Grosso³, UFMT, Cuiabá, MT
E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de condições microclimáticas sobre volume e concentração espermática em garanhões da raça Quarto de Milha. O experimento foi conduzido em um haras comercial localizado no município de Araraquara, estado de São Paulo, durante o outono, período caracterizado por amplitudes térmicas e flutuações ambientais. Foram utilizados quatro garanhões adultos, mantidos em baias individuais, submetidos previamente a um nivelamento biológico, com finalidade de esgotar as reservas extragonadais, garantindo maior precisão nos parâmetros seminais avaliados. Para tal, os animais passaram por sessões diárias de montas simuladas utilizando um manequim. Após esse período, foram realizadas 11 coletas de semen consecutivas. Durante cada coleta, foram registradas variáveis do clima local como temperatura ambiente, temperatura de globo negro, temperatura de ponto de orvalho, umidade relativa, velocidade do vento, utilizando instrumentos calibrados, permitindo o cálculo de três índices de ambiência amplamente utilizados na literatura: o Índice de Temperatura e Umidade (ITU), o Índice de Temperatura de Globo Negro e Umidade (ITGU) e a Carga Térmica Radiante (CTR). As amostras de sêmen foram analisadas quanto ao volume total (mL) e à concentração espermática (10^6 células/mL), manualmente pela câmara de Neubauer. A análise estatística foi conduzida por meio da correlação de Pearson ($p < 0,05$), com o intuito de identificar associações entre as variáveis ambientais e os parâmetros seminais. Os resultados médios de ITU, ITGU e CTR foram de 76,24, 66,75 e 442,02 W.m², respectivamente e a CTR revelou correlação positiva significativa com o volume ejaculado ($p=0,0289$) indicando que, à medida que aumentam os valores desses índices, o volume de sêmen também tende a aumentar. Embora a correlação do ITGU com o volume do semen não tenha sido caracterizada por diferenças significativas a 5% ($p = 0,0538$), esta correlação foi significativa a 10%. Concluiu-se que os índices de ambiência apresentaram relação direta com as características do semen em garanhões da raça Quarto de Milha. A utilização dos índices ITU, ITGU e CTR mostrou-se eficaz na previsão de alterações seminais, podendo contribuir para o aprimoramento das condições de manejo, sobretudo em regiões de clima tropical ou subtropical, onde as variações ambientais são acentuadas.

Palavras-chave: ambiência térmica, equinos, índice bioclimático, reprodução assistida, semen equino.

Influence of the environment on the semen concentration and volume of Quarter Horse Stallions

Barbara Martins Duarte¹; Cássia Maria Barroso Orlandi²; Gian Franco Zanon³; Cynthia Pieri Zeferino²; Vando Edésio Soares²; Gerson Carlos Schalch Franceschini⁴; Cely Marini Melo e Oña⁵ e Kathery Brennecke²

¹De Cillo Equine Clinic, Hempstead Texa, USA; ²Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP; ³Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP; ⁴Noveq, Descalvado SP; ⁵Universidade Federal do Mato Grosso³, UFMT, Cuiabá, MT
E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Abstract

The present study aimed to evaluate the influence of microclimatic conditions on seminal parameters of Quarter Horse stallions, with emphasis on the effects of thermal environment indices on semen volume and sperm concentration. The experiment was conducted at a commercial stud farm located in the municipality of Araraquara, São Paulo State, Brazil, during the autumn season, a period characterized by thermal amplitude and environmental fluctuations. Four adult stallions were used, housed in individual stalls and previously subjected to a biological leveling process intended to deplete extragonadal sperm reserves, ensuring greater precision in the evaluated seminal parameters. To this end, the animals underwent daily sessions of simulated mounts using a dummy mare to standardize the sperm load. Following this period, eleven consecutive semen collections were carried out, always at the same time of day, in order to minimize circadian interference. During each collection, local climate variables such as ambient temperature, black globe temperature, dew point temperature, relative humidity, and wind speed were recorded using calibrated instruments, allowing for the calculation of three thermal comfort indices widely referenced in the literature: the Temperature and Humidity Index (THI), the Black Globe Temperature and Humidity Index (BGHI), and the Radiant Heat Load (RHL). The semen samples were analyzed for total volume (mL) and sperm concentration (10^6 cells/mL) using Neubauer chamber. Statistical analysis was done by Pearson's correlation ($p < 0.05$), in order to identify associations between environmental variables and seminal parameters. Mean values of THI, BGHI and RHL were respectively 76.24, 66.75 e 442.02 W.m². And in this context, RHL presented positive correlation with ejaculate volume ($p = 0.0289$) indicating that as the index values are increased, semen volume also increase. However, it is relevant to affirm that BGHI and semen volume was not characterized by significant correlation at 5% ($p = 0.0538$), this correlation was significant at 10%. In conclusion, ambience index presented a direct relation with semen characteristic in Quarter Horse Stallions, and the use of THI, BGHI and RHL were satisfactory to preview seminal alterations, which could contribute to better management conditions, specialty in regions with tropical and subtropical climate, with exacerbated ambience variations.

Keywords: thermal environment, equines, bioclimatic index, assisted reproduction, equine semen.

Abordagem diagnóstica da azoospermia em garanhão: Análises e procedimentos clínicos

Thaini Barbosa Costa¹; Gustavo Romero Gonçalves²; Maria Clara Bressan³; Denis Vinícius Bonato⁴

¹Pós Graduada em Reprodução Animal - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP; ²Docente do Centro Universitário Ingá (UNINGA), Maringá, PR; ³Medica Veterinária Autônoma, Maringá, PR; Docente do Programa de Pós Graduação de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR

*E-mail: thainibarbosa27@gmail.com

A azoospermia, condição caracterizada pela ausência de células espermáticas no ejaculado, representa um desafio na rotina diagnóstica e fertilidade dos machos. O problema pode ser causado por processos degenerativos, obstrutivos, distúrbios endócrinos, uso de anabolizantes, entre outros. O objetivo do presente relato é descrever a abordagem diagnóstica feita em um caso de azoospermia. Foi atendido um garanhão, da raça quarto de milha, de 19 anos de idade, pesando 370 Kg, criado a pasto, com histórico de resultados negativos em coletas de embriões de éguas cobertas e inseminadas com sêmen do animal. Desta forma, a abordagem inicial foi feita através do exame físico geral do animal, sem que apresentasse nenhuma alteração em parâmetros vitais. Em seguida, prosseguiu-se com o exame específico do sistema reprodutor, sem que fosse possível evidenciar alterações durante a inspeção de prepúcio, pênis e escroto, com testículos visivelmente simétricos e em posição correta. Na palpação testicular foi possível notar uma alteração de consistência macia mais evidente no testículo esquerdo, não apresentando a classificação esperada, tenso elástica. Além disso, o animal não manifestou desconforto e nem a presença de aumento de temperatura local. Como exames complementares, optou-se pela realização do hemograma completo e bioquímicos (AST; GGT; ureia; creatinina e bilirrubinas), ultrassonografia testicular, coleta de sêmen e espermograma. Não houveram alterações nos exames de sangue solicitados. Em relação a ultrassonografia testicular foi possível observar um parênquima de ecogenicidade homogênea, com a presença de quantidade moderada de pontos hiperecogênicos em seu interior e medida de largura do testículo esquerdo inferior (33,69 mm) ao testículo direito (39,86 mm), além da presença de irrigação sanguínea por todo o parênquima, assim como em cordões espermáticos, sem evidenciar alterações na avaliação doppler. Em seguida, foi feita a limpeza peniana com água e coleta de sêmen do animal utilizando uma égua em cio a partir do uso da vagina artificial (botupharma®) com água aquecida a 55°C. Foi possível observar a presença de libido, comportamento e tempos de excitação, ereção, monta e ejaculação dentro do padrão para a espécie, porém, o ejaculado apresentou alterações visuais em sua densidade, aspecto e coloração, sendo notado um sêmen ralo, aquoso e levemente esbranquiçado, respectivamente, além de grande quantidade de gel. O material foi analisado em microscópio óptico binocular e não foram encontrados espermatozoides na lâmina. Sendo assim, diante dos achados de exame andrológico foi possível estabelecer o diagnóstico de azoospermia no animal avaliado, o que justificava a queixa do proprietário quanto a dificuldade em obter produtos das inseminações e coberturas deste garanhão. A partir daí, é possível investigar a causa do problema a fim de conduzir o tratamento adequado do animal e o seu acompanhamento, o qual deve ser feito com novas coletas durante e após a finalização do tratamento estipulado. Por fim, de acordo com o caso apresentado, pode se observar a importância da exploração dos métodos diagnósticos realizados, além também do acompanhamento veterinário baseado num diagnóstico assertivo, o que irá permitir designar um prognóstico mais preciso sobre sua saúde reprodutiva.

Palavras chave: Parênquima, Sistema reprodutor, Ultrassom, Vagina Artificial.

Diagnostic Approach to Azoospermia in Stallions: Analyses and Clinical Procedures

Thaini Barbosa Costa¹; Gustavo Romero Gonçalves²; Maria Clara Bressan³; Denis Vinícius Bonato⁴

¹Graduate Student in Animal Reproduction – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil; ²Faculty Member at Centro Universitário Ingá (UNINGÁ), Maringá, PR, Brazil; ³Independent Veterinary Physician, Maringá, PR, Brazil;

⁴Faculty Member of the Graduate Program in Veterinary Medicine at Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR, Brazil
*E-mail: thainibarbosa27@gmail.com

Azoospermia, a condition characterized by the absence of sperm cells in the ejaculate, represents a challenge in the diagnostic routine and fertility evaluation of males. This condition may be caused by degenerative or obstructive processes, endocrine disorders, anabolic steroid use, among others. The objective of this case report is to describe the diagnostic approach used in a case of azoospermia. A 19-year-old Quarter Horse stallion, weighing 370 kg, raised on pasture, was presented with a history of negative embryo collection results from mares that had been both naturally bred and inseminated with his semen. The initial diagnostic approach began with a general physical examination, which revealed no abnormalities in vital parameters. Next, a specific examination of the reproductive system was performed. No visible alterations were observed during inspection of the prepuce, penis, and scrotum. The testes appeared symmetrical and in the correct position. Upon testicular palpation, a soft consistency was noted, more evident in the left testis, which deviated from the expected firm-elastic classification. No signs of discomfort or local temperature increase were observed. Complementary diagnostic tests included a complete blood count and biochemical profile (AST, GGT, urea, creatinine, and bilirubins), testicular ultrasonography, semen collection, and a spermogram. The blood tests showed no abnormalities. Testicular ultrasonography revealed a homogeneous echogenic parenchyma with a moderate number of hyperechogenic points. The width of the left testicle (33.69 mm) was smaller than that of the right testicle (39.86 mm). Blood flow was present throughout the parenchyma and in the spermatic cords, with no alterations detected in the Doppler evaluation. Semen was collected after penile cleansing using a mare in estrus and a warmed artificial vagina (Botupharma®) at 55°C. The stallion exhibited normal libido and typical sexual behavior, including excitation, erection, mounting, and ejaculation times consistent with the species. However, the ejaculate showed abnormal visual characteristics, including low density, a watery appearance, and a slightly whitish coloration, as well as a large amount of gel fraction. Microscopic analysis of the semen using a binocular optical microscope revealed no spermatozoa in the sample. Based on the findings from the andrological examination, a diagnosis of azoospermia was established for the stallion, which explained the owner's complaint regarding the failure to obtain embryos from breedings and inseminations. From this point, further investigation into the underlying cause of the condition is necessary to guide appropriate treatment and follow-up. Follow-up should include additional semen collections during and after the treatment period. This case underscores the importance of a thorough diagnostic workup and veterinary monitoring based on a precise diagnosis, which allows for a more accurate prognosis regarding reproductive health.

Keywords: Parenchyma, Reproductive system, Ultrasound, Artificial vagina

Avaliação do semen fresco e criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha suplementados com L-Carnitina, Fertilmax®

Gisele Monsueth Melo¹; André Crespilha²; Gian Franco Zanon³; Audrey Martins Salgado⁴; Kathery Brennecke¹; Vando Edésio Soares¹; Cely Marini Melo e Oña⁴; Liandra Maria Abaker Bertipaglia¹; Carla Fredricksen⁵; Cássia Maria Barroso Orlandi¹

¹Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP, ²VETSEMEN, São Paulo, SP; ³Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP. ⁴Universidade Federal do Mato Grosso³, UFMT, Cuiabá, MT. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UNICENTRO, Guarapuava, PR⁵

*E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Criopreservação do semen antes do período de monta natural pode otimizar o uso de biotecnologias na estação reprodutiva. No entanto, os garanhões podem se beneficiar da suplementação com antioxidantes e compostos naturais, principalmente fora da estação. Para tanto, a dieta de quatro garanhões da raça Quarto de Milha foi acrescida da suplementação durante 75 dias com produto comercial: Ácido Fólico, Beta Caroteno, L-Carnitina, Linhaça Integral Moída, Vitamina C e Vitamina E. O período de suplementação foi de 75 dias com fornecimento de 45 g do produto seco, em forma de pó em sachês (Fertilmax®, Noveq - Saúde e Nutrição Animal Ltda) em dose única diária, junto ao concentrado (2kg) pela manhã. O produto é indicado como suplemento mineral, vitamínico e aminoácido para equinos machos e fêmeas em idade reprodutiva, sendo sua composição e níveis de garantia por Kg nas concentrações mínimas de consumo respectivamente: Ácido fólico (1200 mg/kg), Beta caroteno (44,5 g/kg), L-carnitina com complementos fitoterápicos (334g/kg), vitamina C (22,3 g/kg) e vitamina E (27800 UI/kg). O período experimental teve início com coletas de sêmen para nivelamento biológico basal, seguidas de coletas para processamento e criopreservação dos ejaculados (fase 1). Após a fase 1, iniciou-se a suplementação e ao término da mesma, prosseguiram-se novamente as coletas de nivelamento basal (n= 6 coletas x 4 = 24) e coletas para processamento e criopreservação (n=24) sucessivamente. Embora, total de 96 ejaculados foram obtidos no estudo, apenas 24 pré- supl e 24 pós- suplementação foram criopreservados e comparados pós descongelação. Variáveis do semen fresco foram analisadas imediatamente pós coleta e submetidas à representação por box plot, sem diferenças significativas. Após a descongelação das palhetas, processadas nos respectivos momentos pré e pós suplementação, o semen foi submetido à avaliação da cinética CASA (Análise espermática computadorizada). Outras variáveis envolvendo integridade de membrana plasmática por fluorescência e morfologia por contraste de fase foram determinadas, embora não apresentaram diferenças significativas. Dados do semen criopreservado foram submetidos ao PROC MIX, SAS; revelando diferenças significativas quanto às variáveis da cinética CASA: motilidade, velocidade e amplitude de movimento (superiores para o momento pré versus pós supl) e linearidade, retilinearidade (superiores para o momento pós versus pré supl).

Palavras-chave: ejaculado, equino, congelação e L- carnitina

Agradecimentos: À Noveq, saúde e nutrição animal, Descalvado SP; pelo fornecimento do suplemento, Botupharma, Botucatu, SP, pelo fornecimento dos meios diluidores; Centro de Reprodução de Garanhões, Gian Zanon, Araraquara SP, pelo fornecimento da infra- estrutura e dos animais.

Evaluation of fresh and cryopreserved semen from stallions supplemented with L- Carnitine, Fertimax®

Gisele Monsueth Melo¹; André Crespilho²; Gian Franco Zanon³, Audrey Martins Salgado⁴; Kathery Brennecke¹, Vando Edésio Soares¹, Cely Marini Melo e Oña⁴, Liandra Maria Abaker Bertipaglia¹, Carla Fredricksen⁵, Cássia Maria Barroso Orlandi¹

¹Mestrado *stricto sensu* Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, campus Descalvado, SP. ²VETSEMEN, São Paulo, SP; ³Central de Garanhões Gian Zanon, Araraquara, SP. ⁴Universidade Federal do Mato Grosso³, UFMT, Cuiabá, MT. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UNICENTRO, Guarapuava, PR⁵

*E mail: cassiamariabarrosoorlandi@gmail.com

Semen cryopreservation before the period of natural mounting can optimize the use of biotechnology during the reproductive period. However, stallions can be improved, as far as supplementation (supp) with antioxidants and herbal supplements; specialty out of the reproductive season. Thus, the diet of four Quarter Horse Stallions was supplemented during 75 days by a commercial product: Folic acid, Beta carotene, L- carnitine, milled whole flaxseed, Vitamin C and E. The dry product, powder 45 g, (Fertimax®, Noveq - Saúde e Nutrição Animal Ltda) single dose, was administered with grain (2kg) in the morning. The product has been indicated as a mineral supplement, vitamin, and amino acid for mares and stallions in reproductive activity. Follows composition and guarantee levels (kg) of the product, with minimal concentrations for consumption, respectively: Folic acid (1200 mg/kg), Beta carotene (44.5 g/kg), L-carnitine com herbal supplements (334g/kg), vitamin C (22.3 g/kg) and vitamin E (27800 UI/kg). Experimental period initiated with semen being collected for basal biological leveling (exhaustion of sperm reserves), followed by semen collection for cryopreservation (phase 1). After this period, the supp was initiated and at its finalization, a new phase was performed by basal biological leveling (n= 6 collection x 4= 24) and semen collection for cryopreservation (n=24) successively. Despite the fact that 96 ejaculates were obtained, only 24 pre and post supp were cryopreserved and compared after thawing. Fresh semen variables were analyzed immediately after collection, and submitted to Box Plot representation, without significant differences. After thawing semen straws, previously processes in respective moments pre and post supp, were then submitted to CASA (Computerized assisted sperm analysis) and kinetics variables were determined. Other variables: sperm plasma membrane integrity, were assessed by fluorescent probes and morphology by phase contrast microscopy, but no significant differences were found. Criopreserved semen data was submitted to PROC MIX, from SAS; and resulted in significant differences as far as variables from kinetics by CASA: motility, velocity, movement amplitude (superior for pre vs post supp) and linear and rectilinear (superior at post *versus* pre supp).

Key words: ejaculates, equine, freezing and L carnitine.

Identificação e caracterização de subpopulações morfométricas de espermatozoides em sêmen fresco e pós descongelação de jumentos

Fernando Eiras de Barros Pinto¹, Vinicius Wagner Silva², Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo³, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira⁴, Fábio Morotti^{5,6}, Maria Isabel Mello Martins^{2,6}, Camila Bortoliero Costa^{7*}

¹Mestrando do programa Saúde e Produção Animal pela Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Arapongas, Brasil; ²Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida – LARAA-UEL, Londrina, Brasil; ³Docente, Setor de Medicina Veterinária, CCA-UENP, Bandeirantes, Brasil; ⁴Médico Veterinário Autônomo, São Paulo, Brasil; ⁵Laboratórios de Reprodução e Biotecnologia da Reprodução Animal – REPROA-UEL, Londrina, Brasil; ⁶Docente, Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL, Londrina, Brasil; ⁷Docente, Departamento de Zootecnia, CCA-UEL, Londrina, Brasil

*Email: cbortoliero@gmail.com

A abordagem clássica de que o ejaculado é composto por população homogênea com distribuição estatística normal e que utiliza valores médios para classificar e/ou avaliar ejaculados submetidos a criopreservação tem sido considerada desatualizada, sendo indicadas as análises multivariadas, utilizando-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e/ou métodos de agrupamento, como *clustering* de dados (*K-means*, Ward) para abordagens descritivas. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar, quanto à morfometria, as subpopulações espermáticas de jumentos da raça Pêga a fresco e após descongelação. Foram utilizados seis jumentos da raça Pêga, as amostras de sêmen foram obtidas a partir de três ejaculados de cada um dos animais. As amostras foram avaliadas imediatamente após a colheita, o grupo a fresco (GF), e após descongelação, grupo criopreservado (GC). Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi diluído na proporção 1:1 em extensor comercial (Botusêmen[®], Botupharma, São Paulo) e centrifugado a 600x g por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em meio de congelamento para equinos (Botucurio[®], Botupharma, São Paulo) na concentração final de 200x10⁶ spz/mL, o envase em palhetas de 0,5 mL, as quais foram refrigeradas, a 5 °C / 20 minutos e congeladas em vapor de nitrogênio (N₂) por 15 minutos a 6 cm e mais 15 minutos a 3 cm da coluna N₂ em caixa de poliestireno expandido tampada (45 litros), imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico. A descongelação foi realizada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Para avaliação da morfometria espermática, foram realizados esfregaços das amostras em lâmina de vidro coradas com eosina-negrosina na proporção de 1:1 (Botuvital[®], Botupharma, São Paulo). Foram analisados 100 espermatozoides com morfologia normal de cada grupo (GF e GC). A mensuração das células foi dada por meio de câmera Olympus Q-Color3[®] QImaging MP Q38071 (Olympus America Inc. EUA) acoplada em microscópio óptico sob um aumento de 1000x, utilizando-se o software Olympus cellSens Standard 1.15[®] (Olympus America Inc. EUA). Por meio do software foi mensurado comprimento de cabeça (HL), largura de cabeça (HW), comprimento de peça intermediária (MP), comprimento de cauda (TL) e área de cabeça (HS). A elipticidade (Ellip) foi obtida pela razão HL/HW. Primeiramente realizou-se a análise dos componentes principais dos dados, em que foram retidas três componentes principais (PC) tanto para GF, quanto para GC. Em seguida, realizou-se o *clustering* pelo método *K-means*, que identificou quatro subpopulações (1, 2, 3, 4) no GF e duas subpopulações (5, 6) no GC. Os dados foram analisados no software R Studio[®] (2024), versão 4.3.3. Os componentes principais PC1 e PC2, associaram-se respectivamente ao formato de cabeça dos espermatozoides, com altas cargas para largura da cabeça (HW) e elipticidade da cabeça (Ellip) e ao tamanho da cabeça, com altas cargas para HL e HS. Por fim, PC3 associou-se a uma relação inversa existente entre peça intermediária (MP) e comprimento da cauda (TL). Os componentes mantiveram essas características tanto a fresco (GF) como pós descongelação (GD). Para GF, 27,94% era subpopulação 1, caracterizada por células com formato de cabeça levemente arredondado (-0,292), um tamanho de cabeça elevado (1,034) e células com cauda comprida e peça intermediária curta (-0,575). Cerca de 27,10% da subpopulação 2 com cabeças mais largas e arredondadas (-0,680) e de pequeno tamanho (-1,065), células com caudas longas e peças intermediárias curtas (-0,350). Sendo 15,62% da subpopulação 3 caracterizada por células com formato de cabeça bastante arredondado (-0,712), tamanho modesto (0,383) e com caudas curtas e peças intermediárias longas (1,387). E 29,34% da subpopulação 4 com as cabeças elípticas (1,475), com tamanho relativamente pequeno (-0,209) e peça intermediária e cauda de tamanhos medianos (-0,006). Para GC, 55% eram da subpopulação 5, que tinha como característica células com a maior largura de cabeça (-0,944) dentre as subpopulações identificadas, cabeças de tamanho mediano (-0,0002) e caudas compridas e peças intermediárias curtas (-0,125). Sendo que 45% eram da subpopulação 6, que eram células com cabeças acentuadamente elípticas (0,977), de tamanho mediano (-0,068), assim como de MP e TL (-0,041). A distribuição equilibrada entre as subpopulações no sêmen a fresco (GF) denota uma grande heterogeneidade entre as subpopulações espermáticas. Após a descongelação (GD) foram caracterizadas duas subpopulações, em proporções semelhantes (55% e 45%), indicando que ocorreu maior homogeneidade nas características morfométricas dos espermatozoides. As alterações nas subpopulações espermáticas de asininos indicam que as células espermáticas sofreram estresse celular durante a criopreservação.

Palavras-chave: Asininos, criopreservação, ejaculado.

Identification and characterization of morphometric sperm subpopulations in fresh and post-thaw donkey semen

Fernando Eiras de Barros Pinto¹, Vinicius Wagner Silva², Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo³, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira⁴, Fábio Morotti^{5,6}, Maria Isabel Mello Martins^{2,6}, Camila Bortoliero Costa^{7*}

¹Master's student in the Animal Health and Production program at Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Araçongas, Brazil; ²Laboratory of Andrology and Assisted Animal Reproduction - LARAA-UEL, Londrina, Brazil; ³Faculty Member, Department of Veterinary Medicine, CCA-UENP, Bandeirantes, Brazil; ⁴Independent Veterinarian, São Paulo, Brazil; ⁵Laboratory of Animal Reproduction and Reproductive Biotechnology – REPROA-UEL, Londrina, Brazil; ⁶Faculty Member, Department of Veterinary Clinics, CCA-UEL, Londrina, Brazil; ⁷Faculty Member, Department of Animal Science, CCA-UEL, Londrina, Brazil
*Email: cbortoliero@gmail.com

The classical approach that considers the ejaculate as a homogeneous population with a normal statistical distribution and uses mean values to classify and/or evaluate cryopreserved ejaculates has been regarded as outdated. Multivariate analyses, such as Principal Component Analysis (PCA) and/or clustering methods (K-means, Ward) for descriptive approaches, are now recommended. The aim of this study was to identify and characterize, in terms of morphometry, the sperm subpopulations in fresh and post-thaw semen of Pêga breed donkeys. Six Pêga donkeys were used, and semen samples were obtained from three ejaculates per animal. The samples were evaluated immediately after collection—fresh group (FG)—and after thawing—cryopreserved group (CG). Immediately after collection, the ejaculate was diluted at a 1:1 ratio in a commercial extender (Botusêmen®, Botupharma, São Paulo) and centrifuged at 600 × g for 10 minutes. The pellet was resuspended in equine freezing medium (Botucio®, Botupharma, São Paulo) to a final concentration of 200 × 10⁶ sperm/mL, loaded into 0.5 mL straws, refrigerated at 5 °C for 20 minutes, and frozen in nitrogen vapor (N₂) for 15 minutes at 6 cm and an additional 15 minutes at 3 cm above the liquid nitrogen column in a closed polystyrene box (45 liters). The straws were then immersed in liquid nitrogen and stored in a cryogenic tank. Thawing was performed in a water bath at 37 °C for 30 seconds. To evaluate sperm morphometry, smears were made on glass slides and stained with eosin-nigrosin at a 1:1 ratio (Botuvital®, Botupharma, São Paulo). One hundred morphologically normal spermatozoa were analyzed per group (FG and CG). Cell measurements were taken using an Olympus Q-Color3® QImaging MP Q38071 camera (Olympus America Inc., USA) attached to a light microscope at 1000× magnification, using Olympus cellSens Standard 1.15® software (Olympus America Inc., USA). Measured parameters included head length (HL), head width (HW), midpiece length (MP), tail length (TL), and head area (HS). Ellipticity (Ellip) was calculated as the ratio HL/HW. The PCA was initially performed on the data, retaining three principal components (PC) for both FG and CG. Subsequently, K-means clustering identified four subpopulations (1, 2, 3, 4) in the FG and two subpopulations (5, 6) in the CG. Data were analyzed using R Studio® (2024), version 4.3.3. Principal components PC1 and PC2 were associated respectively with sperm head shape, with high loadings for HW and Ellip, and head size, with high loadings for HL and HS. PC3 reflected an inverse relationship between MP and TL. These component characteristics remained consistent in both FG and CG. In FG, 27.94% comprised subpopulation 1, characterized by cells with slightly rounded heads (−0.292), large head size (1.034), long tails, and short midpieces (−0.575). Approximately 27.10% were in subpopulation 2, with wider, rounded heads (−0.680), smaller head size (−1.065), long tails, and short midpieces (−0.350). About 15.62% made up subpopulation 3, marked by very rounded heads (−0.712), moderate size (0.383), short tails, and long midpieces (1.387). Subpopulation 4 represented 29.34%, with elliptical heads (1.475), relatively small size (−0.209), and midpieces and intermediate length tails (0.006). In CG, 55% were from subpopulation 5, which showed the widest heads (−0.944) among all identified subpopulations, medium head size (−0.0002), long tails, and short midpieces (−0.125). The remaining 45% were from subpopulation 6, with highly elliptical heads (0.977), medium size (−0.068), as well as MP and TL of similar proportions (−0.041). The balanced distribution among subpopulations in the fresh semen (FG) indicates a high degree of heterogeneity in sperm subpopulations. After thawing (CG), morphometric characteristics were reduced to two subpopulations in similar proportions (55% and 45%), indicating greater homogeneity in sperm morphometry. The changes in the sperm subpopulations of donkeys indicate that the sperm cells suffered cellular stress during cryopreservation.

Keywords: Asinines, cryopreservation, ejaculated.