

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA *IN VITRO* DE SÊMEN EQUINO
CONGELADO: EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES
SOBRE EVENTOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À FERTILIZAÇÃO**

BRUNA MERCI DE ZUTTER

Botucatu, SP
Fevereiro – 2026

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA *IN VITRO* DE SÊMEN EQUINO
CONGELADO: EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES
SOBRE EVENTOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À FERTILIZAÇÃO**

Defesa apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Mestre

Bruna Merci de Zutter
Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam
Papa

Botucatu, SP
Fevereiro – 2026

D532c

de Zutter, Bruna Merci

Capacitação espermática in vitro de sêmen equino congelado:
Efeitos da composição dos diluentes sobre eventos funcionais
associados à fertilização / Bruna Merci de Zutter. -- Botucatu, 2026
104 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Frederico Ozanam Papa

1. Medicina Veterinária. 2. Reprodução Equina. 3. Andrologia
Equina. 4. Capacitação Espermática. 5. Fertilização in vitro. I. Título.

Nome do autor: Bruna Merci de Zutter

Título: Capacitação espermática *in vitro* de sêmen equino congelado: Efeitos da composição dos diluentes sobre eventos funcionais associados à fertilização

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dra. Raquel Zaneti Puelker

Membro

Progest Biotecnologia em Reprodução Animal

Data da defesa de mestrado: 12 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter sido meu sustento em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores, me concedendo forças, sabedoria e serenidade ao longo de toda essa caminhada.

À minha mãe, Mara Soares, a quem dedico esta conquista. Mesmo à distância, sempre foi minha maior incentivadora, minha base e minha melhor amiga, sendo essencial em toda a minha trajetória pessoal e acadêmica. Ao meu padrasto, Daniel Soares, por todo o apoio, cuidado e incentivo durante toda a minha formação.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador, Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, que esteve presente desde a residência até o mestrado e teve papel decisivo na minha formação. Sempre acreditou em mim e na nossa pesquisa, concedendo-me autonomia para desenvolver este projeto, que sempre foi um grande sonho. Mais do que ensinar reprodução animal, transmitiu valores, ética e ensinamentos que levarei para a vida toda. Tenho imenso orgulho de ter sido orientada por uma das maiores referências da andrologia equina brasileira.

À Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua, pela amizade, parceria e contribuições científicas fundamentais ao longo de toda a pós-graduação. Sua dedicação foi essencial para a construção deste trabalho.

À Raquel Puelker e à Ana Carolina Soares, do Laboratório EquinVtro, pelo papel indispensável na execução deste estudo, especialmente na produção dos meios, no compartilhamento de conhecimento e na dedicação à área de produção de embriões in vitro. Sou muito grata pela parceria e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, pela disponibilidade, apoio constante e pelas valiosas contribuições técnicas e científicas ao longo dessa trajetória.

Aos professores Gabriel Monteiro e Fernanda Saules, pela amizade, ensinamentos, incentivo e oportunidades que contribuíram de forma significativa para a minha formação.

Ao meu namorado, Lucas Gualberto Faria, pelo apoio incondicional, incentivo constante, auxílio nas aspirações foliculares e por estar sempre ao meu lado, acreditando nos meus projetos e tornando essa caminhada mais leve.

À Dra. Thaís Cavaleiro, por contribuir significativamente para este trabalho

e por permitir a utilização dos animais da Central Equus, viabilizando etapas essenciais da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Thyago Dercoli e à Nicole, pela disponibilidade e por disponibilizarem as éguas da Central Vethy para as aspirações foliculares, fundamentais para a realização deste estudo. Ao Ericky Tongu e à sua equipe, pela colaboração e auxílio durante esses procedimentos.

Aos meus amigos Letícia Sayuri, Leonardo Siqueira e Mariana Frasson, com quem vivi o sonho de reativar um laboratório de fertilização in vitro na universidade, resultando hoje em um espaço onde diversos projetos estão em andamento e onde se inicia uma nova etapa na Reprodução Animal. Obrigada pela parceria, companheirismo e apoio durante toda essa jornada.

Aos colegas do CERAN — Camila, Mariana, Willian, Letícia, Iara e Pedro — pela convivência diária e apoio constante.

Às meninas do Posto de Monta, em especial Beatriz Sky, Raiane Miranda e Bianca Miranda, pela disponibilidade e por sempre manterem as portas abertas para a realização dos experimentos.

Às minhas eternas parceiras de residência, Thaís Gomes, minha companheira e confidente desde a residência até o mestrado, e Letícia Paz, que mesmo à distância ocupa um lugar muito especial no meu coração.

À minha amiga Júlia Consenza, pela parceria e apoio em diversos momentos ao longo da minha trajetória em Botucatu.

A todos os pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, pela convivência, trocas de conhecimento e apoio mútuo.

Aos residentes da Reprodução Animal dos anos de 2024 e 2025 — Luiz, Vanessa, Marcella, Fernanda e Andrey — pela ajuda nas coletas de sêmen.

Aos alunos de iniciação científica do CERAN, em especial Marina Fredou, Luiza Padovani e Vinícius Araújo, pelas contribuições ao experimento e pela parceria ao longo dessa trajetória.

A todos os funcionários do setor de Reprodução Animal, em especial Felipe, Simone, Cabeça e Edilson, pela amizade e convivência diária, além do suporte no desenvolvimento dos experimentos.

À Botupharma, pela doação dos diluentes de sêmen e dos meios de processamento seminal, que foram essenciais para a execução deste estudo.

Aos cavalos, nossa grande fonte de inspiração, especialmente aos animais

que participaram deste experimento e, de forma carinhosa, aos garanhões Scotch, Jack, Crioulo, Uivo e Ballantines, por sua contribuição indispensável à ciência.

Aos meus amigos de Blumenau — Babi, Carol, Bruna, Jacke e Marcelo — que, mesmo à distância, foram fundamentais para manter minha saúde mental e me lembrar que existe vida além da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP e à FAPESP, pelo suporte institucional e financeiro, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha mais sincera gratidão.

RESUMO

ZUTTER, B.M. **CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA *IN VITRO* DE SÊMEN EQUINO CONGELADO: EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES SOBRE EVENTOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS À FERTILIZAÇÃO**. Botucatu – SP. 2025. 104p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A fertilização *in vitro* em equinos ainda apresenta limitações relacionadas à dificuldade de reproduzir, em ambiente controlado, os eventos fisiológicos da capacitação espermática, especialmente quando se utiliza sêmen criopreservado. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da composição lipídica dos diluentes de centrifugação e congelação sobre a viabilidade espermática, o efluxo de colesterol e a competência fecundante de espermatozoides equinos congelados. Para isso, foram conduzidos experimentos sequenciais avaliando parâmetros cinéticos, estruturais e funcionais. No Experimento I, avaliou-se a influência de diferentes diluentes de centrifugação (BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold®) sobre os parâmetros cinemáticos espermáticos após incubação em meio capacitante. BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® apresentaram desempenho semelhante ao BotuSÊMEN®, com motilidade total de 51,37% e 53,26% e maiores valores de VCL (208,7 e 208,5 $\mu\text{m/s}$). No Experimento II, avaliou-se o efeito de diferentes diluentes de congelação (BotuCRIO®, G2, G3, G4 e G5) e do tempo de estabilização (20 min vs. 2 h) sobre a qualidade espermática pós-descongelação. BotuCRIO® e G4 apresentaram maior motilidade total (55,1% e 44,4%), enquanto G2 apresentou valores intermediários (42,7%), sem efeito do tempo de estabilização ($P > 0,05$). No Experimento III, investigou-se a combinação entre diluentes de centrifugação (BG e KZ) e de congelação (BC, G2, G2.1, G4 e G4.1), bem como o efeito da adição de leite desnatado. A combinação BG + BC apresentou os maiores valores de motilidade total (53,42%) e progressiva (26,00%), enquanto o leite reduziu esses parâmetros para 29,58–32,76%. No Experimento V, avaliou-se a dinâmica do efluxo de colesterol por citometria de fluxo. O efluxo ocorreu predominantemente nas primeiras horas, com redução da viabilidade de 75,3% para 53,3% em 9 horas ($P < 0,001$), sem influência dos diluentes ($P > 0,05$). No Experimento VI, avaliou-se a capacidade fecundante por fertilização *in vitro*, com taxas de clivagem de 17,4% (8/46) e blastocistos de 10,9% (5/46), com conversão de 62,5%. Conclui-se que a composição lipídica dos diluentes influencia a funcionalidade espermática e a competência fecundante, sendo a combinação entre BotuSÊMEN Gold® e G2 associada ao melhor equilíbrio entre estabilidade estrutural e responsividade funcional.

Palavras-chave: Criopreservação espermática; Capacitação espermática; Efluxo de colesterol; Seleção microfluídica; Reprodução equina.

ABSTRACT

ZUTTER, B.M. **IN VITRO SPERM CAPACITATION OF FROZEN–THAWED EQUINE SEMEN: EFFECTS OF EXTENDER COMPOSITION ON FUNCTIONAL EVENTS ASSOCIATED WITH FERTILIZATION.** Botucatu – SP. 2025 104p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

In vitro fertilization (*IVF*) in horses still presents limitations related to the difficulty of reproducing, under controlled conditions, the physiological events of sperm capacitation, especially when cryopreserved semen is used. In this context, the present study aimed to evaluate the influence of the lipid composition of centrifugation and freezing extenders on sperm viability, cholesterol efflux, and the fertilizing competence of frozen equine spermatozoa. To this end, sequential experiments were conducted evaluating kinematic, structural, and functional parameters. In Experiment I, the influence of different pre-centrifugation extenders (BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ®, and BotuSÊMEN Gold®) on sperm kinematic parameters after incubation in capacitating medium was evaluated. BotuSÊMEN KZ® and BotuSÊMEN Gold® showed performance similar to BotuSÊMEN®, with total motility of 51.37% and 53.26% and higher VCL values (208.7 and 208.5 $\mu\text{m/s}$). In Experiment II, the effect of different freezing extenders (BotuCRIO®, G2, G3, G4, and G5) and stabilization time (20 min vs. 2 h) on post-thaw sperm quality was evaluated. BotuCRIO® and G4 showed higher total motility (55.1% and 44.4%), whereas G2 showed intermediate values (42.7%), with no effect of stabilization time ($P > 0.05$). In Experiment III, the combination of pre-centrifugation extenders (BG and KZ) and freezing extenders (BC, G2, G2.1, G4, and G4.1), as well as the effect of skim milk addition, were investigated. The BG + BC combination showed the highest total (53.42%) and progressive motility (26.00%), whereas skim milk reduced these parameters to 29.58–32.76%. In Experiment V, cholesterol efflux dynamics were evaluated by flow cytometry. Efflux occurred predominantly in the early incubation period, with a decrease in sperm viability from 75.3% to 53.3% over 9 hours ($P < 0.001$), with no effect of extender composition ($P > 0.05$). In Experiment VI, fertilizing competence was assessed by *in vitro* fertilization, yielding cleavage rates of 17.4% (8/46) and blastocyst formation of 10.9% (5/46), with a conversion rate of 62.5%.

It is concluded that the lipid composition of extenders influences sperm functionality and fertilizing competence, with the combination of BotuSÊMEN Gold® and G2 providing the best balance between structural stability and functional responsiveness.

Keywords: Sperm cryopreservation; Sperm capacitation; Cholesterol efflux; Microfluidic sperm selection; Equine reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do delineamento experimental do Experimento I. Ejaculados foram diluídos em diferentes diluentes centrifugação, criopreservados, descongelados e submetidos à seleção espermática por gradiente de densidade. Após a seleção, as amostras foram incubadas a 38 °C em 5 % de CO ₂ , com avaliação da cinética espermática por CASA imediatamente após a descongelação, após a seleção (tempo 0) e após 3, 6 e 9 h de incubação	45
Figura 2. Esquema do delineamento experimental do Experimento II. Ejaculados foram diluídos em diferentes diluentes crioprotetores, submetidos a dois tempos de estabilização (20 min ou 2 h a 5 °C), criopreservados, descongelados e avaliados quanto à cinética espermática por análise computadorizada após a descongelação	46
Figura 3. Esquema do delineamento experimental do Experimento III, incluindo diluição centrifugação, estabilização seminal a 5 °C (20 min ou 2 h), criopreservação, descongelação e avaliação computadorizada da cinética espermática	47
Figura 4. Esquema do delineamento experimental do Experimento IV. Sêmen congelado de oito garanhões classificados como <i>bad freezers</i> foi descongelado e submetido a diferentes técnicas de seleção espermática (<i>Swim-up</i> , EquiPure®, VetMotl® e Strex®), seguido da avaliação da qualidade espermática por análises de cinética, integridade e estabilidade de membrana, potencial de membrana mitocondrial, produção de ânion superóxido e morfologia espermática	50
Figura 5. Esquema do delineamento experimental do Experimento V. para avaliação do efluxo de colesterol durante a capacitação espermática <i>in vitro</i> , incluindo descongelação, seleção espermática por microfluídica (VetMotl®), incubação em meio capacitante, marcação fluorescente e análise por citometria de fluxo	51

Figura 6. Delineamento experimental do Experimento 6. Esquema da fertilização <i>in vitro</i> com sêmen equino congelado, incluindo as etapas de descongelação, seleção espermática por microfluídica (VetMotl®), capacitação <i>in vitro</i> em meio FT-PHE, coincubação com complexos cúmulus–ócito e cultivo embrionário <i>in vitro</i> , com avaliação da taxa de clivagem no dia 3 (D3) e da formação de blastocistos entre os dias 7 e 10 (D7–D10).....	53
Figura 7. Fluxograma ilustrativo das etapas experimentais envolvidas nos diferentes métodos de seleção espermática aplicados ao sêmen equino congelado-descongelado: separação coloidal por gradiente de densidade (EquiPure®), seleção microfluídica unidirecional (VetMotl®), sistema microfluídico (MFSS®/Strex®) e separação por migração ascendente (<i>Swim-up</i>). Os esquemas demonstram a adição das amostras, volumes de meio, condições de incubação, centrifugação quando aplicável e a recuperação final da fração espermática selecionada para as análises subsequentes	56
Figura 8. Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozoides equinos após 20 minutos e 2 horas de estabilização, avaliada após a criopreservação em diferentes diluentes comerciais. Os grupos experimentais foram: G1 (BotuSÊMEN®), G2 (BotuSÊMEN® + G2), G3 (BotuSÊMEN® + colesterol), G4 (BotuSÊMEN Gold®) e G5 (BotuSÊMEN KZ®). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA de dois fatores seguida do teste de Tukey; $P < 0,05$). Não houve efeito significativo do tempo de estabilização nem interação grupo $\times$ tempo ($P > 0,05$)	72
Figura 9. Percentual de recuperação espermática após diferentes métodos de seleção aplicados ao sêmen equino descongelado: EquiPure®, VetMotl®, Strex® e <i>swim-up</i> . Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	78
Figura 10. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrana (A), estabilidade de membrana (B), alto potencial mitocondrial (PMM; C) e produção de ânion superóxido (O_2^- ; D) de espermatozoides equinos congelados-descongelados submetidos a diferentes métodos de seleção espermática: pós-descongelação (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e <i>swim-up</i>	80

Figura 11. Viabilidade espermática (A), porcentagem de espermatozoides com efluxo de colesterol (B) e porcentagem de espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol (C) após 0,5, 3, 6 e 9 horas de incubação <i>in vitro</i> . Foram avaliadas diferentes combinações entre diluentes de centrifugação (BotuSÊMEN GOLD® – BG e BotuSÊMEN KZ® – KZ) e meios de congelação (BotuCRIO® – BC e G2). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as combinações de diluentes dentro de um mesmo tempo experimental ($P > 0,05$)	83
Figura 12. Efeito do tempo de incubação <i>in vitro</i> sobre o efluxo de colesterol em espermatozoides equinos totais (D) e em espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol (E). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), independentemente da combinação de diluentes utilizada	84
Figura 13. Desenvolvimento embrionário dos dias D6, D7 e D8 de blastocistos produzidos pela técnica de fertilização <i>in vitro</i> a partir de espermatozoides descongelados e capacitados <i>in vitro</i>	88
Figura 14. Embriões em estágio de clivagem (D3) obtidos a partir da segunda aspiração folicular, produzidos pela técnica de fertilização <i>in vitro</i> utilizando espermatozoides descongelados e capacitados <i>in vitro</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos diluentes experimentais testados para avaliação da influência da composição lipídica e do tempo de estabilização antes da criopreservação	48
Tabela 2. Grupos experimentais formados pela combinação dos diluentes de centrifugação e de congelação, com respectivos tempos de estabilização antes da criopreservação	50
Tabela 3. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por 3 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).....	68
Tabela 4. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por 6 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).....	69
Tabela 5. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por 9 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).....	71
Tabela 6. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos avaliados após 20 minutos e 2 horas de estabilização, após a criopreservação em diferentes diluentes. Os espermatozoides foram congelados utilizando os diluentes BotuCRIO (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), G2, G3, G4 e G5.....	72

Tabela 7. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação, considerando a combinação entre diluentes de centrifugação (BG e KZ) e formulações de congelação (BC, G2, G2.1, G4 e G4.1). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

76

Tabela 8. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação em função dos diluentes de centrifugação BotuSÊMEN GOLD® (BG) e BotuSÊMEN KZ® (KZ).....77

Tabela 9. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação em função dos meios de congelação BotuCRIO® (BC), G2 e G477

Tabela 10. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos criopreservados nos meios G2 e G2 acrescido de leite desnatado (G2.1).....78

Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos criopreservados nos meios G4 e G4 acrescido de leite desnatado (G4.1).....78

Tabela 12. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos criopreservados nos meios G2 e G478

Tabela 13. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros cinemáticos espermáticos avaliados por análise computadorizada (CASA) após diferentes métodos de seleção aplicados ao sêmen equino descongelado: pós-descongelação (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e *swim-up*81

Tabela 14. Valores médios $\pm$ desvio padrão das categorias de defeitos morfológicos espermáticos avaliadas após diferentes métodos de seleção espermática aplicados ao sêmen equino congelado-descongelado: pós-descongelação (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e *swim-up*. As categorias analisadas incluem defeitos de cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda83

Tabela 14. Valores médios $\pm$ desvio padrão das categorias de defeitos morfológicos espermáticos avaliadas após diferentes métodos de seleção espermática aplicados ao sêmen equino congelado-descongelado: pós-

descongelamento (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e swim-up. As categorias analisadas incluem defeitos de cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda84

Tabela 15. Taxas de clivagem, formação e classificação morfológica de blastocistos produzidos por fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado do grupo G2 + BotuSÊMEN GOLD®.....89

Tabela 16. Taxas de clivagem, formação e classificação morfológica de blastocistos produzidos por fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado dos grupos BotuCrio® + BotuSÊMEN GOLD® e G2 + BotuSÊMEN GOLD®90

SUMÁRIO

CAPITULO 1	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Espermatozoide	23
2.2 Capacitação espermática: conceito e mecanismos moleculares	25
2.3 Capacitação espermática <i>in vitro</i>	27
2.4 Capacitação espermática aplicada à ICSI	30
2.5 Métodos de avaliação da capacitação espermática.....	31
2.6 Influência dos lipídeos na capacitação espermática	34
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	37
4.1 Hipótese.....	37
4.2 Objetivo(s) geral(s)	37
4.3 Objetivo(s) específico(s)	37
5. REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 2	43
ARTIGO CIENTÍFICO - Capacitação espermática <i>in vitro</i> de sêmen equino congelado: Efeitos da composição dos diluentes sobre eventos funcionais associados à fertilização.....	
1. Introdução.....	
2. Material e métodos	
2.1 Aspectos éticos	48
2.2 Delineamento experimental.....	48
2.3 Experimento I – Avaliação da influência de diluentes pré-centrifugação sobre a viabilidade pós-descongelação e a hiperativação espermática de sêmen equino congelado.....	49
2.4 Experimento II – Avaliação do tempo de estabilização seminal em diferentes diluentes crioprotetores.....	50
2.5 Experimento III – Influência de diferentes composições de crioprotetores na viabilidade espermática.....	52

2.6 Experimento IV – Impacto de técnicas seletivas na qualidade espermática pós-descongelação	54
2.7 Experimento V – Dinâmica do efluxo de colesterol durante a capacitação espermática de sêmen equino criopreservado.....	55
2.8 Experimento VI – Fertilização <i>in vitro</i> com sêmen congelado	57
2.9 Métodos gerais	59
2.9.1 Colheita e congelação de sêmen.....	59
2.9.2 Seleção espermática	60
2.9.2.1 Gradiente de densidade (EquiPure®).....	61
2.9.2.2 Seleção microfluídica unidirecional (VetMotl®).....	62
2.9.2.3 Sistema microfluídico bidirecional (MFSS®).....	62
2.9.2.4 Swim-up (SU)	63
2.9.3 Capacitação espermática <i>in vitro</i>	63
2.9.4 Cinética espermática	64
2.9.5 Morfologia espermática.....	65
2.9.6 Citometria de fluxo.....	66
2.9.6.1 Integridade e estabilidade da membrana plasmática.....	66
2.9.6.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	67
2.9.6.3 Produção de ânion superóxido mitocondrial	67
2.9.6.4 Efluxo de colesterol	67
2.9.7 Obtenção dos oócitos e maturação oocitária.....	68
2.9.8 Coincubação dos espermatozoides e oócitos.....	69
2.9.9 Cultivo e avaliação dos zigotos.....	70
2.9.10 Análise Estatística	70
3. Resultados	71
3.1 Experimento I – Avaliação da influência de diluentes pré-centrifugação sobre a viabilidade pós-descongelação e a hiperativação espermática de sêmen equino congelado	71
3.2 Experimento II – Avaliação do tempo de estabilização seminal em diferentes diluentes crioprotetores	75
3.3 Experimento III – Influência de diferentes composições de crioprotetores na viabilidade espermática.....	77

3.4 Experimento IV – Avaliação da influência de diluentes pré-centrifugação sobre a viabilidade pós-descongelação e a hiperativação espermática de sêmen equino congelado	82
3.5 Experimento VI - Fertilização <i>in vitro</i> com sêmen congelado	86
4. Discussão.....	93
5. Conclusão.....	98
REFERÊNCIAS.....	100

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira apresenta crescimento expressivo, atingindo aproximadamente 5,7 milhões de animais em 2024, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2024). Esse cenário consolida o Brasil como um dos principais polos da indústria equestre mundial, impulsionando o desenvolvimento e a aplicação de biotecnologias reprodutivas voltadas ao melhoramento genético e à eficiência produtiva (CAMARGO, 2023; GUASTI, 2014).

Entre as biotecnologias disponíveis, a fertilização *in vitro* (FIV) consolidou-se como ferramenta essencial para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em diversas espécies domésticas. Contudo, na espécie equina, a aplicação da FIV convencional ainda enfrenta limitações importantes, com taxas de sucesso inferiores às observadas em bovinos e suínos (CHOI et al., 1994; DELL'AQUILA et al., 1997a, b; ALM et al., 2001; HINRICHS et al., 2002; TREMOLEDA et al., 2003; MUGNIER et al., 2009). Os primeiros relatos de potros obtidos por FIV datam de Palmer et al. (1991) e Bézard et al. (1992), utilizando oócitos maturados *in vivo* e espermatozoides tratados com ionóforo de cálcio. Apesar de pioneiros, esses resultados não foram reprodutíveis, e a técnica permaneceu sem avanços consistentes por mais de duas décadas.

A principal limitação da FIV em equinos está relacionada à dificuldade dos espermatozoides em adquirirem capacidade fecundante *in vitro*, em função da complexidade dos eventos fisiológicos e bioquímicos que caracterizam a capacitação espermática, processo que prepara a célula espermática para a penetração do oócito e a fertilização (HINRICHS, 2018; LEEMANS et al., 2016). Fisiologicamente, a capacitação ocorre no istmo da tuba uterina, sob influência de secreções epiteliais, proteínas do plasma seminal e espécies reativas de oxigênio, promovendo a remoção de proteínas epididimárias e fatores de descapacitação, o efluxo de colesterol, a reorganização de proteínas de superfície, o aumento do pH intracelular e o influxo de íons Ca^{2+} e HCO_3^- (MAITAN et al., 2022). Esses eventos culminam na aquisição da hipermotilidade e na reação acrossomal, etapas indispensáveis ao processo de fecundação.

Durante anos, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) foi considerada a principal alternativa para a produção de embriões equinos *in vitro*,

uma vez que independe da capacitação espermática e da penetração natural da zona pelúcida (GONZALEZ-CASTRO et al., 2025). Entretanto, a ICSI apresenta limitações relacionadas à ausência de seleção fisiológica dos espermatozoides, ao controle das etapas de ativação oocitária e aos elevados custos operacionais (HERNÁNDEZ-ÁVILES et al., 2025). Nesse contexto, a retomada do interesse pela FIV convencional decorre da busca por abordagens mais fisiológicas, que respeitem a interação natural entre espermatozoide e oócito (RAMÍREZ-AGÁMEZ et al., 2025).

Avanços recentes demonstraram que a capacitação espermática *in vitro* é viável em equinos. Félix et al. (2022) demonstraram que a incubação de espermatozoides frescos em meio Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP) suplementado com penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) durante 22 horas, induz alterações características da capacitação, incluindo aumento da fosforilação de resíduos de tirosina, culminando em elevadas taxas de fertilização e formação de blastocistos. Posteriormente, Félix et al. (2023) adaptaram o protocolo para sêmen congelado, associando o sistema PHE à seleção espermática física e reduzindo o tempo de incubação para 9 horas, obtendo taxas expressivas de clivagem.

Esses achados foram confirmados por outros grupos. Papas et al. (2024) relataram o nascimento do primeiro potro saudável derivado de FIV convencional na Europa, enquanto Martin-Pelaez et al. (2025) demonstraram taxas de blastocisto superiores às obtidas por ICSI e maior velocidade de expansão embrionária. Em 2025, Hernández-Avilés et al. observaram que sêmen fresco, refrigerado e congelado apresentaram taxas semelhantes de clivagem e formação de blastocistos, além de demonstrarem que a redução do tempo de incubação não compromete o desenvolvimento embrionário, sugerindo que a criopreservação pode antecipar eventos associados à capacitação.

O colesterol exerce papel central na fisiologia espermática, atuando como fator estabilizador da membrana plasmática durante a criopreservação, ao mesmo tempo em que seu efluxo controlado é essencial para a desorganização da bicamada lipídica, redistribuição de proteínas de membrana e aumento da permeabilidade iônica, eventos necessários à reação acrossomal e à fusão com o oócito (GUASTI, 2014; CONTRERAS et al., 2022). Em equinos, o elevado teor de colesterol da membrana espermática tem sido associado a uma progressão mais

lenta do processo de capacitação, ressaltando a importância de investigações experimentais sobre o remodelamento lipídico durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides criopreservados (HARTWIG; PAPA; DELL'AQUA, 2012).

Apesar dos avanços recentes na fertilização *in vitro* convencional em equinos, aspectos relacionados ao remodelamento da membrana espermática durante a capacitação *in vitro* permanecem incompletamente compreendidos. Em especial, a dinâmica do colesterol de membrana em espermatozoides criopreservados e sua possível modulação por diferentes composições de diluentes ainda carecem de investigação experimental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatozoide

A morfologia espermática foi inicialmente descrita por Antoni van Leeuwenhoek em 1677, que comparou a célula à forma de um girino. Contudo, apenas a partir da década de 1960, com o advento da microscopia eletrônica, tornou-se possível a caracterização detalhada da ultraestrutura espermática e de seus compartimentos funcionais (SAACKE; ALMQUIST, 1964; AMANN, 2011; VARNER et al., 2008).

O espermatozoide equino apresenta comprimento médio entre 61 e 86 μm e é organizado em dois compartimentos principais: cabeça e flagelo. A cabeça abriga o material genético paterno e as estruturas envolvidas no reconhecimento e na fusão com o oócito, enquanto o flagelo é responsável pela motilidade celular. O flagelo é subdividido em peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça terminal, estruturas especializadas na geração e propagação do movimento espermático (VARNER et al., 2015).

O citoesqueleto espermático, constituído por proteínas estruturais, axonema central e fibras densas externas, assegura resistência mecânica e estabilidade estrutural à célula, permitindo a propagação adequada das ondas flagelares, o movimento progressivo eficiente e a transmissão de forças durante a interação com o oócito (DAVIES-MOREL, 2008; MAITAN et al., 2022). Essas características biomecânicas são essenciais para o deslocamento do espermatozoide no meio fluido do trato reprodutor feminino.

O núcleo espermático é altamente condensado, com o DNA paterno associado a protaminas, o que confere elevada compactação e proteção genômica (SAMPER, 2008). Na peça intermediária, mitocôndrias organizadas helicoidalmente formam a bainha mitocondrial, responsável pela produção de energia via fosforilação oxidativa. Essa atividade metabólica é fundamental para o movimento flagelar, para a manutenção da homeostase intracelular de cálcio e para a sinalização envolvida na capacitação espermática, incluindo a modulação do padrão de motilidade associado à hiperativação (AMANN, 2011; LEEMANS et al., 2019). O anel fibroso delimita a transição entre as peças intermediária e

principal, separando a bainha mitocondrial da bainha fibrosa que envolve o axonema e confere elasticidade e sustentação ao movimento flagelar (VARNER et al., 2015; MAITAN et al., 2022).

A membrana plasmática espermática constitui uma interface altamente especializada e dinâmica entre o meio extracelular e o citoplasma. Sua composição inclui uma bicamada fosfolipídica rica em colesterol, esfingolipídios e glicoproteínas, cuja organização, fluidez e assimetria variam conforme o domínio celular e o estado funcional do espermatozoide. As proteínas transmembranares atuam como receptores, canais iônicos e mediadores de transdução de sinais, desempenhando papel central nos eventos que antecedem a fertilização (FLESCHE; GADELLA, 2000; MAITAN et al., 2022).

A organização lipídica da membrana plasmática é determinante para processos como adesão ao epitélio ovidutal, permeabilidade seletiva, sinalização intracelular e fusão com o oócito. Microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios, conhecidos como jangadas lipídicas, concentram moléculas sinalizadoras, canais iônicos e enzimas quinases, exercendo papel essencial na iniciação da capacitação espermática e na ativação da motilidade hiperativada (GADELLA et al., 2008; BRINSKO et al., 2010; MUGNIER et al., 2009).

A cabeça espermática apresenta domínios funcionais de superfície que participam de forma coordenada do reconhecimento da zona pelúcida, da fusão com o oolema e da incorporação do material nuclear ao oócito. O acrossoma, organela derivada do aparelho de Golgi, ocupa a porção anterior do núcleo e é delimitado por membranas interna e externa que circundam a matriz acrossomal, rica em enzimas hidrolíticas como acrosina e hialuronidase. A integridade e o remodelamento coordenado dessas estruturas são determinantes para o sucesso da fertilização, uma vez que regulam a resposta do espermatozoide aos estímulos do ambiente ovidutal e a ocorrência da reação acrossomal (GADELLA et al., 2008; LEEMANS et al., 2019; HERNÁNDEZ-AVILÉS et al., 2023).

De forma integrada, a organização estrutural, molecular e funcional do espermatozoide equino evidencia que a aquisição da competência fecundante depende de modificações coordenadas na membrana plasmática, no padrão de motilidade e na funcionalidade acrossomal, reforçando que a capacitação espermática constitui um processo complexo que conecta morfologia, bioquímica e função.

2.2 Capacitação espermática: conceito e mecanismos moleculares

A capacitação espermática é um processo biológico dinâmico, progressivo e indispensável para que o espermatozoide adquira competência fecundante. Descrita de forma independente por Austin (1951) e Chang (1951), a capacitação consiste em um conjunto de modificações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem naturalmente no trato reprodutor feminino após a ejaculação, preparando o espermatozoide para reconhecer, penetrar e fundir-se ao oócito. Durante esse processo, ocorre a remoção gradual de fatores decapacitantes adsorvidos à membrana plasmática no epidídimo e no plasma seminal, tornando a célula responsiva aos estímulos do ambiente ovidutal (LEEMANS et al., 2016).

Na espécie equina, a complexidade da capacitação é acentuada pela composição singular da membrana plasmática espermática, caracterizada por elevado teor de colesterol e fosfolípídios saturados. Essa composição confere maior estabilidade estrutural à célula, porém impõe um controle temporal mais rigoroso sobre os eventos de desestabilização necessários à progressão da capacitação, o que historicamente dificultou a reprodução desse processo em condições *in vitro* (LEEMANS et al., 2016; HINRICHS, 2018; MAITAN et al., 2022).

Após a deposição do sêmen no útero, os espermatozoides viáveis migram em direção ao oviduto, onde apenas uma subpopulação funcionalmente competente alcança o istmo ovidutal, formando um reservatório espermático. Essa interação é mediada por proteínas de superfície espermática e receptores de carboidratos presentes no epitélio ovidutal, estabelecendo uma ligação reversível que mantém os espermatozoides metabolicamente quiescentes até a proximidade da ovulação (YANAGIMACHI, 1994; LEEMANS et al., 2019). Esse mecanismo contribui para a preservação da viabilidade celular, a prevenção da capacitação prematura e a sincronização temporal da fertilização (BETARELLI, 2016).

O microambiente do istmo é finamente regulado e apresenta condições favoráveis ao início gradual da capacitação, incluindo pH ligeiramente alcalino ($\approx 7,6$), concentrações elevadas de bicarbonato (HCO_3^-) e cálcio (Ca^{2+}), além da presença de glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (MCKINNON et al., 2011). O influxo de HCO_3^- , mediado por cotransportadores específicos, ativa a adenilil ciclase solúvel (sAC), promovendo aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e subsequente ativação da proteína

quinase A (PKA). Essa cascata de sinalização culmina na fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, amplamente reconhecida como um dos principais marcadores bioquímicos da capacitação espermática (VARNER; JOHNSON, 2011; MAITAN et al., 2022).

Concomitantemente, ocorre elevação do Ca^{2+} intracelular, mediada principalmente pelos canais CatSper (Cation Channels of Sperm), localizados na peça principal do flagelo. Esses canais são sensíveis ao pH intracelular e à progesterona, atuando como sensores do ambiente reprodutivo feminino e reguladores centrais da motilidade espermática. A ativação dos canais CatSper, associada à sinalização via AMPc–PKA, promove alterações na dinâmica axonêmica, transformando o movimento flagelar linear e simétrico em um padrão vigoroso e assimétrico, característico da hipermotilidade (ARRAIS et al., 2016; LEEMANS et al., 2016).

Didaticamente, a capacitação pode ser dividida em eventos iniciais e rápidos e eventos tardios e progressivos (BETARELLI, 2016). Os eventos iniciais incluem a ativação flagelar, o influxo de HCO_3^- e Ca^{2+} e a elevação do pH intracelular. Já os eventos tardios envolvem a remoção progressiva de colesterol da membrana plasmática, a intensificação da sinalização via PKA e o aumento da fosforilação de proteínas tirosina-específicas, culminando na hipermotilidade e na preparação do espermatozoide para a reação acrossomal (LEEMANS et al., 2016; MAITAN et al., 2022).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) exercem papel modulador essencial nesse processo. Em níveis fisiológicos, o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzidos principalmente pela NADPH oxidase (NOX5) e pelas mitocôndrias, participam da modulação redox da via AMPc–PKA, favorecendo a fosforilação de proteínas e o efluxo de colesterol da membrana plasmática (BALL et al., 2001; AITKEN et al., 2016). Entretanto, o excesso de EROS pode resultar em peroxidação lipídica, danos ao DNA espermático e comprometimento da funcionalidade celular (GUASTI, 2014; MAITAN et al., 2022).

A membrana plasmática espermática desempenha papel central na coordenação dos eventos da capacitação. Composta por uma bicamada fosfolipídica assimétrica, rica em colesterol, fosfolipídios e esfingolipídios, essa estrutura regula a permeabilidade, a sinalização intracelular e a fusogenicidade celular (FLESCH; GADELLA, 2000). Durante a capacitação, ocorre um efluxo

progressivo de colesterol, mediado por aceptores de esteróis como albumina e lipoproteínas de alta densidade (HDL) presentes no fluido ovidutal. Esse remodelamento lipídico aumenta a fluidez da membrana e favorece a redistribuição de proteínas integrais e a organização de microdomínios lipídicos especializados, conhecidos como jangadas lipídicas, essenciais à progressão da capacitação (GADELLA et al., 2008; MUGNIER et al., 2009; LEEMANS et al., 2019).

A partir desse estado funcional, estabelece-se a hipermotilidade espermática, caracterizada por movimento flagelar vigoroso e assimétrico, com aumento da amplitude lateral da cauda e redução da progressividade linear, padrão indispensável para a penetração das células do cúmulus e a interação com a zona pelúcida (LEEMANS et al., 2016).

O evento culminante da capacitação é a reação acrossomal, desencadeada após o contato do espermatozoide capacitado com a zona pelúcida do oócito. Esse processo envolve a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa e a liberação de enzimas hidrolíticas, como acrosina e hialuronidase, que permitem a degradação da matriz glicoproteica e a penetração do espermatozoide no oócito (HERNÁNDEZ-AVILÉS et al., 2023).

2.3 Capacitação espermática *in vitro*

Decorridas mais de três décadas desde o nascimento do primeiro potro obtido por fertilização *in vitro* (FIV) em equinos, relatado por Palmer et al. (1991) a partir de oócitos maturados *in vivo* e espermatozoides tratados com o ionóforo de cálcio A23187, a capacitação espermática *in vitro* permanece como um dos principais desafios da reprodução assistida na espécie. Embora esse experimento pioneiro tenha representado um marco histórico, o uso de ionóforos revelou-se inconsistente e altamente citotóxico, induzindo influxo abrupto de Ca^{2+} e danos estruturais irreversíveis à célula espermática, o que inviabilizou sua aplicação prática e impulsionou a busca por protocolos fisiologicamente mais seguros e reprodutíveis (DELL'AQUILA et al., 1996; HINRICHS et al., 2002; ROASA et al., 2007; MAITAN et al., 2022).

Nas décadas subsequentes, diferentes agentes capacitantes foram avaliados com o objetivo de mimetizar o ambiente ovidutal e reproduzir *in vitro* as

condições necessárias à aquisição da competência fecundante. Entre os primeiros indutores testados destacaram-se o ionóforo de cálcio, a heparina e os lisofosfolípidios, empregados principalmente para promover influxo de Ca^{2+} e facilitar o efluxo de colesterol da membrana plasmática (BLUE et al., 1989; ZHANG et al., 1990; DELL'AQUILA et al., 1996; ALM et al., 2001). Apesar de induzirem alterações morfológicas compatíveis com o início da capacitação, esses tratamentos não resultaram em taxas consistentes de fertilização e frequentemente ocasionaram lesões estruturais associadas à desregulação do cálcio intracelular (HINRICHS et al., 2002).

Posteriormente, a atenção voltou-se ao uso de moduladores mais fisiológicos, como a progesterona, que atua sobre os canais CatSper promovendo influxo de Ca^{2+} e alterações no padrão de motilidade flagelar (TREMOLEDA et al., 2003), e a cafeína, utilizada como estimulante metabólico por elevar os níveis de AMPc (GRAHAM, 1996). Embora esses agentes tenham promovido melhora transitória no padrão de movimento, seus efeitos mostraram-se limitados e inconsistentes quanto à penetração oocitária. A introdução do bicarbonato (HCO_3^-) como componente essencial dos meios de incubação representou um avanço conceitual, uma vez que esse íon é reconhecido como sinal intracelular central na ativação da adenilil ciclase solúvel (sAC) e da via AMPc/PKA, aproximando o modelo *in vitro* do processo fisiológico observado *in vivo* (VISCONTI et al., 1995; FLESCH; GADELLA, 2000). Ainda assim, em equinos, as respostas permaneceram heterogêneas, indicando que a ativação isolada dessa via não é suficiente para reproduzir integralmente a capacitação espermática (ROASA et al., 2007; LEEMANS et al., 2019).

Nesse contexto, a albumina sérica bovina (BSA) passou a ser incorporada aos meios de incubação por sua capacidade de atuar como aceitador de esteróis, promovendo o efluxo controlado de colesterol da membrana plasmática (FLESCH; GADELLA, 2000). A remoção parcial de colesterol mostrou-se indispensável para o aumento da fluidez da bicamada lipídica e para a progressão da capacitação. Entretanto, a variabilidade biológica da BSA motivou a busca por substitutos sintéticos mais previsíveis, como o álcool polivinílico (PVA). Estudos recentes demonstraram que a associação de bicarbonato e PVA é capaz de estimular a ativação da via PKA e preservar a viabilidade espermática, configurando uma

alternativa mais reprodutível para protocolos *in vitro* (ARROYO-SALVO et al., 2025).

Um avanço decisivo na capacitação espermática *in vitro* em equinos foi descrito por Félix et al. (2022), com a introdução do protocolo baseado na combinação de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) em meio FERT-TALP. Essa abordagem representou o primeiro modelo efetivo e reprodutível de capacitação espermática na espécie. A penicilamina atua como antioxidante e quelante de metais, reduzindo a formação de radicais hidroxila; a hipotaurina modula espécies reativas de oxigênio e preserva o potencial mitocondrial; e a epinefrina estimula o metabolismo flagelar e a produção de AMPc por ativação β -adrenérgica (DELL'AQUILA et al., 1996; FÉLIX et al., 2022; LUIS-CALERO et al., 2024). Em conjunto, esses componentes mimetizam de forma eficiente o ambiente redox e hormonal do oviduto, induzindo modificações funcionais compatíveis com o estado capacitante, ao mesmo tempo em que preservam a integridade estrutural dos espermatozoides.

A robustez desse protocolo foi posteriormente confirmada em sêmen congelado-descongelado, com elevadas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário relatadas por diferentes grupos de pesquisa (FÉLIX et al., 2023, 2025; MARTIN-PELAEZ et al., 2025; HERNÁNDEZ-AVILÉS et al., 2025). Além disso, Gonzalez-Castro et al. (2025) demonstraram sua aplicabilidade em oócitos de éguas jovens e idosas, evidenciando o potencial clínico do método.

No contexto da criopreservação, a utilização de ciclodextrinas carregadas com colesterol (CLC) tem sido explorada como estratégia para estabilização da membrana plasmática, reduzindo a capacitação prematura e prolongando a viabilidade pós-descongelação. A adição de CLC mostrou-se eficaz na atenuação do estresse térmico e osmótico, enquanto protocolos que combinam PHE e incubação controlada preservam a motilidade e a integridade acrossomal, minimizando os efeitos da criocapacitação (CONTRERAS et al., 2022; LUIS-CALERO et al., 2024).

Por fim, evidências recentes demonstram que o domínio das condições de incubação, da composição dos meios e do equilíbrio redox é determinante para o sucesso da capacitação espermática *in vitro* em equinos, constituindo a base para o aprimoramento das biotecnologias reprodutivas e para a consolidação da fertilização *in vitro* convencional na espécie.

2.4 Capacitação espermática aplicada à ICSI

Na espécie equina, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) consolidou-se como a principal técnica de produção *in vitro* de embriões, em razão das limitações históricas da fertilização *in vitro* convencional. Diferentemente da FIV, a ICSI prescinde da interação espermatozoide–zona pelúcida e da penetração ativa do oócito, o que inicialmente levou à concepção de que a capacitação espermática seria desnecessária nesse contexto (GALLI et al., 2014; HINRICHS, 2018). No entanto, evidências acumuladas ao longo das últimas décadas indicam que, embora a ICSI contorne etapas mecânicas da fecundação, eventos bioquímicos associados à capacitação continuam exercendo papel relevante na ativação oocitária e no desenvolvimento embrionário subsequente (LEEMANS, 2016; HINRICHS, 2018).

Estudos experimentais demonstraram que espermatozoides equinos submetidos a condições capacitantes antes da ICSI apresentam maior capacidade de desencadear a ativação do oócito e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, sugerindo que alterações moleculares relacionadas à capacitação, como modificações de membrana e sinalização intracelular dependente de cálcio, contribuem para a competência funcional do gameta masculino mesmo quando a fusão natural é ocorrida (ROASA et al., 2007; GALLI et al., 2014). Nesse contexto, a capacitação aplicada à ICSI deve ser compreendida não como um requisito absoluto, mas como um modulador da eficiência do processo reprodutivo.

Evidência direta dessa relação foi apresentada por Broothaers et al. (2025a,b), que demonstraram que a incubação de sêmen congelado-descongelado sob condições capacitantes previamente à ICSI resultou em aumento significativo das taxas de clivagem e de formação de blastocistos. Os autores observaram que a exposição controlada dos espermatozoides a meios capacitantes promoveu alterações funcionais compatíveis com maior capacidade de ativação oocitária, sem comprometer a viabilidade celular, configurando o primeiro modelo experimental robusto que associa diretamente capacitação espermática e sucesso da ICSI em equinos.

Além da incubação capacitante, estratégias mecânicas e físico-químicas têm sido amplamente empregadas para suprir ou potencializar eventos normalmente atribuídos à capacitação. A utilização do sistema Piezo-ICSI, por

exemplo, promove a ruptura controlada da membrana espermática e da membrana oocitária, facilitando a liberação de fatores espermáticos no citoplasma do oócito e favorecendo a ativação oocitária, mesmo na ausência de capacitação completa (GALLI et al., 2014; LEEMANS, 2016). De forma complementar, protocolos de ativação oocitária com ionóforos de cálcio ou combinações de estímulos químicos e mecânicos têm sido utilizados para compensar possíveis deficiências na sinalização induzida pelo espermatozoide, reforçando a natureza multifatorial da ativação após ICSI em equinos (HINRICHS, 2018; CARNEVALE et al., 2019).

Assim, a capacitação espermática aplicada à ICSI em equinos deve ser interpretada sob uma perspectiva funcional e adaptativa, na qual alterações bioquímicas do espermatozoide, estímulos mecânicos proporcionados pelo Piezo e protocolos de ativação oocitária atuam de forma integrada para assegurar a reprogramação do oócito e o desenvolvimento embrionário. Esse entendimento explica o sucesso consistente da ICSI na espécie equina e reforça que, mesmo em técnicas que *bypassam* etapas clássicas da fertilização, a fisiologia espermática continua desempenhando papel central na eficiência reprodutiva (GALLI et al., 2014; HINRICHS, 2018; BROOThAERS et al., 2025a,b).

2.5 Métodos de avaliação da capacitação espermática

A capacitação espermática consiste em um conjunto integrado de alterações moleculares e funcionais que conferem ao espermatozoide competência fertilizante e que ocorre fisiologicamente no trato reprodutivo feminino, podendo ser parcialmente mimetizada *in vitro* por meios que reproduzem alterações iônicas, osmóticas e metabólicas do ambiente periovulatório (VISCONTI et al., 1995; GADELLA & HARRISON, 2000). Em razão de sua natureza multifatorial e dinâmica, a capacitação não pode ser adequadamente caracterizada por um único marcador isolado, exigindo a aplicação combinada de diferentes metodologias experimentais. Essa limitação é particularmente evidente na espécie equina, cuja fisiologia espermática apresenta características próprias que dificultam a extrapolação direta de critérios estabelecidos para outras espécies domésticas (HINRICHS et al., 2002; BERNECIC et al., 2019a).

Entre os marcadores bioquímicos mais utilizados na avaliação da capacitação destaca-se a fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, considerada um evento tardio do processo e associada à ativação da via dependente de bicarbonato, adenilato ciclase solúvel, AMPc e proteína quinase A (VISCONTI et al., 1995). Em equinos, aumentos tempo-dependentes na fosforilação de tirosina foram descritos sob condições capacitantes *in vitro*, com padrões específicos de localização ao longo da peça intermediária e do flagelo, geralmente avaliados por imunofluorescência ou Western blot (MCPARTLIN et al., 2009; ROASA et al., 2007). No entanto, essa fosforilação ocorre de forma heterogênea entre os espermatozoides e pode ser modulada por fatores independentes da competência fertilizante, o que reforça a necessidade de sua interpretação associada a parâmetros estruturais e funcionais (GADELLA et al., 2008; BERNECIC et al., 2019b).

Outro conjunto relevante de metodologias envolve a avaliação das modificações da membrana plasmática, especialmente aquelas relacionadas à reorganização lipídica e ao efluxo de colesterol. Alterações precoces na fluidez da membrana, frequentemente detectadas por sondas fluorescentes como a merocianina 540 associada a marcadores de viabilidade, refletem eventos iniciais da capacitação, embora não sejam específicas desse processo (GADELLA & HARRISON, 2000). A redistribuição e a remoção progressiva de colesterol da membrana espermática, por sua vez, têm sido avaliadas por técnicas como coloração com filipina, ensaios enzimáticos e, mais recentemente, pelo uso de análogos fluorescentes como o BODIPY-colesterol, que permitem a quantificação do efluxo lipídico por citometria de fluxo em células viáveis (BERNECIC et al., 2019a; SANGUINET, 2020). Essas abordagens têm contribuído de forma significativa para o entendimento do papel dos lipídeos na aquisição da competência fertilizante e para a comparação entre diferentes meios capacitantes.

A hiperativação espermática representa uma modificação funcional essencial associada às etapas finais da capacitação e tem sido amplamente investigada em equinos devido à sua relação direta com o sucesso da fertilização *in vitro*. Esse padrão de motilidade é caracterizado por aumento da amplitude lateral da cabeça (ALH), elevação da velocidade curvilínea (VCL) e redução da linearidade (LIN), sendo avaliado objetivamente por sistemas de análise computadorizada do sêmen (CASA) (RATHI et al., 2002). Estudos demonstraram

que, na espécie equina, a capacitação *in vitro* isoladamente é insuficiente para promover taxas satisfatórias de fertilização, sendo necessária a indução da hiperativação, por exemplo, com procaína, para alcançar resultados reprodutíveis (MCPARTLIN et al., 2009). Ressalta-se, contudo, que os critérios cinemáticos utilizados para definir hiperativação são espécie-específicos e dependem fortemente das configurações do sistema CASA, da concentração espermática e das condições experimentais adotadas (ROASA et al., 2007).

A reação acrossômica também é amplamente empregada como desfecho funcional da capacitação, sendo avaliada a partir da capacidade dos espermatozoides de responder a indutores fisiológicos ou não fisiológicos, como progesterona, proteínas da zona pelúcida, ionóforos de cálcio ou lisofosfatidilcolina (HINRICHS et al., 2002). A quantificação desse evento pode ser realizada por microscopia fluorescente ou citometria de fluxo, utilizando lectinas conjugadas, como PNA ou PSA, geralmente associadas a marcadores de viabilidade celular (GADELLA et al., 2008). Embora a aquisição de responsividade à reação acrossômica seja considerada um indicativo importante de capacitação, respostas excessivas ou precoces podem refletir instabilidade de membrana ou degeneração celular, devendo esse parâmetro ser interpretado com cautela (BERNECIC et al., 2019).

Em conjunto, essas abordagens demonstram que nenhum marcador isolado é capaz de definir de forma inequívoca o estado de capacitação espermática. A avaliação integrada de eventos moleculares, estruturais e funcionais, incluindo fosforilação de tirosina, remodelamento lipídico, hiperativação e reação acrossômica, fornece uma caracterização mais robusta do processo capacitante. Ainda assim, o desfecho funcional, representado pela capacidade de fertilizar o oócito *in vitro*, permanece como o critério mais conclusivo de capacitação efetiva, especialmente na espécie equina, na qual a correlação entre marcadores clássicos e competência fertilizante nem sempre é direta (ROASA et al., 2007; MCPARTLIN et al., 2009).

2.6 Influência dos lipídeos na capacitação espermática

A composição lipídica dos diluentes exerce papel determinante na modulação da capacitação espermática, uma vez que influencia diretamente a fluidez, a organização e a dinâmica da membrana plasmática do espermatozoide. O colesterol e as lipoproteínas da gema de ovo, amplamente empregados em diluentes de refrigeração e criopreservação, atuam como importantes estabilizantes da bicamada lipídica, conferindo proteção contra estresse osmótico, choque térmico e peroxidação lipídica durante o processo de congelamento (OLIVEIRA et al., 2010; MANJUNATH, 2012). Contudo, essa mesma estabilização excessiva pode representar um entrave à capacitação *in vitro*, uma vez que o aumento do conteúdo lipídico reduz a mobilidade dos fosfolipídios e dificulta o efluxo de colesterol, etapa considerada essencial para a ativação da cascata de sinalização intracelular associada à fosforilação de tirosina e à aquisição da competência fertilizante (SPIZZIRI et al., 2010; FÉLIX et al., 2025).

Estudos clássicos em equinos já demonstravam que elevados teores de lipídios na membrana espermática comprometem a resposta aos estímulos capacitantes. Hinrichs et al. (2002) observaram que sêmen equino criopreservado em diluente contendo 21,5% de gema de ovo apresentou taxas de fertilização nulas, enquanto o mesmo ejaculado, congelado em meio com apenas 3% de gema (MFR5), resultou em aproximadamente 15% de fecundações. Esses achados indicam que a maior disponibilidade de colesterol e lipoproteínas no diluente pode inibir a reorganização de membrana necessária à capacitação. De forma complementar, Hernández-Avilés et al. (2025) relataram que diluentes com maior teor de gema promovem melhor motilidade e integridade de membrana após o descongelamento, porém estão associados a menores níveis de fosforilação de tirosina e a uma baixa taxa de reação acrossomal, reforçando que a preservação estrutural ocorre, muitas vezes, à custa da competência funcional.

Além da quantidade total de lipídeos incorporados à membrana, a origem e a forma de incorporação dessas moléculas também exercem influência significativa sobre a resposta capacitante. Lipídeos exógenos provenientes da gema de ovo ou de sistemas de entrega como ciclodextrinas podem modificar a organização lateral da bicamada de maneira distinta do colesterol endógeno, alterando a formação de microdomínios lipídicos e a mobilidade de proteínas de membrana envolvidas na transdução de sinais da capacitação (GADELLA et al., 2008; MANJUNATH, 2012).

A literatura evidencia, portanto, a existência de um equilíbrio delicado entre a proteção lipídica conferida durante a criopreservação e a desestabilização fisiológica requerida para a fertilização. Trabalhos envolvendo o uso de ciclodextrinas carregadas de colesterol ilustram claramente esse paradoxo. Em touros, Yadav et al. (2017) demonstraram que a inserção excessiva de colesterol por meio de ciclodextrinas reduziu a fosforilação de tirosina e a responsividade à capacitação. Em contrapartida, estudos mais recentes em garanhões indicaram que a suplementação com ciclodextrinas pode melhorar a integridade de membrana, a motilidade pós-descongelamento e, em determinadas condições, a resposta a meios capacitantes (CONTRERAS et al., 2022), sugerindo que os efeitos do colesterol são dependentes da espécie, da dose e do protocolo adotado.

Adicionalmente, a modulação lipídica da membrana contribui para a heterogeneidade funcional da população espermática, uma vez que diferentes subpopulações podem responder de forma desigual aos estímulos capacitantes. Essa variabilidade ajuda a explicar por que melhorias em parâmetros estruturais ou cinemáticos pós-descongelamento nem sempre se traduzem em aumento proporcional da competência fertilizante, especialmente em protocolos de fertilização *in vitro* em equinos (BERNECIC et al., 2019b; FÉLIX et al., 2025).

Nesse contexto, o colesterol e os lipídios derivados da gema de ovo configuram uma verdadeira gangorra lipídica, na qual o aumento da estabilidade estrutural da membrana se contrapõe à modulação da reatividade bioquímica necessária à capacitação. Compreender esse equilíbrio torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de capacitação espermática *in vitro* em equinos e para a otimização dos resultados obtidos com biotecnologias reprodutivas avançadas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços recentes na capacitação espermática *in vitro* permitiram a reavaliação da fertilização *in vitro* convencional como uma estratégia viável na espécie equina, desde que a etapa capacitante seja conduzida sob condições rigorosamente controladas. Protocolos baseados na suplementação com penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) em meio TALP demonstraram que o espermatozoide equino mantém competência funcional para responder a estímulos fisiológicos quando parâmetros como tempo de incubação e composição do meio são adequadamente ajustados.

Os resultados também evidenciam que a composição lipídica dos diluentes de refrigeração e criopreservação exerce influência direta sobre a capacidade de progressão da capacitação. Embora o colesterol e as lipoproteínas da gema de ovo sejam essenciais para a estabilidade da membrana e a preservação da viabilidade pós-descongelamento, seu excesso pode limitar o efluxo de colesterol e retardar eventos moleculares determinantes da competência fertilizante. Assim, a eficiência da FIV equina depende de um equilíbrio preciso entre crioproteção e responsividade fisiológica do espermatozoide.

Nesse cenário, a definição de estratégias que conciliem proteção estrutural e adequada remodelação de membrana, incluindo a modulação lipídica dos diluentes e meios capacitantes, representa um passo fundamental para o aprimoramento de protocolos reprodutíveis e fisiologicamente fundamentados, contribuindo para a consolidação da produção *in vitro* de embriões equinos.

4. HIPÓTESE E OBJETIVOS

4.1 Hipótese

A composição lipídica dos diluentes utilizados nas etapas de centrifugação e congelação, incluindo colesterol, lipoproteínas da gema de ovo e crioprotetores, exerce influência direta sobre a fluidez e a estabilidade da membrana espermática, afetando eventos associados à capacitação espermática *in vitro* e podendo impactar a competência fecundante de espermatozoides equinos congelados.

4.2 Objetivo(s) geral(s)

Avaliar a influência da composição lipídica dos diluentes de centrifugação e congelação (concentração de gema de ovo, a presença ou ausência de colesterol, bem como a presença ou ausência de amidas e glicerol) sobre a viabilidade espermática, o efluxo de colesterol e a competência fecundante de espermatozoides equinos congelados, visando otimizar protocolos de capacitação e fertilização *in vitro*.

4.3 Objetivo(s) específico(s)

- 1- Avaliar o efeito de diferentes diluentes de centrifugação (BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN SPECIAL®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN GOLD®) sobre a cinética e a viabilidade espermática pós-descongelação, bem como sobre o padrão de hiperativação após incubação em meio FT-PHE.
- 2- Comparar diferentes diluentes de congelação quanto à composição lipídica (colesterol, caseína, gema de ovo, leite desnatado e crioprotetores), tempo de estabilização e seus efeitos sobre a cinética espermática e a integridade celular.
- 3- Avaliar o efluxo de colesterol da membrana plasmática espermática, por meio do uso da sonda fluorescente BODIPY-colesterol, após incubação em condições capacitantes, relacionando esse parâmetro com a composição lipídica dos diluentes utilizados.

- 4- Avaliar o desempenho de diferentes técnicas de seleção espermática (EquiPure®, VetMotl®, MFSS® e Swim-Up) sobre a qualidade estrutural e funcional dos espermatozoides pós-descongelamento.
- 5- Testar a eficiência de protocolos otimizados na fertilização *in vitro* (FIV) com sêmen congelado, determinando as taxas de clivagem e formação de blastocistos.

5. REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J. *et al.* Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 2, p. 1–10, 2016.
- ALM, H. *et al.* Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p. 817–829, 2001.
- AMANN, R. Functional anatomy of the adult male. In: MCKINNON, A. O. (ed.). *Equine Reproduction*. 2. ed. v. 2. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 868–879.
- ARRAIS, A. M. *et al.* Efeito da inibição da fosfolipase C pelo U73122 sobre o sêmen ovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2016.
- ARROYO-SALVO, Camila *et al.* Effect of bicarbonate and polyvinyl alcohol on in vitro capacitation and fertilization ability of cryopreserved equine spermatozoa. *Andrology*, v. 13, n. 2, p. 382–395, 2025.
- AUSTIN, C. R. The “capacitation” of the mammalian sperm. *Nature*, v. 170, n. 4321, p. 326–326, 1951.
- BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 4, p. 508–515, 2001.
- BERNECIC, N. C. *et al.* BODIPY-cholesterol can be reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian spermatozoa. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 9804, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46225-3.
- BERNECIC, N. C. *et al.* Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology*, v. 137, p. 56–66, 2019.
- BETARELLI, R. P. *Efeitos da glutatona reduzida sobre os processos de capacitação e reação acrossômica in vitro em espermatozoides suínos refrigerados*. 2016. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- BÉZARD, J. In vitro fertilization in the mare. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 168, p. 993–1003, 1992.
- BLUE, B. J. *et al.* Capacitation of stallion spermatozoa and fertilisation of equine oocytes in vitro. *Equine Veterinary Journal*, v. 21, Supl. 8, p. 111–116, 1989.
- BRINSKO, S. P. *et al.* *Manual of Equine Reproduction*. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2010.
- CAMARGO, C. E. A arte de inseminar éguas com sêmen congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 47, n. 2, p. 226–230, 2023.
- CARNEVALE, Elaine M.; METCALF, Elizabeth S. Morphology, developmental stages and quality parameters of in vitro-produced equine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 12, p. 1758–1770, 2019.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, v. 168, n. 4277, p. 697–698, 1951.
- CHOI, Y. H. *et al.* In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology*, v. 42, n. 5, p. 795–802, 1994.
- CONTRERAS, M. J. *et al.* Effect of cholestanol and cholesterol-loaded cyclodextrin on stallion sperm function and capacitation post-cryopreservation. *Theriogenology*, v. 189, p. 1–10, 2022.
- DAVIES-MOREL, M. C. G. The reproductive anatomy of the stallion. In: *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 3. ed. Wallingford: CABI, 2008. p. 15–27.

DELL'AQUILA, M. E. *et al.* Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 2, p. 533–540, 1999.

DELL'AQUILA, M. E. *et al.* Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v. 12, n. 12, p. 2766–2772, 1997.

DELL'AQUILA, M. E. *et al.* In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, v. 45, n. 3, p. 547–560, 1996.

DELL'AQUILA, M. E. *et al.* Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology*, v. 47, n. 6, p. 1139–1156, 1997.

FÉLIX, M. R. *et al.* Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, v. 107, n. 6, p. 1551–1564, 2022.

FÉLIX, M. R.; HINRICHS, K. Selection of frozen-thawed semen for standard in vitro fertilization. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 125, p. 104648, 2023.

FELIX, Matheus R. *et al.* Equine in vitro fertilization with frozen–thawed semen is associated with shortened pre-incubation time and modified capacitation-related changes. *Biology of Reproduction*, v. 112, n. 5, p. 867-879, 2025.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Biomembranes*, v. 1469, n. 3, p. 197–235, 2000.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, v. 127, n. 11, p. 2407-2420, 2000.

GADELLA, Bart M. *et al.* Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology*, v. 52, n. 5-6, p. 473-480, 2008.

Gonzalez-Castro, R. A., Porflidt, C., Ash, A. L., Rodriguez, J. S., Fluery, P., Squires, E. L., & Carnevale, E. M. Frozen-Thawed Sperm Binding to Zona Pellucida and Production of Blastocysts after in Vitro Fertilization of Oocytes from Young and Old Mares. 2025. Available at SSRN 5175383.

GRAHAM, J. K. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 111–117, 1996.

GUASTI, P. N. *Avaliação dos constituintes proteicos do plasma seminal e da membrana plasmática de espermatozoides e sua correlação com a fertilidade de garanhões*. 2014. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

HARTWIG, F. P.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: uma revisão. *Veterinária e Zootecnia*, p. 157–168, 2012.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C.; RAMÍREZ-AGÁMEZ, L.; LOVE, C. C. The relationship between post-thaw sperm quality parameters and blastocyst production following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology*, v. 244, p. 117500, 2025.

HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 4–13, 2018.

HINRICHS, K. *et al.* In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 1, p. 256–262, 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Rebanho de equinos (cavalos)*, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>. Acesso em: 22 out. 2025.

LEEMANS, B. *et al.* Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction*, v. 157, n. 5, p. R181–R197, 2019.

LEEMANS, B. *et al.* Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, v. 152, n. 6, p. R233–R245, 2016.

MAITAN, P. *et al.* A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: in vivo and in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*, v. 246, p. 106848, 2022.

MARTIN-PELAEZ, S.; DE LA FUENTE, A.; TAKAHASHI, K.; TIRADO PEREZ, I.; OROZCO, J.; OKADA, C. T. C.; RAMIRES NETO, C.; MEYERS, S.; DINI, P. IVF with frozen-thawed sperm after prolonged capacitation yields comparable results to ICSI in horses: a morphokinetics study. *Theriogenology*, v. 232, p. 39–45, 2025.

MCPARTLIN, L. A. *et al.* Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 1, p. 199–206, 2009.

MUGNIER, S. *et al.* The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2009.

PALMER, E. *et al.* In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, v. 44, p. 375–384, 1991.

PAPAS, M.; GOVAERE, J.; PEERE, S.; GERITS, I.; VAN DEN BRANDEN, E.; FERNÁNDEZ-MONTORO, A.; DE COSTER, T.; HEDIA, M.; ANGEL-VÉLEZ, D.; VAN SOOM, A.; SMITS, K. Development of the first equine blastocyst produced by conventional IVF and in vitro culture in Europe resulting in the birth of a foal. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v. 93, n. 3, p. 131–134, 2024.

RATHI, R. *et al.* Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 2, p. 462–470, 2001.

ROASA, L. M. *et al.* Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes in vitro. *Theriogenology*, v. 68, n. 4, p. 560–566, 2007.

SAACKKE, R. G.; ALMQUIST, J. O. Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal, ejaculated sperm. *American Journal of Anatomy*, v. 115, n. 1, p. 143–161, 1964.

SAMPER, J. C. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2. ed. St. Louis: Elsevier, 2008.

TREMOLEDA, J. L. *et al.* Evaluation of sperm-oocyte interaction during in vitro fertilization in the horse. In: *In Vitro Production of Horse Embryos: Fundamental Aspects*. Ghent: Ghent University Press, 2003. p. 67–91.

VARNER, D. D. *et al.* Semen processing for the subfertile stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, n. 11, p. 677–685, 2008.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, v. 47, n. 1, p. 16–24, 2015.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. In: MCKINNON, A. O. *Equine Reproduction*. 2. ed. v. 2. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 909–990.

VISCONTI, P. E. *et al.* Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, v. 121, n. 4, p. 1129–1137, 1995.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, v. 2, n. 4, p. 371–372, 1994.

ZHANG, J. J.; MUZS, L. Z.; BOYLE, M. S. In vitro fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, n. 4, p. 361–365, 1990.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, Camilo *et al.* Effects of egg yolk level, penetrating cryoprotectant, and pre-freeze cooling rate, on the post-thaw quality of stallion sperm. *Animal reproduction science*, v. 248, p. 107162, 2023.

LUIS-CALERO, Marcos *et al.* Prolonged incubation of frozen–thawed equine spermatozoa for in vitro fertilization: A preliminary study using low temperature and INRA 96 medium. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, p. e14593, 2024.

GALLI, Cesare *et al.* Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 138-151, 2014.

BROOThAERS, Klaartje *et al.* Incubation of Frozen-Thawed Semen Under Capacitating Conditions Supports Successful In Vitro Fertilization and Improves Intracytoplasmic Sperm Injection-Results in Horses. *Andrology*, 2025.

BROOThAERS, Klaartje *et al.* Transcriptomic profiling reveals similarities between equine IVF and ICSI embryos. *Theriogenology*, p. 117749, 2025.

SANGUINET, Eduardo de Oliveira. Sobrevivência in vitro de sêmen criopreservado equino e de ruminantes após indução à capacitação espermática e da reação acrossômica para aplicação na produção in vitro de embriões. 2020.

MANJUNATH, Nandini *et al.* Comparison of plasma lipid and blood glucose level in obese and non obese patients with moderate periodontitis. *International Journal of Contemporary Dentistry*, v. 3, n. 1, 2012.

OLIVEIRA, C. H. D. *et al.* Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 118, n. 2-4, p. 194-200, 2010.

SPIZZIRI, B. E. *et al.* Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 118, n. 2-4, p. 255-264, 2010.

YADAV, Hanuman P. *et al.* Effect of cholesterol loaded cyclodextrin supplementation on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 96, p. 164-171, 2017.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Capacitação espermática *in vitro* de sêmen equino congelado: Efeitos da composição dos diluentes sobre eventos funcionais associados à fertilização

In vitro sperm capacitation of frozen equine semen: Effects of diluent composition on functional events associated with fertilization

Zutter, B. M^{1*}; Freitas-Dell'Aqua, C, P¹, Puelker, R, Z², Soares, A. C. S², Papa, F. O¹

¹ Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

² EquinVtro Reprodução Animal, Anhembi, São Paulo, Brazil

*Corresponding author

E-mail address: bruna.zutter@unesp.br (BM Zutter)

Resumo

A fertilização *in vitro* (FIV) em equinos é limitada pela dificuldade de induzir, *in vitro*, os eventos fisiológicos da capacitação espermática, especialmente quando se utiliza sêmen criopreservado. Este estudo avaliou a influência dos diluentes de centrifugação e congelamento, dos métodos de seleção espermática e da dinâmica do efluxo de colesterol sobre a funcionalidade espermática e a capacidade de fecundação *in vitro* de sêmen equino congelado. Diferentes diluentes comerciais e experimentais foram testados quanto à cinética espermática, integridade de membrana, potencial mitocondrial, estresse oxidativo e efluxo de colesterol, utilizando análises por CASA e citometria de fluxo. A seleção espermática foi comparada entre Swim-Up, EquiPure® e microfluídica (VetMotl®). Os resultados demonstraram que a composição dos diluentes de congelamento exerce maior impacto funcional do que os diluentes de centrifugação, com destaque para formulações baseadas em glicerol e menor carga lipídica. O efluxo de colesterol ocorreu predominantemente nas primeiras

1 horas de incubação em meio capacitante, sendo dependente do tempo e pouco
2 influenciado pelos diluentes avaliados. A seleção microfluídica por VetMotl®
3 promoveu melhor preservação estrutural e funcional dos espermatozoides,
4 sendo associada à obtenção de clivagem e blastocistos na FIV com sêmen
5 congelado. Conclui-se que a integração entre composição lipídica adequada dos
6 diluentes, seleção espermática microfluídica e controle temporal da capacitação
7 permite restaurar a competência fecundante do espermatozoide equino pós-
8 descongelação, reforçando o potencial da FIV convencional como alternativa
9 viável em programas de reprodução assistida em equinos.

10

11 **Palavras-chave:** Capacitação espermática; Criopreservação; Microfluídica;
12 Fertilização *in vitro*; Equinos.

13

1 **4 Introdução**

2
3 A fertilização *in vitro* (FIV) na espécie equina ainda apresenta limitações
4 relevantes, principalmente em decorrência da dificuldade em reproduzir *in vitro*
5 os eventos fisiológicos que caracterizam a capacitação espermática. Esse
6 processo é essencial para a aquisição da competência fecundante e envolve
7 uma sequência coordenada de modificações bioquímicas, incluindo o efluxo de
8 colesterol da membrana plasmática, o aumento do pH intracelular, o influxo de
9 Ca^{2+} e HCO_3^- e a intensificação da fosforilação de resíduos de tirosina (Leemans
10 et al., 2016; Hinrichs, 2010; Bromfield et al., 2014). A falha em induzir
11 adequadamente essas alterações explica, em grande parte, o baixo
12 desempenho histórico da FIV convencional em equinos, em contraste com o
13 sucesso observado em outras espécies domésticas (Alm et al., 2001; Mugnier et
14 al., 2009).

15 Um avanço decisivo foi descrito por Félix et al. (2022), que demonstraram,
16 pela primeira vez, a viabilidade da capacitação espermática *in vitro* em sêmen
17 fresco de garanhões, utilizando meio Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP)
18 suplementado com penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE). Posteriormente,
19 o mesmo grupo adaptou o protocolo para sêmen congelado e associou a
20 capacitação à seleção espermática física, obtendo elevadas taxas de clivagem
21 embrionária (Martin-Peláez et al., 2024). Esses resultados foram confirmados
22 por estudos subsequentes, que relataram a produção de blastocistos e o
23 nascimento de potros a partir de FIV convencional, com desempenho
24 embrionário comparável ao observado após injeção intracitoplasmática de
25 espermatozoides (ICSI) (Papas et al., 2024; Ramírez-Agámez et al., 2025; Félix
26 et al., 2025).

27 Apesar desses avanços, aspectos fundamentais da fisiologia espermática
28 equina permanecem incompletamente elucidados, especialmente no que se
29 refere ao papel do colesterol de membrana durante a capacitação. O colesterol
30 exerce função dual, atuando como estabilizador da membrana plasmática
31 durante a criopreservação e, simultaneamente, como alvo de remoção
32 controlada durante a capacitação, etapa necessária para a reorganização da
33 bicamada lipídica, o aumento da permeabilidade iônica e a ativação de cascatas
34 de sinalização associadas à fertilização (Zahn, Papa, Dell'Aqua, 2002). Em

1 equinos, o elevado conteúdo de colesterol na membrana espermática tem sido
2 associado a uma progressão mais lenta dos eventos capacitantes, sugerindo
3 que a composição lipídica pode modular a responsividade dos espermatozoides
4 às condições capacitantes *in vitro* (Contreras et al., 2022).

5 Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do
6 colesterol sobre a capacitação espermática *in vitro* de sêmen equino
7 descongelado, investigando parâmetros cinéticos e funcionais relacionados à
8 aquisição da competência fecundante. A compreensão desses mecanismos é
9 fundamental para o aprimoramento dos protocolos de FIV convencional e para o
10 avanço das biotecnologias reprodutivas aplicadas à espécie equina.

11

12 **5 Material e métodos**

13

14 **5.1 Aspectos éticos**

15

16 Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com
17 as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
18 (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
19 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
20 Paulista (FMVZ/UNESP), sob o protocolo nº 305/2025.

21

22 **5.2 Delineamento experimental**

23

24 O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
25 da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP), Campus de Botucatu, e na
26 EQUUS – Equine Services, localizada em Novo Horizonte, São Paulo, Brasil.

27 Foram utilizados 15 garanhões clinicamente sadios, com idade entre 10 e
28 20 anos, pertencentes às raças Crioulo, Mangalarga Marchador e Quarto de
29 Milha, todos com histórico reprodutivo conhecido e manejo reprodutivo regular.
30 Adicionalmente, foram utilizadas 10 éguas clinicamente sadias, sem raça
31 definida, com idade entre 10 e 20 anos, previamente submetidas a avaliação
32 ginecológica, incluindo exame ultrassonográfico uterino, para a obtenção de
33 oócitos por aspiração folicular.

34 Os animais foram mantidos em piquetes individuais (25 × 25 m),

1 recebendo feno de Tifton-85 (*Cynodon spp.*), ração comercial balanceada, sal
2 mineral e água ad libitum.

3 O presente estudo foi estruturado de forma sequencial, sendo cada
4 experimento delineado com base nos resultados obtidos na etapa anterior,
5 permitindo a construção progressiva de um protocolo otimizado de capacitação
6 espermática e fertilização *in vitro* em equinos. Inicialmente, no Experimento I,
7 avaliou-se a influência da composição dos diluentes de centrifugação sobre a
8 qualidade espermática pós-descongelação e sobre a resposta à capacitação *in*
9 *vitro*, possibilitando a seleção dos diluentes com melhor desempenho funcional.
10 Com base nesses achados, o Experimento II teve como objetivo avaliar a
11 influência da composição dos diluentes de congelação, considerando a
12 concentração de gema de ovo, bem como a presença ou ausência de glicerol e
13 amidas, sobre a qualidade espermática pós-descongelação.

14 A partir dos grupos com melhor desempenho, o Experimento III foi
15 conduzido para avaliar o efeito combinado entre diluentes de centrifugação e
16 congelação, incluindo a adição de leite desnatado, com o objetivo de identificar
17 a combinação mais eficiente para a manutenção da funcionalidade espermática.
18 Posteriormente, o Experimento V foi realizado para investigar a dinâmica do
19 efluxo de colesterol durante a capacitação espermática *in vitro*, utilizando as
20 combinações previamente selecionadas. Por fim, no Experimento VI, os
21 protocolos otimizados foram aplicados na fertilização *in vitro*, permitindo a
22 avaliação funcional da competência fecundante dos espermatozoides.

23

24 5.3 Experimento I – Avaliação da influência de diluentes de centrifugação sobre 25 a viabilidade pós-descongelação e a hiperativação espermática de sêmen 26 equino congelado

27

28 Neste experimento (Figura 1), avaliou-se a influência da composição
29 lipídica de diferentes diluentes utilizados antes da criopreservação sobre a
30 viabilidade espermática pós-descongelação e sobre a capacidade de
31 hiperativação espermática *in vitro*, adotada como desfecho funcional da resposta
32 aos estímulos capacitantes. Foram utilizados seis ejaculados provenientes de
33 quatro garanhões clinicamente sadios (n = 24), previamente aprovados em
34 exame andrológico.

1 Cada ejaculado fresco foi dividido em quatro alíquotas iguais e diluído
2 (1:1) nos seguintes diluentes experimentais: BotuSÊMEN® (à base de leite
3 desnatado), BotuSÊMEN KZ® (à base de caseína, livre de colesterol),
4 BotuSÊMEN SPECIAL® (suplementado com colesterol) e BotuSÊMEN GOLD®
5 (à base de caseína e colesterol) (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Todos os
6 diluentes continham açúcares, aminoácidos, antioxidantes e excipientes,
7 diferindo principalmente quanto à composição lipídica e proteica. O BotuSÊMEN
8 KZ® continha caseína como principal fonte proteica, sem suplementação de
9 colesterol, enquanto o BotuSÊMEN GOLD® associava caseína e colesterol
10 visando maior estabilização da membrana espermática. Já o BotuSÊMEN
11 SPECIAL® apresentava suplementação lipídica baseada em colesterol,
12 enquanto o BotuSÊMEN® utilizava leite desnatado como base proteica.

13 A criopreservação foi realizada conforme protocolo previamente descrito
14 por Papa et al (2002), utilizando diluente comercial à base de gema de ovo
15 (BotuCRIO®; Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Após o descongelamento (37
16 °C por 30 s), as amostras foram submetidas à seleção espermática por gradiente
17 de densidade (EquiPure®; Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), conforme descrito
18 no tópico 2.9.1.

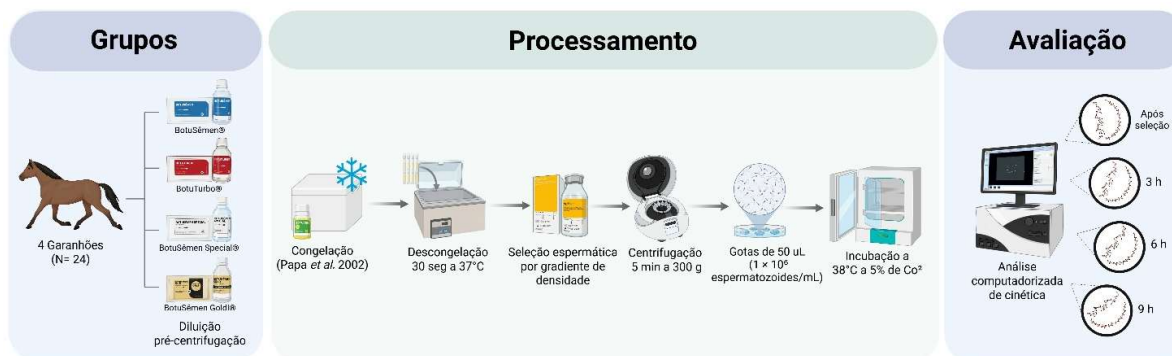
19 Para os ensaios de capacitação, alíquotas padronizadas da suspensão
20 espermática foram incubadas em meio capacitante FT-PHE, conforme descrito
21 no tópico 2.9.3, mantendo-se concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.
22 As amostras foram incubadas a 38 °C, em atmosfera umidificada contendo 5 %
23 de CO₂.

24 A cinética espermática foi avaliada imediatamente após a descongelação,
25 após a seleção espermática (tempo 0) e após 3, 6 e 9 h de incubação em meio
26 capacitante. As análises foram realizadas por sistema de análise
27 computadorizada do sêmen (CASA; HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research,
28 Beverly, MA, EUA), conforme descrito por Rath et al. (2001).

29 Os diluentes utilizados neste experimento foram selecionados devido às
30 diferenças em sua composição proteica e lipídica, especialmente quanto à
31 presença de colesterol, caseína e leite desnatado, componentes potencialmente
32 envolvidos na estabilização da membrana espermática e na modulação da
33 resposta à capacitação *in vitro*.

34

1 Figura 1. Esquema do delineamento experimental do Experimento I. Ejaculados foram diluídos
 2 em diferentes diluentes de centrifugação, criopreservados, descongelados e submetidos à
 3 seleção espermática por gradiente de densidade. Após a seleção, as amostras foram incubadas
 4 a 38 °C em 5 % de CO₂, com avaliação da cinética espermática por CASA imediatamente após
 5 a descongelação, após a seleção (tempo 0) e após 3, 6 e 9 h de incubação.



7 Created in <https://BioRender.com>

8

9 5.4 Experimento II – Avaliação do tempo de estabilização seminal em diferentes 10 diluentes crioprotetores

11

12 Com base nos achados do Experimento I, este experimento teve como
 13 objetivo avaliar se modificações na composição do diluente BotuCRIO®,
 14 especialmente na concentração de gema de ovo e na composição dos
 15 crioprotetores permeáveis, interferem nos processos fisiológicos associados à
 16 hiperativação espermática (Figura 2).

17 Foram utilizados dois ejaculados de quatro garanhões clinicamente
 18 sadios (n = 8). Inicialmente, os ejaculados foram diluídos na proporção de 1:1
 19 em BotuSÊMEN GOLD® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e submetidos à
 20 centrifugação. Após a centrifugação, as amostras foram divididas em cinco
 21 grupos experimentais, compostos por diluentes formulados a partir da base do
 22 BotuCRIO® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), variando-se a concentração de
 23 gema de ovo e a composição dos crioprotetores permeáveis, especialmente
 24 glicerol e amidas (Tabela 1).

1 Tabela 1. Descrição dos diluentes experimentais testados para avaliação da influência da
 2 composição lipídica e do tempo de estabilização antes da criopreservação.

Grupo	Formulação base	Gema	Glicerol	Amidas
Botucrio®	BotuCRIO® original	10%	1%	4%
G2	Base BotuCRIO® modificada	2%	4%	-
G3	Base BotuCRIO® modificada	2%	2,5%	-
G4	Base BotuCRIO® modificada	2%	2%	3%
G5	Base BotuCRIO® modificada	2%	2%	3%

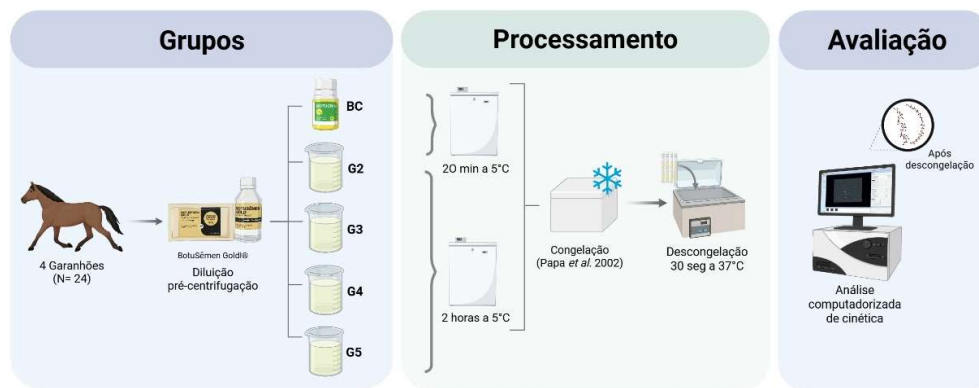
3 Fonte – Do autor

4

5 Cada grupo experimental foi subdividido em dois subgrupos, os quais
 6 foram mantidos a 5 °C por 20 minutos, conforme o protocolo clássico descrito
 7 por Papa et al. (2002), ou por 2 horas, utilizando uma modificação do protocolo,
 8 com o objetivo de favorecer maior penetração e interação dos crioprotetores com
 9 a membrana espermática antes da congelação. A criopreservação foi realizada
 10 de acordo com os respectivos protocolos de estabilização. Após o
 11 congelamento, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por
 12 30 segundos, e as amostras foram submetidas à avaliação da cinética
 13 espermática por análise computadorizada do sêmen (CASA), seguindo protocolo
 14 de Carneiro et al. (2018).

15 As formulações crioprotetoras derivadas do BotuCRIO® foram utilizadas
 16 com o objetivo de avaliar o impacto da redução da concentração de gema de ovo
 17 e das diferentes combinações de crioprotetores permeáveis, como glicerol e
 18 amidas, sobre a funcionalidade espermática pós-descongelação.

1 Figura 2. Esquema do delineamento experimental do Experimento II. Ejaculados foram diluídos
 2 em diferentes diluentes crioprotetores, submetidos a dois tempos de estabilização (20 min ou 2
 3 h a 5 °C), criopreservados, descongelados e avaliados quanto à cinética espermática por análise
 4 computadorizada após a descongelação.



5
 6 Created in <https://BioRender.com>

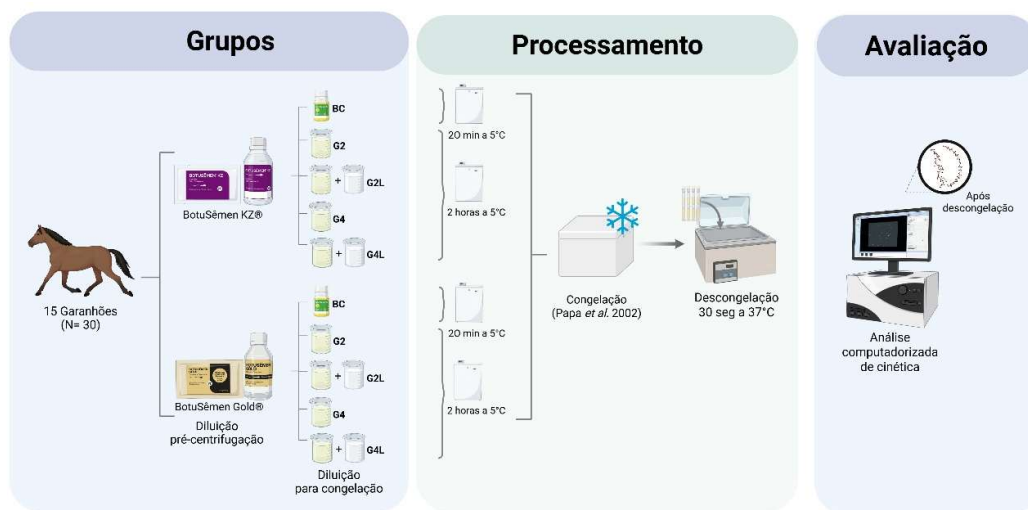
7 8 5.5 Experimento III – Influência de diferentes composições de crioprotetores na 9 viabilidade espermática

10

11 Com base nos resultados obtidos no Experimento II, foram selecionadas
 12 as formulações crioprotetoras com melhor desempenho para as etapas
 13 subsequentes. Neste experimento, avaliou-se o efeito combinado entre
 14 diferentes diluentes de centrifugação e formulações de congelação sobre a
 15 cinética espermática pós-descongelação, incluindo a suplementação dos
 16 diluentes com leite desnatado.

17 Foram utilizados ejaculados de quinze garanhões (n = 30), os quais foram
 18 divididos em duas alíquotas e diluídos nos diluentes BotuSÊMEN GOLD® e
 19 BotuSÊMEN KZ® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), previamente
 20 selecionados no Experimento I. Após a centrifugação, o sedimento espermático
 21 foi subdividido em cinco alíquotas, cada uma ressuspensa em um dos
 22 seguintes diluentes de congelação: BotuCRIO® (BC), G2, G2 suplementado com
 23 20% de leite desnatado (G2L), G4 e G4 suplementado com 20% de leite
 24 desnatado (G4L).

1 Figura 3. Esquema do delineamento experimental do Experimento III, incluindo diluição
 2 centrifugação, estabilização seminal a 5 °C (20 min ou 2 h), criopreservação, descongelamento e
 3 avaliação computadorizada da cinética espermática.



4
 5 Created in <https://BioRender.com>

6
 7 Dessa forma, foram constituídos dez grupos experimentais: BG+BC,
 8 BG+G2, BG+G2L, BG+G4, BG+G4L, KZ+BC, KZ+G2, KZ+G2L, KZ+G4 e
 9 KZ+G4L. As amostras dos grupos BG+BC e KZ+BC foram submetidas ao
 10 protocolo clássico de criopreservação descrito por Papa et al. (2002), com
 11 estabilização a 5 °C por 20 minutos. Em contraste, os demais grupos
 12 experimentais foram submetidos a um protocolo modificado, no qual as amostras
 13 permaneceram 2 horas em estabilização a 5 °C, visando maior permeabilidade
 14 da membrana espermática e melhor difusão dos crioprotetores antes da
 15 congelamento (Tabela 2).

16 A associação entre diferentes diluentes de centrifugação e congelamento,
 17 bem como a suplementação com leite desnatado, foi realizada visando investigar
 18 possíveis interações entre os componentes proteicos e lipídicos dos meios sobre
 19 a estabilidade e funcionalidade da membrana espermática.

1 Tabela 2. Grupos experimentais formados pela combinação dos diluentes de centrifugação e de
2 congelação, com respectivos tempos de estabilização antes da criopreservação.

Grupo Experimental	Diluyente de Centrifugação	Diluyente de Congelação	Tempo de Estabilização (5 °C)
BG + BC	BotuSÊMEN GOLD®	BotuCRIO® (controle)	20 min
BG + G2	BotuSÊMEN GOLD®	G2	2 h
BG + G2.1	BotuSÊMEN GOLD®	G2 + 20% leite desnatado	2 h
BG + G4	BotuSÊMEN GOLD®	G4	2 h
BG + G4.1	BotuSÊMEN GOLD®	G4 + leite desnatado	2 h
KZ + BC	BotuSÊMEN KZ®	BotuCRIO® (controle)	20 min
KZ + G2	BotuSÊMEN KZ®	G2	2 h
KZ + G2.1	BotuSÊMEN KZ®	G2 + leite desnatado	2 h
KZ + G4	BotuSÊMEN KZ®	G4	2 h
KZ + G4.1	BotuSÊMEN KZ®	G4 + leite desnatado	2 h

3 Fonte – Do autor

4

5 Após a descongelação das palhetas em banho-maria a 37 °C por 30
6 segundos, as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática por meio
7 de sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA; HTM-IVOS 12,
8 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, EUA), conforme descrito por Carneiro
9 et al. (2018).

10

11 5.6 Experimento IV – Impacto de técnicas seletivas na qualidade espermática 12 pós-descongelação

13

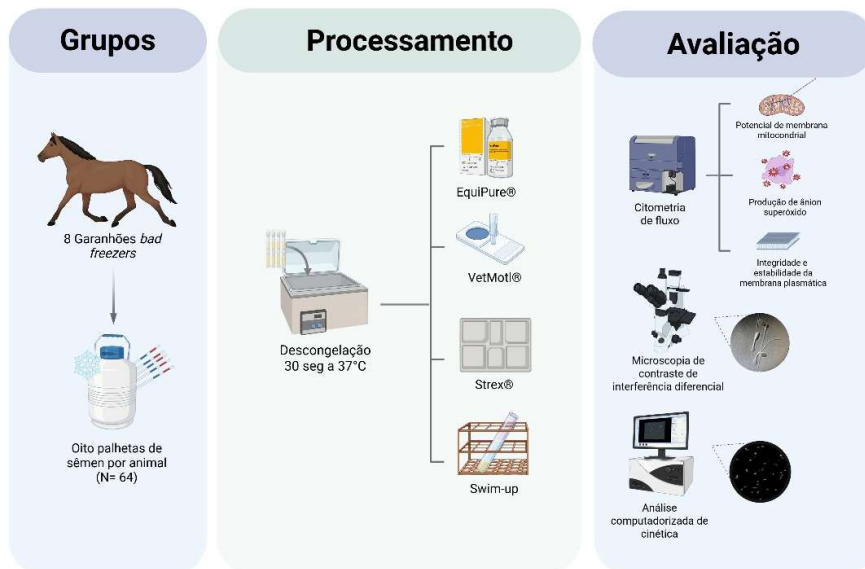
14 Este experimento teve como objetivo comparar a eficiência de quatro
15 técnicas de seleção espermática amplamente empregadas na reprodução
16 assistida, visando identificar o método com maior capacidade de recuperar
17 espermatozoides viáveis e funcionalmente competentes após o
18 descongelamento, com potencial aplicação em protocolos de capacitação
19 espermática e fertilização *in vitro* (Figura 4).

20 Foram utilizados ejaculados previamente criopreservados em BotuCRIO®
21 (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), provenientes de oito garanhões (N = 8)

1 classificados como de baixa tolerância à congelação (*bad freezers*). Para cada
2 animal, quinze palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 s,
3 e o conteúdo seminal foi dividido em quatro alíquotas, submetidas às diferentes
4 técnicas de seleção espermática: gradiente de densidade (Equipure®),
5 microfluídicas (VetMotl® e MFSS®) e *swim-up*.

6 Após o processamento, as amostras foram avaliadas quanto à cinética
7 espermática por meio de sistema computadorizado CASA (HTM-IVOS 12,
8 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, EUA), conforme descrito por Carneiro
9 et al. (2018). Adicionalmente, foram avaliados a integridade e estabilidade da
10 membrana plasmática (YoPro-1), o potencial de membrana mitocondrial
11 (MitoStatus Red), a produção de ânion superóxido (MitoSOX Red) e a morfologia
12 espermática por microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC).

1 Figura 4. Esquema do delineamento experimental do Experimento IV. Sêmen congelado de oito
 2 garanhões classificados como *bad freezers* foi descongelado e submetido a diferentes técnicas
 3 de seleção espermática (Swim-up, EquiPure®, VetMotl® e Strex®), seguido da avaliação da
 4 qualidade espermática por análises de cinética, integridade e estabilidade de membrana,
 5 potencial de membrana mitocondrial, produção de ânion superóxido e morfologia espermática.



6
 7 Created in <https://BioRender.com>

8

9 5.7 Experimento V – Dinâmica do efluxo de colesterol durante a capacitação 10 espermática de sêmen equino criopreservado

11

12 Neste experimento (Figura 5), avaliou-se a dinâmica do efluxo de
 13 colesterol da membrana espermática durante a capacitação *in vitro* de sêmen
 14 equino criopreservado, em função da composição lipídica dos diluentes utilizados
 15 nas etapas de centrifugação e congelação. Foram utilizadas dezesseis amostras
 16 provenientes de dez garanhões (N = 16), distribuídas em quatro grupos
 17 experimentais: BotuSÊMEN GOLD® + BotuCRIO®, BotuSÊMEN GOLD® + G2,
 18 BotuSÊMEN KZ® + BotuCRIO® e BotuSÊMEN KZ® + G2.

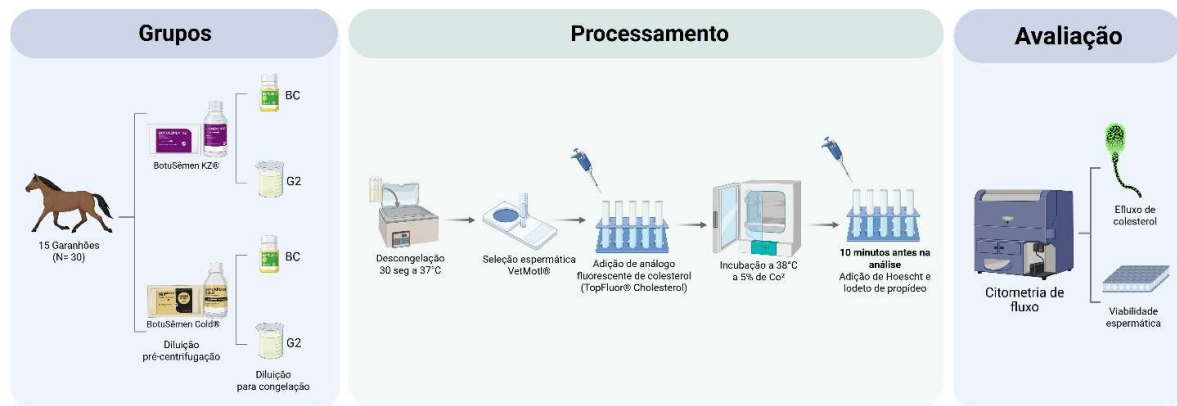
19 As palhetas de sêmen foram descongeladas e submetidas à seleção
 20 espermática por microfluídica (VetMotl®), utilizando duas palhetas posicionadas
 21 na câmara inferior do dispositivo e 750 µL de meio Fert-TALP na câmara superior.
 22 A seleção foi realizada após incubação por 30 minutos a 38 °C, em atmosfera
 23 umidificada contendo 5 % de CO₂. O sêmen selecionado foi então recuperado,
 24 centrifugado e ajustado para a concentração de 10 × 10⁶ espermatozoides/mL.

Posteriormente, alíquotas foram incubadas em meio Fert-TALP suplementado com PHE, obtendo-se concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Para a quantificação do efluxo de colesterol, utilizou-se o análogo fluorescente TopFluor® Cholesterol (BODIPY-cholesterol), adicionado às amostras antes da incubação. Após a marcação, os espermatozoides foram ressuspensos em meio não capacitante (controle) ou em meio capacitante e incubados por 30 minutos, 3, 6 e 9 horas.

Dez minutos antes do término de cada período de incubação, foram adicionados Hoechst 33342 e iodeto de propídio, permitindo a identificação da população celular viável durante a análise. A quantificação do efluxo de colesterol foi realizada por citometria de fluxo, restringindo-se a análise às células viáveis, conforme descrito no tópico metodológico específico.

As combinações experimentais selecionadas foram baseadas nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, permitindo avaliar se diferenças na composição lipídica dos diluentes interfeririam na dinâmica do efluxo de colesterol durante a capacitação espermática *in vitro*.

Figura 5. Esquema do delineamento experimental do Experimento V. para avaliação do efluxo de colesterol durante a capacitação espermática *in vitro*, incluindo descongelação, seleção espermática por microfluídica (VetMotl®), incubação em meio capacitante, marcação fluorescente e análise por citometria de fluxo.



1 5.8 Experimento VI – Fertilização *in vitro* com sêmen congelado

2

3 Foram utilizadas partidas de sêmen congelado provenientes dos grupos
4 BG+G2 e BG+BC, previamente avaliados no Experimento V e selecionados por
5 apresentarem parâmetros compatíveis com a capacitação *in vitro*, incluindo
6 motilidade total superior a 20% após 9 horas de incubação capacitante.

7 Os grupos utilizados na fertilização *in vitro* foram selecionados com base
8 no desempenho funcional observado nos experimentos prévios, especialmente
9 quanto à manutenção da motilidade espermática e da responsividade à
10 capacitação *in vitro*.

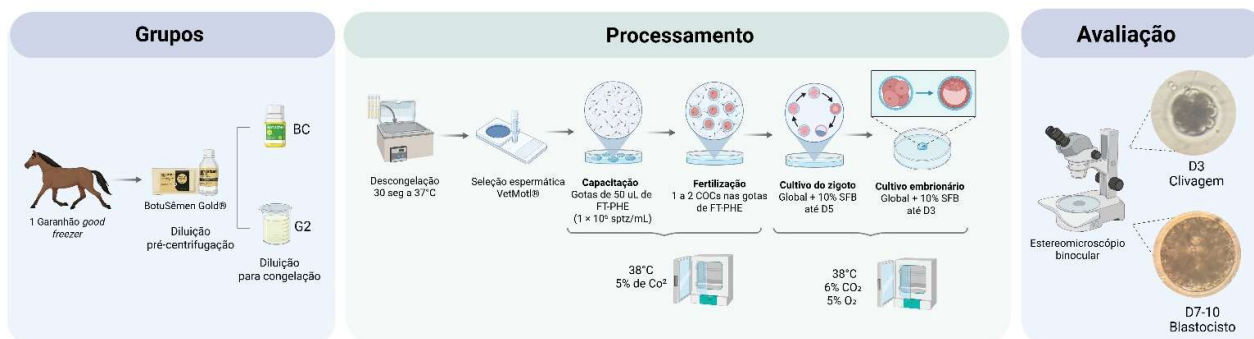
11 Os complexos cúmulus–ócito (COCs) foram obtidos por aspiração
12 folicular guiada por ultrassonografia transvaginal e mantidos em meio holding a
13 22 °C por até 24 horas. Em seguida, os COCs foram submetidos à maturação *in*
14 *vitro* em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 mU/mL de
15 FSH e 25 µg/mL de gentamicina, sob atmosfera controlada a 38 °C e 5% de CO₂,
16 por 30 horas.

17 Os espermatozoides foram selecionados por microfluídica utilizando o
18 sistema VetMotl® e submetidos à capacitação *in vitro* em meio Fert-TALP
19 suplementado com penicilamina, hipotaurina e epinefrina (FT-PHE) por 9 horas,
20 a 38 °C e 5,5% de CO₂. Após esse período, os COCs maturados foram
21 adicionados às gotas contendo os espermatozoides capacitados, permanecendo
22 em coincubação por 3 horas.

23 Após a coincubação, os presumíveis zigotos foram transferidos para meio
24 Global® suplementado com soro fetal bovino (GL-FBS) e cultivados sob
25 atmosfera com baixa tensão de oxigênio (6% CO₂, 5% O₂ e N₂ balanceado). As
26 estruturas foram avaliadas quanto à taxa de clivagem no dia 3 (D3) e ao
27 desenvolvimento embrionário entre os dias 7 e 10 (D7 a D10) (Figura 6).

28

1 Figura 6. Delineamento experimental do Experimento 6. Esquema da fertilização *in vitro* com
 2 sêmen equino congelado, incluindo as etapas de descongelação, seleção espermática por
 3 microfluídica (VetMotl®), capacitação *in vitro* em meio FT-PHE, coincubação com complexos
 4 cúmulus-oócito e cultivo embrionário *in vitro*, com avaliação da taxa de clivagem no dia 3 (D3) e
 5 da formação de blastocistos entre os dias 7 e 10 (D7–D10).



7 Created in <https://BioRender.com>

8

9 5.9 Métodos gerais

10

11 Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-
 12 Aldrich (St. Louis, MO, EUA), exceto quando especificado.

13

14 5.9.1 Colheita e congelamento de sêmen

15

16 Inicialmente, foram coletados três ejaculados de cada garanhão, com
 17 intervalo de dois dias entre as colheitas, com o objetivo de eliminar possíveis
 18 células degeneradas acumuladas no trato reprodutor e promover a estabilização
 19 dos parâmetros espermáticos. Para a execução do experimento, os animais (N
 20 = 15) foram posteriormente submetidos a duas colheitas adicionais, totalizando
 21 30 ejaculados, realizadas com o auxílio de vagina artificial modelo BotuPharma®
 22 (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

23 Após a colheita, os ejaculados foram imediatamente filtrados para
 24 remoção da fração gel e de eventuais detritos, sendo o volume total determinado
 25 por leitura em proveta graduada. A concentração espermática foi avaliada por
 26 contagem em câmara de Neubauer (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil),
 27 após diluição na proporção de 1:20.

28 Em seguida, cada ejaculado foi fracionado em duas ou quatro alíquotas
 29 de igual volume, conforme o delineamento experimental de cada etapa, e diluído

1 na proporção de 1:1 nos respectivos diluentes previamente definidos. As
2 amostras permaneceram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente,
3 visando permitir a interação entre os espermatozoides e os componentes do
4 diluente. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 600
5 g por 10 minutos (Centrífuga Baby I 206 BL, Fanem, Guarulhos, SP, Brasil).

6 Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e
7 o pellet espermático foi ressuspendido no diluente correspondente à etapa
8 experimental, ajustando-se a concentração final para 200×10^6
9 espermatozoides/mL. Para as amostras destinadas à congelação no diluente
10 BotuCRIO® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), foi adotado o protocolo padrão
11 descrito por Papa et al. (2002), incluindo o período convencional de
12 estabilização. Em contraste, para os diluentes experimentais G2, G2L, G3, G4,
13 G4L e G5, as amostras foram submetidas a um período de estabilização
14 prolongado de 2 horas a 5 °C, em geladeira, previamente à congelação.

15 Após a homogeneização, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL,
16 seladas com álcool polivinílico, e submetido ao processo de congelação
17 conforme o protocolo previamente descrito.

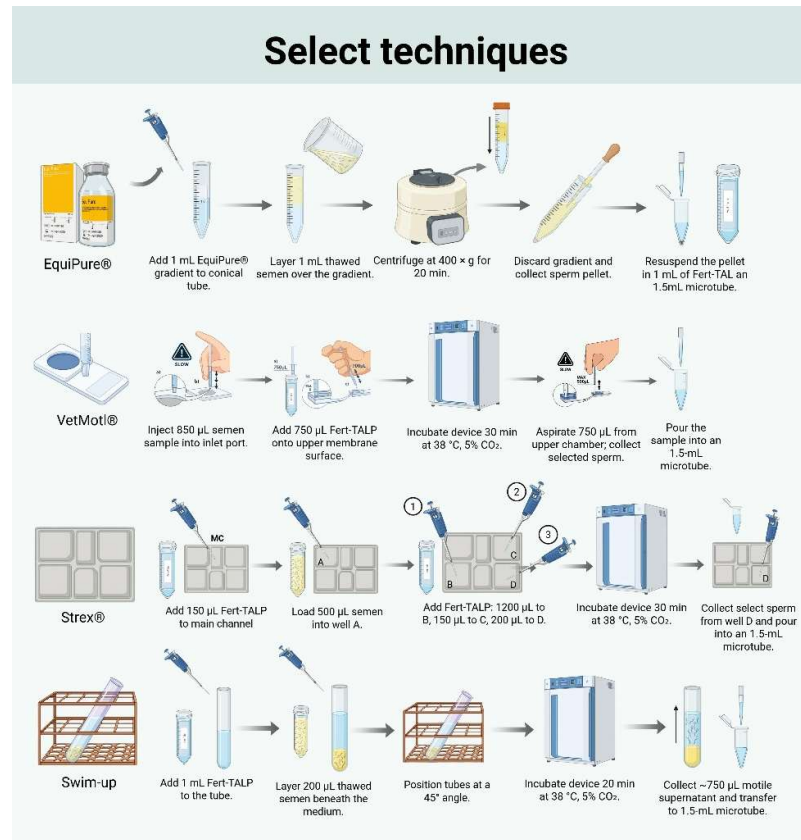
18

19 5.9.2 Seleção espermática

20

21 Foram avaliadas quatro metodologias (Figura 7) de seleção espermática
22 amplamente empregadas em programas de reprodução assistida, com o objetivo
23 de comparar sua eficiência na recuperação de espermatozoides viáveis e
24 funcionalmente competentes para aplicação em protocolos de capacitação e
25 fertilização *in vitro* (FIV). As técnicas avaliadas compreenderam: separação
26 coloidal por gradiente de densidade (EquiPure®, Botupharma, Botucatu, SP,
27 Brasil), seleção microfluídica (VetMotl®, VetMotl Inc, Gaithersburg, MD, USA),
28 separação por migração ascendente (Swim-up) e sistema microfluídico (MFSS®,
29 Strex Inc., Osaka, Japão).

1 Figura 7. Fluxograma ilustrativo das etapas experimentais envolvidas nos diferentes métodos de
 2 seleção espermática aplicados ao sêmen equino congelado-descongelado: separação coloidal
 3 por gradiente de densidade (EquiPure®), seleção microfluídica unidirecional (VetMotl®), sistema
 4 microfluídico (MFSS®/Strex®) e separação por migração ascendente (Swim-up). Os esquemas
 5 demonstram a adição das amostras, volumes de meio, condições de incubação, centrifugação
 6 quando aplicável e a recuperação final da fração espermática selecionada para as análises
 7 subsequentes.



8
 9 Created in <https://BioRender.com>

10

11 5.9.2.1 Gradiente de densidade (EquiPure®)

12

13 A separação coloidal foi realizada utilizando o meio EquiPure®
 14 (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Inicialmente, 1 mL de sêmen descongelado
 15 foi cuidadosamente depositado sobre 1 mL do gradiente coloidal em tubos
 16 Falcon de 15 mL, seguido de centrifugação a $400 \times g$ por 20 minutos. Após a
 17 centrifugação, o gradiente foi removido, e o pellet espermático foi recuperado e
 18 ressuspenso em 1 mL de meio Fert-TALP para posterior avaliação. Para os
 19 ensaios de capacitação espermática, essa suspensão foi novamente

1 centrifugada a $300 \times g$ por 5 minutos, e o pellet final foi ressuspensionado em volume
2 adequado do mesmo meio, de modo a obter uma concentração final de 10×10^6
3 espermatozoides/mL.

5.9.2.2 Seleção microfluídica unidirecional (VetMotl®)

7 A seleção microfluídica foi realizada utilizando o dispositivo VetMotl®
8 (VetMotl Inc, Gaithersburg, MD, USA), conforme as instruções do fabricante.
9 Inicialmente, 500 μ L de sêmen descongelado foram diluídos em 350 μ L de meio
10 Fert-TALP e carregados na câmara inferior do dispositivo.

11 Em seguida, 750 μ L adicionais de meio Fert-TALP foram cuidadosamente
12 adicionados à câmara superior, permitindo o fluxo completo do meio através da
13 membrana microfluídica. O sistema foi incubado por 30 minutos a 38 °C, em
14 atmosfera contendo 5% de CO₂, período durante o qual os espermatozoides
15 móveis migraram ativamente através da membrana porosa em direção à câmara
16 de coleta. Ao término da incubação, 750 μ L do fluido presente na câmara
17 superior foram aspirados e destinados às análises subsequentes. Para os
18 ensaios de capacitação espermática, essa suspensão foi novamente
19 centrifugada a $300 \times g$ por 5 minutos, e o pellet final foi ressuspensionado em volume
20 adequado do mesmo meio, de modo a obter uma concentração final de 10×10^6
21 espermatozoides/mL.

5.9.2.3 Sistema microfluídico bidirecional (MFSS®)

25 A seleção espermática utilizando o sistema microfluídico MFSS®
26 (Microfluidic Sperm Sorting System; Strex Inc., Osaka, Japão) foi realizada
27 conforme protocolo adaptado de Sano et al. (2010), utilizando o meio Fert-TALP
28 como solução de fluxo. O dispositivo foi preparado com 150 μ L de Fert-TALP no
29 canal principal; adicionalmente, foram adicionados 500 μ L de sêmen
30 descongelado no poço A, 1.200 μ L de Fert-TALP no poço B, 150 μ L no poço C
31 e 200 μ L no poço D (Figura 7).

32 O sistema foi incubado por 20 minutos a 38 °C em 5% de CO₂, permitindo
33 a migração seletiva dos espermatozoides móveis através dos microcanais em

1 direção ao poço D. Ao final da incubação, o conteúdo do poço D foi coletado por
2 micropipeta e imediatamente destinado às análises posteriores.

3

4 5.9.2.4 *Swim-up* (SU)

5

6 A técnica de *Swim-up* foi realizada conforme protocolo descrito por
7 Meyers et al. (2019), com modificações. Amostras de sêmen descongelado (200
8 µL) foram cuidadosamente depositadas sob 1 mL de meio Fert-TALP (descrito
9 abaixo) em tubos de polipropileno de 5 mL. Os tubos foram posicionados em
10 inclinação de aproximadamente 45° e incubados a 38 °C em 5% de CO₂,
11 permitindo a migração ascendente dos espermatozoides móveis.

12 Ao final do período de incubação, o sobrenadante (≈750 µL), contendo a
13 fração espermática selecionada, foi cuidadosamente coletado e transferido para
14 microtubos de 1,5 mL para posterior análise.

15

16 5.9.3 Capacitação espermática *in vitro*

17

18 O processo de capacitação espermática foi conduzido utilizando amostras
19 de sêmen congelado provenientes dos Experimentos I, V e VI. Os meios
20 utilizados para os ensaios de capacitação foram preparados conforme descrito
21 por Félix et al. (2023) e Martin-Peláez et al. (2025), com modificações.

22 O meio Fert-TALP (FT) foi composto por 114 mM de NaCl, 3,2 mM de KCl,
23 25 mM de NaHCO₃, 0,4 mM de NaH₂PO₄, 0,05 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES,
24 1,5 mM de CaCl₂, 4,6 mM de D-glicose, 10 mM de lactato de sódio, 0,5 mM de
25 piruvato de sódio e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), preparados em
26 água ultrapura estéril.

27 A solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) foi preparada
28 em água ultrapura estéril, contendo 154 mM de NaCl, 0,93 mM de Na₂S₂O₅, 5,2
29 mM de lactato de sódio, 0,23 mM de hipotaurina, 0,46 mM de penicilamina e
30 0,046 mM de epinefrina. A solução foi alíquotada em microtubos de 200 µL,
31 protegida da luz com papel alumínio e armazenada a –20 °C até o momento do
32 uso.

33 Para a formulação do meio capacitante (FT-PHE), foram adicionados 44
34 µL da solução de PHE a cada 1 mL de meio Fert-TALP, resultando em

1 concentrações finais de 18 μ M de penicilamina, 9 μ M de hipotaurina e 1,8 μ M de
2 epinefrina.

3 Os meios foram previamente equilibrados a 38 °C, sob atmosfera
4 umidificada contendo 5% de CO₂, por no mínimo 2 horas antes do uso. As placas
5 de capacitação foram preparadas com gotas de 45 μ L de FT-PHE cobertas com
6 óleo mineral de grau embrionário e mantidas em incubação até o momento da
7 utilização.

8 Previamente aos ensaios de capacitação, a motilidade espermática foi
9 avaliada por sistema computadorizado de análise seminal (CASA), sendo
10 selecionadas apenas amostras com motilidade total superior a 40%. A seleção
11 espermática foi realizada utilizando o dispositivo microfluídico VetMotl® (VetMotl
12 Inc., Gaithersburg, MD, EUA), conforme descrito anteriormente.

13 Após a seleção, os espermatozoides foram ressuspensos em meio Fert-
14 TALP até concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL. Para a montagem das
15 gotas de capacitação, 5 μ L dessa suspensão foram adicionados a 45 μ L de FT-
16 PHE, obtendo-se concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

17 As amostras foram incubadas a 38 °C, em atmosfera umidificada
18 contendo 5% de CO₂ e oxigênio atmosférico, durante os períodos experimentais
19 de 30 minutos, 3, 6 e 9 horas.

20

21 5.9.4 Cinética espermática

22

23 As amostras de sêmen de cada grupo experimental foram avaliadas em
24 cinco momentos distintos: imediatamente após a descongelação, após a seleção
25 espermática por placa microfluídica ou gradiente de densidade (tempo 0), e após
26 30 minutos, 3, 6 e 9 horas de incubação em meio de capacitação.

27 A cinética espermática foi avaliada por meio de sistema de análise
28 computadorizada de sêmen (CASA; IVOS 12, Hamilton Thorne Research,
29 Beverly, MA, EUA), sendo analisados os seguintes parâmetros: motilidade total
30 (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média do trajeto (VAP),
31 velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retilinearidade (STR),
32 linearidade (LIN), amplitude lateral da cabeça (ALH) e percentual de
33 espermatozoides rápidos (RAP).

1 As análises foram realizadas utilizando configuração padronizada do
2 sistema CASA, com taxa de captura de imagem de 60 Hz, 30 quadros por
3 análise, detecção mínima de 30 pixels, contraste mínimo de 30 e intensidade
4 celular ajustada para 40. Os espermatozoides foram classificados como
5 progressivamente móveis quando apresentaram $VAP \geq 70 \mu\text{m/s}$ e $STR \geq 80\%$.
6 Células com $VAP < 30 \mu\text{m/s}$ e $VSL < 20 \mu\text{m/s}$ foram consideradas estáticas,
7 conforme descrito por Carneiro et al. (2018).

8 A hipermotilidade espermática, utilizada como indicador funcional da
9 capacitação espermática, foi definida de acordo com os critérios estabelecidos
10 por Rathí et al. (2002), considerando valores de $VCL > 180 \mu\text{m/s}$ e $ALH > 12 \mu\text{m}$.

11

12 5.9.5 Morfologia espermática

13

14 A morfologia espermática foi avaliada por microscopia de contraste
15 interferencial diferencial (DIC), utilizando microscópio Zeiss Axio Scope.A1 (Carl
16 Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com objetiva de imersão em óleo de 100×. As
17 amostras foram previamente fixadas em solução de formol salino tamponado a
18 4% e montadas entre lâmina e lamínula com solução salina isotônica.

19 Para cada amostra, 200 espermatozoides foram analisados em campos
20 microscópicos selecionados aleatoriamente. A classificação morfológica foi
21 realizada de acordo com os critérios descritos por Guasti e Papa (2020), com
22 pequenas adaptações para o presente estudo. As anormalidades morfológicas
23 foram categorizadas em defeitos maiores e defeitos menores.

24 Os defeitos maiores incluíram alterações de cabeça (cabeça
25 subdesenvolvida, base estreita, cabeça piriforme, cabeça anormalmente
26 pequena e patologias de cabeça isolada), defeitos acrossomais (formação de
27 bolsa acrossomal, defeito em diadema e acrossoma nodoso), presença de gota
28 citoplasmática proximal, formas teratológicas, alterações da peça intermediária
29 (desfibrilação, fratura, edema e pseudogota) e defeitos de cauda, como caudas
30 fortemente dobradas ou fortemente enroladas, caudas dobradas associadas à
31 gota citoplasmática, caudas enroladas ao redor da cabeça e caudas duplas.

32 Os defeitos menores compreenderam alterações leves de cabeça
33 (cabeça fina, gigante, curta, larga, pequena-normal ou cabeça isolada normal),
34 defeitos de implantação e inserção da cauda (abaxial, oblíqua, paraxial ou

1 retroaxial), caudas levemente dobradas ou frouxamente enroladas e presença
2 de gota citoplasmática distal.

3

4 5.9.6 Citometria de fluxo

5

6 As análises espermáticas por citometria de fluxo foram realizadas em
7 citômetro BD LSR Fortessa™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA),
8 equipado com lasers de excitação azul (488 nm, 100 mW), vermelho (640 nm,
9 40 mW) e violeta (405 nm, 100 mW). Os sinais de fluorescência foram detectados
10 utilizando filtros de emissão de 530/30 nm (Yo-Pro-1, BODIPY-Cholesterol e
11 PSA), 585/42 nm (MitoStatus Red), 695/40 nm (MitoSOX Red e Merocianina
12 540), 660/20 nm (laser vermelho) e 450/50 nm (Hoechst 33342).

13 Em cada amostra, foram adquiridos no mínimo 10.000 eventos, sendo a
14 população espermática inicialmente identificada e selecionada por meio de
15 gráfico de dispersão FSC × SSC, com exclusão de detritos, agregados celulares
16 e partículas não espermáticas. Os dados foram adquiridos e processados
17 utilizando o software BD FACSDiva™ versão 6.1, sendo todas as análises
18 realizadas em duplicata.

19 As amostras foram lavadas e rediluídas em meio TALP-PVA, conforme
20 descrito por Parrish et al. (1989), com modificações, contendo 100 mM NaCl, 3,1
21 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio
22 (60%), 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (livre de ácido), 1 mM
23 piruvato de sódio, 1 mg/mL de álcool polivinílico (PVA) e 25 µg/mL de
24 gentamicina. A concentração espermática final foi ajustada para 5×10^6
25 espermatozoides/mL. Hoechst 33342 (7 µM) foi utilizado para exclusão de
26 detritos e identificação da população celular viável quando aplicável.

27

28 5.9.6.1 Integridade e estabilidade da membrana plasmática

29

30 A integridade e estabilidade da membrana plasmática foram avaliadas
31 utilizando o marcador Yo-Pro-1, um fluorocromo permeável a células que
32 apresentam perda parcial da integridade de membrana. Alíquotas de 200 µL de
33 sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foram incubadas com 25 nM de Yo-Pro-1
34 por 10 minutos a 37 °C, protegidas da luz.

1 Células Yo-Pro-1⁻ foram consideradas viáveis e com membrana
2 plasmática íntegra, enquanto células Yo-Pro-1⁺ foram classificadas como
3 apresentando comprometimento da integridade ou estabilidade de membrana.

4 5.9.6.2 Potencial de membrana mitocondrial

5
6 O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando o marcador
7 MitoStatus Red (BD Biosciences, EUA), um fluorocromo lipofílico catiônico
8 sensível à polarização da membrana mitocondrial interna. Amostras contendo
9 200 µL de sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foram incubadas com o
10 marcador por 20 minutos a 37 °C, protegidas da luz, seguidas de duas lavagens
11 em meio TALP-PVA.

12 Espermatozoides MitoStatus Red⁺ foram classificados como portadores
13 de mitocôndrias metabolicamente ativas e com alto potencial de membrana,
14 enquanto células MitoStatus Red⁻ indicaram despolarização mitocondrial ou
15 disfunção bioenergética. A proporção de células positivas foi utilizada como
16 indicador quantitativo da integridade funcional da bainha mitocondrial, conforme
17 metodologia descrita por Baumber et al. (2000).

18

19 5.9.6.3 Produção de ânion superóxido mitocondrial

20

21 A produção de espécies reativas de oxigênio de origem mitocondrial foi
22 avaliada utilizando o marcador MitoSOX Red (Invitrogen, EUA), específico para
23 a detecção do ânion superóxido (O_2^-) gerado na cadeia respiratória mitocondrial.
24 As amostras (5×10^6 espermatozoides/mL) foram incubadas com 5 µM de
25 MitoSOX Red por 15 minutos a 37 °C, protegidas da luz.

26 Após a incubação, as células foram lavadas em meio TALP-PVA e
27 imediatamente analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células
28 MitoSOX⁺ foi utilizada como indicador de estresse oxidativo mitocondrial,
29 refletindo a magnitude da produção de ânion superóxido, conforme protocolos
30 adaptados para sêmen equino descritos por Baumber et al. (2003).

1 5.9.6.4 Efluxo de colesterol

2

3 A quantificação do efluxo de colesterol foi realizada utilizando o análogo
4 fluorescente TopFluor® Cholesterol (BODIPY-Cholesterol; Avanti Polar Lipids,
5 Alabaster, AL, EUA) conforme metodologia modificada de Bernecic et al.
6 (2019a). A solução estoque (1 mM) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO)
7 grau analítico, aliquoteada em frascos de vidro sob atmosfera de nitrogênio (N₂)
8 e armazenada a -80 °C até o uso.

9 As amostras de sêmen foram inicialmente diluídas em 1 mL de meio TALP
10 e submetidas à centrifugação (300 × g por 10 minutos) para remoção do diluente.
11 O pellet espermático foi ressuspensionado em meio TALP não capacitante (isento
12 de bicarbonato de sódio e albumina sérica bovina) na concentração de 100 × 10⁶
13 espermatozoides/mL. Para a marcação, o BODIPY-Cholesterol foi adicionado à
14 suspensão celular em concentração final de 1 µM, seguido de incubação por 10
15 minutos a 37 °C.

16 Após a marcação, as amostras foram diluídas em meio TALP e
17 submetidas a duas lavagens por centrifugação (300 × g por 5 minutos) para
18 remoção do excesso de fluoróforo. O pellet final foi ressuspensionado na
19 concentração de 2 × 10⁶ espermatozoides/mL e distribuído em dois grupos
20 experimentais: meio TALP não capacitante (controle) e meio capacitante. As
21 amostras foram incubadas por 3, 6 e 9 horas a 38,5 °C, sob atmosfera
22 umidificada contendo 5% de CO₂.

23 Dez minutos antes do término de cada período de incubação, foram
24 adicionados Hoechst 33342 (7 µM) e iodeto de propídio (1,5 µM), permitindo a
25 identificação da população celular viável. As análises foram realizadas em
26 citômetro BD LSR Fortessa™, com excitação do BODIPY-Cholesterol e do
27 iodeto de propídio pelo laser azul de 488 nm e detecção pelos filtros de emissão
28 de 530/30 nm e 585/42 nm, respectivamente. Foram analisados no mínimo
29 10.000 eventos por amostra, restringindo-se a análise às células viáveis (iodeto
30 de propídio negativas).

31 O efluxo de colesterol foi determinado com base na redução da
32 intensidade de fluorescência do BODIPY-Cholesterol ao longo do tempo, sendo
33 expresso como porcentagem de perda de fluorescência em relação ao tempo
34 inicial (tempo 0), conforme a fórmula descrita na seção de análise estatística.

1 5.9.7 Obtenção dos oócitos e maturação oocitária

2

3 Oócitos imaturos foram obtidos por meio de aspiração folicular
4 transvaginal guiada por ultrassonografia, de acordo com o protocolo descrito por
5 Jacobson et al. (2010), utilizando éguas de diferentes raças e idades
6 reprodutivas. O procedimento foi realizado por médico-veterinário devidamente
7 habilitado na técnica.

8 Os complexos cúmulus–oócito (COCs) recuperados foram imediatamente
9 transferidos para meio comercial de manutenção para oócitos equinos
10 (BotuOocyte®; Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e mantidos à temperatura
11 ambiente ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) por até 22 horas, protegidos da luz.

12 Após o período de manutenção, os COCs que apresentaram desnudez
13 parcial ou total das células do cúmulo, bem como sinais morfológicos de
14 degeneração, foram descartados. Os COCs considerados viáveis foram
15 transferidos para gotas de 90 μL de meio de maturação previamente equilibrado,
16 contendo de 1 a 15 oócitos por gota.

17 O meio de maturação foi composto por 36% de meio Global® (LifeGlobal,
18 Guilford, CT, EUA), 54% de DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
19 MA, EUA), 25 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 0,1 mM de piruvato de sódio, 6% de soro
20 fetal bovino (FBS), 10 $\mu\text{L/mL}$ de solução de insulina–transferrina–selênio (ITS),
21 10% de fluido folicular proveniente de folículo dominante estimulado, 8,8 mU de
22 FSH ovino (National Hormone and Peptide Program) e 1,1 mU de somatotropina
23 suína (Harbor-UCLA Research and Education Institute). As gotas foram cobertas
24 com óleo mineral de grau embrionário.

25 Os COCs foram incubados a 38°C , em atmosfera umidificada contendo
26 5% de CO_2 , por 30 horas, período previamente padronizado com base em
27 evidências que demonstram maior taxa de oócitos em metáfase II e melhor
28 aproveitamento oocitário nesse intervalo.

29 Ao final da maturação, os COCs foram novamente avaliados
30 morfológicamente, sendo descartados aqueles que apresentaram sinais de
31 degeneração.

32

33 5.9.8 Coincubação dos espermatozoides e oócitos

34

1 Após o período de pré-incubação espermática, conforme delineado nos
2 experimentos prévios, os complexos cúmulus–oócito (COCs) foram removidos
3 da cultura de maturação. O tempo de início e manutenção da maturação foi
4 ajustado de modo que os oócitos permanecessem entre 28 e 32 horas em
5 maturação antes de serem transferidos para as gotas de fertilização.

6 Os oócitos considerados viáveis foram lavados em meio Fert-TALP isento
7 de PHE e, em seguida, transferidos para gotas de 50 µL de FT-PHE contendo
8 espermatozoides previamente incubados. Em cada gota, foram adicionados 1 a
9 2 COCs, suspensos em 1–2 µL de meio Fert-TALP.

10 As placas de fertilização foram incubadas a 38 °C, em atmosfera
11 umidificada contendo 5% de CO₂, por um período de 3 horas, permitindo a
12 coincubação entre espermatozoides e oócitos, conforme descrito por Félix et al.
13 (2022).

14

15 5.9.9 Cultivo e avaliação dos zigotos

16

17 Após o período de coincubação de 3 horas, os complexos cúmulus–oócito
18 (COCs) foram removidos das gotas de fertilização, sendo esse momento definido
19 como tempo zero (T₀) do desenvolvimento embrionário.

20 O cultivo embrionário foi conduzido conforme descrito por Félix et al.
21 (2022). Resumidamente, os oócitos presumivelmente fecundados foram
22 transferidos para gotas de 50 µL de meio de cultivo comercial para embriões
23 humanos (Global®; LifeGlobal, Guilford, CT, EUA), suplementado com 10% de
24 soro fetal bovino (FBS) e coberto com óleo mineral de grau embrionário.

25 Os zigotos foram mantidos em cultivo por 32 horas nesse meio, sob
26 atmosfera controlada (38,2 °C; 5% CO₂; 5% O₂; 90% N₂). Após esse período, os
27 embriões presumidos foram submetidos à desnudação mecânica por pipetagem
28 suave para remoção das células do cúmulo e, em seguida, retornaram ao cultivo
29 nas mesmas condições.

30 A avaliação da clivagem embrionária foi realizada no terceiro dia de
31 desenvolvimento (D3), por observação em microscopia de campo claro (200×).
32 Os embriões clivados foram mantidos em cultivo até o 5º dia (D5), quando foram
33 transferidos para meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de FBS e cultivados
34 até o 10º dia (D10), para avaliação da formação de blastocistos.

1

2 5.9.10 Análise estatística

3

4 Os resultados referentes aos parâmetros de cinética espermática,
5 integridade e estabilidade da membrana plasmática, função mitocondrial,
6 produção de espécies reativas de oxigênio e capacitação *in vitro* foram
7 analisados no software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego,
8 CA, EUA) e expressos como média ± erro padrão da média (EPM) ou média ±
9 desvio-padrão (DP), conforme o experimento avaliado.

10 A normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio dos testes
11 de Kolmogorov–Smirnov ou Shapiro–Wilk. Para as variáveis com distribuição
12 normal, as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA),
13 seguida do pós-teste de Tukey. Quando os dados não atenderam aos
14 pressupostos de normalidade, foi aplicado o teste de Kruskal–Wallis, seguido do
15 pós-teste de Dunn. Diferenças foram consideradas estatisticamente
16 significativas quando $P < 0,05$, sendo o ganhão considerado a unidade
17 experimental em todas as análises.

18 A quantificação do efluxo de colesterol, avaliada por meio do marcador
19 fluorescente BODIPY-cholesterol, foi realizada por citometria de fluxo, sendo
20 analisados no mínimo 10.000 eventos por amostra e restringindo-se a avaliação
21 à população de células viáveis (iodeto de propídio negativas). O efluxo de
22 colesterol foi calculado pela porcentagem de perda de fluorescência utilizando a
23 fórmula, segundo Bernecic et al (2019a):

24

$$\% \text{Efluxo} = \left[1 - \left(\frac{\text{MFI BODIPY}_{\text{tratamento}}}{\text{MFI BODIPY}_{\text{controle}}} \right) \right] \times 100$$

25

6 Resultados

6.1 Experimento I – Avaliação da influência de diluentes centrifugação sobre a viabilidade pós-descongelação e a hiperativação espermática de sêmen equino congelado

Para a Motilidade Total (MT) e Linearidade (LIN), observou-se que os grupos BotuSÊMEN® (54,21% MT; 36,47% LIN), BotuSÊMEN KZ® (51,37% MT; 35,58% LIN) e BotuSÊMEN Gold® (53,26% MT; 34,47% LIN) apresentaram valores superiores em comparação ao grupo BotuSÊMEN Special®, que apresentou a menor Velocidade Média de Trajeto (VAP; 92,68 µm/s). Em relação à Velocidade Retilínea (VSL), o grupo BotuSÊMEN® (78,63 µm/s) foi significativamente superior aos grupos BotuSÊMEN Special® e BotuSÊMEN Gold® (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por 3 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)
BotuSÊMEN	54.21 ^a	12.84	29.74	94.63 ^a	78.63 ^a	212.6	7.31	58.11	36.47 ^a
BotuSÊMEN Special	50.42 ^a	12.11	27.53	92.68 ^c	72.63 ^b	201.4	7.40	58.37	34.74 ^b
BotuSÊMEN KZ	51.37 ^{ab}	12.11	27.84	89 ^a	75.42 ^{ab}	208.7	7.52	58.68	35.58 ^a
BotuSÊMEN Gold	53.26 ^a	12.05	29.37	94.79 ^a	73.32 ^b	208.5	7.59	57.84	34.47 ^b

Legenda: Médias (±EP) de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

Na Tabela 4, para Motilidade Total (MT), observou-se que os grupos BotuSÊMEN Gold® (27,26%) e BotuSÊMEN Special® (26,42%) apresentaram motilidade significativamente superior em comparação ao grupo BotuSÊMEN® (21,47%), que apresentou o menor valor de MT. Quanto à cinética espermática, o grupo BotuSÊMEN KZ® apresentou maiores valores de Velocidade Curvilínea (VCL; 218,4 µm/s) e Velocidade Média de Trajeto (VAP; 94,79 µm/s) em

1 comparação ao grupo BotuSÊMEN Special® (206,4 µm/s VCL; 89 µm/s VAP)
 2 (Tabela 4).

3

4 Tabela 4. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por
 5 6 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram
 6 previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®,
 7 BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)
BotuSÊMEN	21.47 ^c	8.73	13.68	92.68 ^a	70.16	207.7 ^{ab}	8.11	56.32	33.63
BotuSÊMEN Special	26.42 ^{ab}	8.31	12.63	89 ^b	70.21	206.4 ^b	8.34	57.63	33.42
BotuSÊMEN KZ	24.11 ^b	9.57	13.89	94.79 ^a	72.95	218.4 ^a	8.44	57.89	33.53
BotuSÊMEN Gold	27.26 ^a	9.10	13,47	90.79 ^{ab}	70.95	206.9 ^{ab}	8.25	54.16	33.37

8 Legenda: Médias (±EP) de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média
 9 do trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de
 10 cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Letras diferentes na mesma coluna
 11 indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

12

13 Na Tabela 5, para Motilidade Total (MT) e porcentagem de
 14 Espermatozoides Rápidos (RAP), observou-se que os grupos BotuSÊMEN®
 15 (7,94% MT; 4,10% RAP) e BotuSÊMEN Gold® (6,84% MT; 3,73% RAP)
 16 apresentaram valores significativamente superiores em comparação ao grupo
 17 BotuSÊMEN KZ® (6,68% MT; 3,21% RAP). Em relação à Velocidade Retilínea
 18 (VSL), os grupos BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (71,79;
 19 72,58 e 71,16 µm/s, respectivamente) apresentaram valores significativamente
 20 superiores ao grupo BotuSÊMEN Special® (60,11 µm/s), que apresentou a menor
 21 VSL (Tabela 5).

1 Tabela 5. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos incubados em meio FT-PHE por
 2 9 horas após a centrifugação em diferentes diluentes comerciais. Os espermatozoides foram
 3 previamente processados utilizando os diluentes BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®,
 4 BotuSÊMEN KZ® e BotuSÊMEN Gold® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)
BotuSÊMEN	7.94 ^a	3.68	4.10 ^a	93.95	71.79 ^a	206.6	8.11	57.05	34.37
BotuSÊMEN Special	7.21 ^{ab}	3.52	3.31 ^{ab}	87.89	60.11 ^b	201.6	7.97	56.58	34.11
BotuSÊMEN KZ	6.684 ^b	3.84	3.21 ^b	92.95	72.58 ^a	208.3	8.28	57.42	35.21
BotuSÊMEN Gold	6.84 ^b	4.10	3.73 ^a	90.68	71.16 ^a	209.8	8.24	57.58	33.89

5 Legenda: Médias (±EP) de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média
 6 do trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de
 7 cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Letras diferentes na mesma coluna
 8 indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

9
 10 Ao analisar a cinética espermática de forma integrada durante as 9 horas
 11 de incubação, os grupos BotuSÊMEN Gold® e BotuSÊMEN KZ® apresentaram
 12 os melhores parâmetros de motilidade e cinética espermática. O grupo
 13 BotuSÊMEN Gold® apresentou maior motilidade total às 6 horas de incubação
 14 (27,26%) e manteve-se entre os maiores valores de espermatozoides rápidos às
 15 9 horas (3,73%). Paralelamente, o grupo BotuSÊMEN KZ® apresentou maiores
 16 velocidades média de trajeto (94,79 µm/s) e curvilínea (218,4 µm/s) às 6 horas,
 17 além de preservar maior velocidade retilínea às 9 horas de incubação (72,58
 18 µm/s). Os grupos BotuSÊMEN® e BotuSÊMEN Special® apresentaram menores
 19 valores cinéticos ao longo do período experimental.

1 6.2 Experimento II – Avaliação do tempo de estabilização seminal em
2 diferentes diluentes e crioprotetores

3
4 Foram avaliadas cinco formulações distintas de diluentes crioprotetores,
5 todas baseadas na formulação do diluente comercial BotuCRIO® (Botupharma,
6 Botucatu, SP, Brasil), com modificações específicas na concentração de gema
7 de ovo e nos crioprotetores penetrantes. Os grupos experimentais consistiram
8 em: BC (10% de gema, 1% de glicerol e 4% de amidas), G2 (2% de gema e 4%
9 de glicerol), G3 (2% de gema e 2,5% de glicerol), G4 (2% de gema, 2% de glicerol
10 e 3% de amidas) e G5 (2% de gema, 2% de glicerol e 3% de amidas). Para
11 avaliação do efeito do tempo de estabilização a 5 °C, as amostras foram
12 mantidas por 20 minutos ou 2 horas antes da congelação. Os parâmetros
13 cinemáticos obtidos após a criopreservação estão apresentados na Tabela 6.

14
15 Tabela 6. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos avaliados após 20 minutos e 2
16 horas de estabilização, após a criopreservação em diferentes diluentes. Os espermatozoides
17 foram congelados utilizando os diluentes BotuCRIO (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), G2, G3,
18 G4 e G5

Grupo	Tempo de estabilização	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)
BC	20 min	52.0 ± 9.2 ^b	24.1 ± 4.5 ^a	39.1 ± 7.7 ^b	89.5 ± 5.3 ^a	71.9 ± 3.7 ^a	171.4 ± 7.9 ^a	7.2 ± 0.3 ^b	80.5 ± 1.4 ^a	44.8 ± 0.9 ^a
BC	2 horas	55.1 ± 5.1 ^b	24.5 ± 3.2 ^a	41.9 ± 4.7 ^b	92.5 ± 2.7 ^a	73.3 ± 1.8 ^a	175.2 ± 4.9 ^a	6.9 ± 0.2 ^b	79.4 ± 0.7 ^a	43.6 ± 1.1 ^a
G2	20 min	42.1 ± 3.4 ^{ab}	21.6 ± 2.8 ^a	28.1 ± 3.2 ^{ab}	92.6 ± 2.8 ^a	77.3 ± 1.7 ^a	165.7 ± 4.5 ^a	6.3 ± 0.3 ^a	81.3 ± 0.8 ^b	48.7 ± 0.8 ^{bc}
G2	2 horas	42.7 ± 4.4 ^{ab}	23.0 ± 3.0 ^a	30.5 ± 3.9 ^{ab}	91.1 ± 2.7 ^a	77.0 ± 2.1 ^a	166.0 ± 5.8 ^a	6.0 ± 0.3 ^a	81.6 ± 1.1 ^b	49.4 ± 1.0 ^{bc}
G3	20 min	27.3 ± 3.4 ^a	17.6 ± 2.9 ^a	22.9 ± 6.6 ^a	90.7 ± 2.7 ^a	74.9 ± 1.6 ^a	162.8 ± 4.9 ^a	6.4 ± 0.4 ^a	82.0 ± 0.8 ^b	49.4 ± 1.5 ^c
G3	2 horas	30.3 ± 3.2 ^a	15.6 ± 2.2 ^a	25.1 ± 3.0 ^a	91.5 ± 2.8 ^a	75.4 ± 1.5 ^a	163.8 ± 4.6 ^a	6.0 ± 0.3 ^a	80.6 ± 0.9 ^b	49.4 ± 1.2 ^c
G4	20 min	43.9 ± 3.3 ^{ab}	23.4 ± 2.6 ^a	39.1 ± 7.7 ^{ab}	89.6 ± 2.5 ^a	74.9 ± 1.7 ^a	169.3 ± 4.1 ^a	6.9 ± 0.4 ^{ab}	80.9 ± 0.9 ^{ab}	45.0 ± 0.9 ^{ab}
G4	2 horas	44.4 ± 4.4 ^{ab}	21.7 ± 3.4 ^a	35.0 ± 3.8 ^{ab}	90.1 ± 2.7 ^a	75.4 ± 1.8 ^a	167.3 ± 4.7 ^a	6.4 ± 0.3 ^{ab}	80.6 ± 1.1 ^{ab}	46.1 ± 1.1 ^{ab}
G5	20 min	46.1 ± 4.2 ^{ab}	23.7 ± 3.5 ^a	37.5 ± 7.3 ^{ab}	91.6 ± 2.5 ^a	75.9 ± 1.8 ^a	168.1 ± 4.4 ^a	6.3 ± 0.3 ^{ab}	82.2 ± 0.8 ^{ab}	48.0 ± 0.9 ^{abc}
G5	2 horas	46.2 ± 4.0 ^{ab}	20.8 ± 3.0 ^a	35.9 ± 8.2 ^{ab}	91.4 ± 2.5 ^a	75.4 ± 1.5 ^a	167.8 ± 4.5 ^a	6.0 ± 0.3 ^{ab}	81.6 ± 0.8 ^{ab}	48.2 ± 0.9 ^{abc}

19 Legenda: Médias (±EP) de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média
20 do trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de
21 cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Letras diferentes sobrescritas na mesma
22 coluna indicam diferença significativa entre os grupos (tratamentos), considerando os tempos de
23 estabilização conjuntamente (ANOVA de dois fatores seguida do teste de Tukey; $P < 0,05$). Não
24 houve efeito significativo do tempo de estabilização nem interação grupo × tempo ($P > 0,05$).

1 Na Tabela 6, observou-se diferença significativa entre os grupos
2 experimentais para os parâmetros cinemáticos avaliados ($P < 0,05$). Entretanto,
3 o tempo de estabilização, isoladamente, não apresentou efeito significativo,
4 assim como não foi observada interação grupo $\times$ tempo ($P > 0,05$).

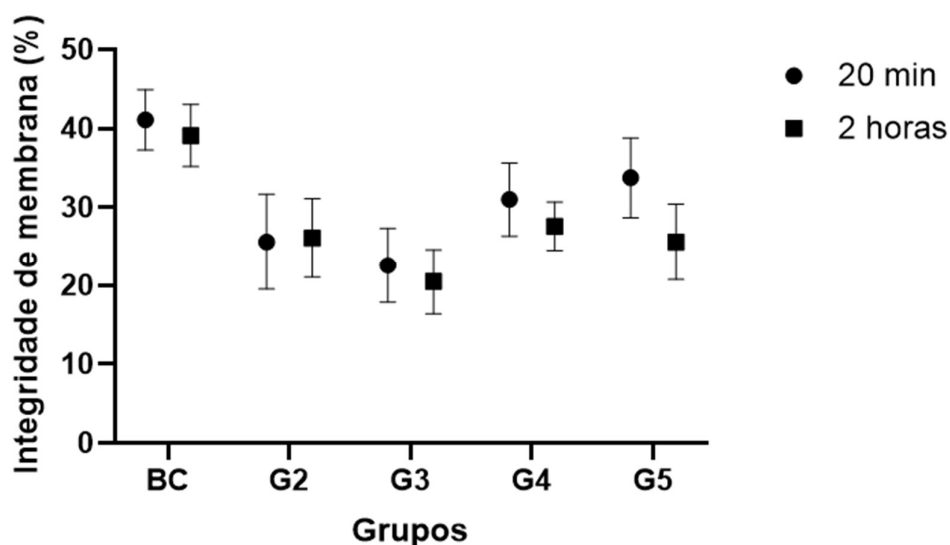
5 O grupo BC apresentou maiores valores de Motilidade Total (MT),
6 Motilidade Progressiva (MP) e porcentagem de Espermatozoides Rápidos
7 (RAP), independentemente do tempo de estabilização. Aos 20 minutos, o grupo
8 apresentou 52,0% de MT, 24,1% de MP e 39,1% de RAP, enquanto após 2 horas
9 apresentou 55,1% de MT, 24,5% de MP e 41,9% de RAP (Tabela 6).

10 O grupo G3 apresentou os menores valores de MT e RAP em ambos os
11 tempos de estabilização avaliados. Aos 20 minutos, observou-se 27,3% de MT
12 e 22,9% de RAP, enquanto após 2 horas os valores observados foram de 30,3%
13 de MT e 25,1% de RAP (Tabela 6).

14 Os grupos G2, G4 e G5 apresentaram valores intermediários de
15 motilidade e parâmetros cinéticos, mantendo comportamento semelhante entre
16 os tempos de estabilização avaliados. Para os parâmetros de velocidade, o
17 grupo BC apresentou maiores valores de Velocidade Média de Trajeto (VAP),
18 Velocidade Retilínea (VSL) e Velocidade Curvilínea (VCL), enquanto os grupos
19 G2, G4 e G5 apresentaram valores intermediários e estáveis ao longo do período
20 experimental (Tabela 6).

21 Os valores de Amplitude Lateral de Cabeça (ALH) permaneceram
22 homogêneos entre os grupos experimentais. Da mesma forma, os índices de
23 Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) mantiveram-se estáveis entre os
24 tratamentos, indicando manutenção do padrão direcional do movimento
25 espermático (Tabela 6).

1 Figura 8. Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozoides equinos após 20 minutos
2 e 2 horas de estabilização, avaliada após a criopreservação em diferentes diluentes comerciais.
3 Os grupos experimentais foram: G1 (BotuSÊMEN®), G2 (BotuSÊMEN® + G2), G3
4 (BotuSÊMEN® + colesterol), G4 (BotuSÊMEN Gold®) e G5 (BotuSÊMEN KZ®). Letras
5 diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA de dois fatores seguida do
6 teste de Tukey; $P < 0,05$). Não houve efeito significativo do tempo de estabilização nem interação
7 grupo $\times$ tempo ($P > 0,05$)



8
9 Created in GraphPad Prism

10

11 A avaliação da integridade de membrana plasmática (Figura 8)
12 demonstrou maiores percentuais de células viáveis no grupo BC em ambos os
13 tempos de estabilização, diferindo significativamente dos grupos G2 e G3 ($P <$
14 $0,05$). Os grupos G4 e G5 apresentaram valores intermediários de integridade
15 de membrana plasmática (Figura 8).

16 De forma integrada, o grupo BC apresentou os melhores parâmetros de
17 motilidade, cinética espermática e integridade de membrana plasmática em
18 ambos os tempos de estabilização avaliados. Os grupos G2, G4 e G5
19 apresentaram desempenho intermediário e comportamento estável após 20
20 minutos e 2 horas de estabilização, enquanto o grupo G3 apresentou os menores
21 valores cinéticos e de viabilidade espermática ao longo do período experimental.

6.3 Experimento III – Influência de diferentes composições de crioprotetores na viabilidade espermática

O Experimento III avaliou o efeito combinado entre os diluentes de centrifugação BotuSÊMEN GOLD® (BG) e BotuSÊMEN KZ® (KZ) e as formulações de congelamento BotuCRIO® (BC), G2, G2 acrescido de leite desnatado (G2.1), G4 e G4 acrescido de leite desnatado (G4.1), conforme descrito na Tabela 2 da metodologia. As análises cinemáticas pós-descongelamento permitiram caracterizar a influência dessas combinações sobre a motilidade e a qualidade cinética espermática (Tabelas 7 a 12).

A análise conjunta das combinações experimentais (Tabela 7) demonstrou diferenças significativas ($P < 0,05$) para parte dos parâmetros avaliados. As combinações BG + BC e BG + G2 apresentaram maiores valores de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP) e porcentagem de Espermatozoides Rápidos (RAP), além de maiores parâmetros de velocidade pós-descongelamento. O grupo BG + BC apresentou 53,42% de MT, 26,00% de MP e 43,68% de RAP, enquanto o grupo BG + G2 apresentou 40,48% de MT, 21,69% de MP e 29,98% de RAP (Tabela 7).

Em contraste, as combinações envolvendo o diluente KZ®, principalmente KZ + G2.1, KZ + G4 e KZ + G4.1, apresentaram os menores valores para a maioria das variáveis analisadas. O grupo KZ + G4 apresentou 26,31% de MT, 12,87% de MP e 15,35% de RAP, enquanto o grupo KZ + G4.1 apresentou 24,59% de MT, 16,10% de MP e 15,51% de RAP (Tabela 7).

Os parâmetros de velocidade acompanharam o mesmo padrão observado para motilidade. As combinações BG + BC e BG + G2 apresentaram maiores valores de Velocidade Média de Trajeto (VAP), Velocidade Retilínea (VSL) e Velocidade Curvilínea (VCL), enquanto os grupos associados ao diluente KZ® apresentaram menores valores cinéticos. Os valores de Amplitude Lateral de Cabeça (ALH) apresentaram variações discretas entre os grupos experimentais (Tabela 7).

1 Tabela 7. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação,
2 considerando a combinação entre diluentes de centrifugação (BG e KZ) e formulações de
3 congelamento (BC, G2, G2.1, G4 e G4.1). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da
4 média (EPM). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa
5 entre os grupos ($P < 0,05$)

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
BG + BC	53,42 $\pm$ 4,42 ^c	26,00 $\pm$ 2,30 ^b	43,68 $\pm$ 3,37 ^d	86,74 $\pm$ 2,95 ^b	73,00 $\pm$ 2,35	167,79 $\pm$ 4,54 ^c	6,78 $\pm$ 0,19 ^{bc}
BG + G2	40,48 $\pm$ 4,84 ^{abc}	21,69 $\pm$ 2,60 ^{ab}	29,98 $\pm$ 3,77 ^{bc}	82,80 $\pm$ 3,32 ^{ab}	67,19 $\pm$ 2,61	145,68 $\pm$ 5,06 ^{ab}	6,00 $\pm$ 0,20 ^a
BG + G2.1	32,76 $\pm$ 4,74 ^{ab}	17,56 $\pm$ 2,53 ^{ab}	23,47 $\pm$ 3,68 ^{abc}	86,56 $\pm$ 3,23 ^{ab}	72,51 $\pm$ 2,55	152,31 $\pm$ 4,93 ^{abc}	5,98 $\pm$ 0,20 ^a
BG + G4	36,88 $\pm$ 4,57 ^{ab}	19,61 $\pm$ 2,41 ^{ab}	27,98 $\pm$ 3,51 ^{abc}	81,68 $\pm$ 3,08 ^{ab}	67,97 $\pm$ 2,44	152,51 $\pm$ 4,72 ^{abc}	6,27 $\pm$ 0,19 ^{ab}
BG + G4.1	29,58 $\pm$ 4,74 ^a	16,35 $\pm$ 2,53 ^a	21,42 $\pm$ 3,68 ^{ab}	83,18 $\pm$ 3,23 ^{ab}	70,63 $\pm$ 2,55	151,78 $\pm$ 4,94 ^{abc}	6,17 $\pm$ 0,20 ^{ab}
KZ + BC	46,26 $\pm$ 4,42 ^{bc}	21,65 $\pm$ 2,35 ^{ab}	35,95 $\pm$ 3,37 ^{cd}	84,58 $\pm$ 2,95 ^{ab}	66,58 $\pm$ 2,35	154,53 $\pm$ 4,54 ^{bc}	6,91 $\pm$ 0,19 ^c
KZ + G2	28,37 $\pm$ 4,65 ^a	14,14 $\pm$ 2,46 ^a	18,52 $\pm$ 3,59 ^{ab}	79,29 $\pm$ 3,15 ^{ab}	67,52 $\pm$ 2,49	143,31 $\pm$ 4,82 ^{ab}	5,91 $\pm$ 0,20 ^a
KZ + G2.1	29,02 $\pm$ 4,65 ^a	13,77 $\pm$ 2,47 ^a	18,14 $\pm$ 3,59 ^{ab}	74,79 $\pm$ 3,15 ^a	65,78 $\pm$ 2,50	135,97 $\pm$ 4,82 ^a	5,85 $\pm$ 0,20 ^a
KZ + G4	26,31 $\pm$ 4,57 ^a	12,87 $\pm$ 2,41 ^a	15,35 $\pm$ 3,51 ^a	76,62 $\pm$ 3,08 ^{ab}	64,82 $\pm$ 2,44	145,90 $\pm$ 4,72 ^{ab}	6,25 $\pm$ 0,19 ^{ab}
KZ + G4.1	24,59 $\pm$ 4,64 ^a	16,10 $\pm$ 2,46 ^a	15,51 $\pm$ 3,59 ^a	78,29 $\pm$ 3,15 ^{ab}	70,76 $\pm$ 2,49	145,85 $\pm$ 4,82 ^{ab}	6,02 $\pm$ 0,20 ^a

6 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
7 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
8 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
9 teste de Tukey ($P < 0,05$).

10

11 A avaliação isolada do efeito dos diluentes de centrifugação (Tabela 8)
12 demonstrou desempenho superior do grupo BG em relação ao grupo KZ para
13 MT, MP, RAP e parâmetros de velocidade ($P < 0,05$). O grupo BG apresentou
14 44,19% de MT, 22,41% de MP e 34,72% de RAP, enquanto o grupo KZ
15 apresentou 36,67% de MT, 17,92% de MP e 26,41% de RAP (Tabela 8). Não
16 foram observadas diferenças para ALH entre os tratamentos.

1 Tabela 8. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação em
2 função dos diluentes de centrifugação BotuSÊMEN GOLD® (BG) e BotuSÊMEN KZ® (KZ)

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
BG	44,19 $\pm$ 3,62 ^b	22,41 $\pm$ 1,69 ^b	34,72 $\pm$ 2,60 ^b	85,16 $\pm$ 2,20 ^b	71,29 $\pm$ 1,82 ^b	159,23 $\pm$ 3,48 ^b	6,44 $\pm$ 0,15 ^a
KZ	36,67 $\pm$ 3,61 ^a	17,92 $\pm$ 1,70 ^a	26,41 $\pm$ 2,59 ^a	80,91 $\pm$ 2,20 ^a	66,89 $\pm$ 1,81 ^a	148,65 $\pm$ 3,47 ^a	6,46 $\pm$ 0,15 ^a

3 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
4 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
5 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
6 teste de Tukey ($P < 0,05$).

7

8 Quanto aos meios de congelação (Tabela 9), o diluente BC apresentou
9 os maiores valores pós-descongelação para MT, MP, RAP e VCL em
10 comparação aos grupos G2 e G4 ($P < 0,05$). O grupo BC apresentou 49,84% de
11 MT, 23,82% de MP e 39,82% de RAP, enquanto os grupos G2 e G4
12 apresentaram valores semelhantes para a maioria dos parâmetros avaliados
13 (Tabela 9).

14

15 Tabela 9. Parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos após a criopreservação em
16 função dos meios de congelação BotuCRIO® (BC), G2 e G4

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
BG	49,84 $\pm$ 3,83 ^b	23,82 $\pm$ 1,88 ^b	39,82 $\pm$ 2,82 ^b	85,66 $\pm$ 2,41 ^b	69,79 $\pm$ 1,97	161,16 $\pm$ 3,77 ^b	6,84 $\pm$ 0,16 ^b
G2	32,58 $\pm$ 3,61 ^a	16,75 $\pm$ 1,68 ^a	22,47 $\pm$ 2,59 ^a	80,91 $\pm$ 2,19 ^{ab}	68,31 $\pm$ 1,81	144,40 $\pm$ 3,47 ^a	5,93 $\pm$ 0,15 ^a
G4	29,47 $\pm$ 3,58 ^a	16,26 $\pm$ 1,66 ^a	20,17 $\pm$ 2,56 ^a	79,92 $\pm$ 2,17 ^a	68,47 $\pm$ 1,79	149,04 $\pm$ 3,43 ^a	6,18 $\pm$ 0,15 ^a

17 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
18 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
19 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
20 teste de Tukey ($P < 0,05$).

21

22 A comparação entre as formulações com e sem adição de leite desnatado
23 (Tabelas 10 e 11) não demonstrou diferenças significativas para os parâmetros
24 cinemáticos avaliados, tanto para G2 versus G2.1 quanto para G4 versus G4.1.
25 Os grupos apresentaram valores semelhantes para motilidade, parâmetros de
26 velocidade e ALH (Tabelas 10 e 11).

1 Tabela 10. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos
2 criopreservados nos meios G2 e G2 acrescido de leite desnatado (G2.1)

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
G2	34,05 $\pm$ 4,08	17,79 $\pm$ 1,95	24,39 $\pm$ 2,78	80,93 $\pm$ 2,40	67,60 $\pm$ 1,89	144,53 $\pm$ 3,68	5,95 $\pm$ 0,16
G2.1	31,03 $\pm$ 4,04	15,57 $\pm$ 1,93	20,42 $\pm$ 2,74	80,11 $\pm$ 2,37	69,13 $\pm$ 1,87	143,66 $\pm$ 3,64	5,92 $\pm$ 0,15

3 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
4 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
5 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
6 teste de Tukey ($P < 0,05$).

8 Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos
9 criopreservados nos meios G4 e G4 acrescido de leite desnatado (G4.1)

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
G4	32,56 $\pm$ 3,51	16,44 $\pm$ 2,06	22,17 $\pm$ 2,69	79,32 $\pm$ 2,31	66,51 $\pm$ 2,07	149,60 $\pm$ 3,79	6,27 $\pm$ 0,18
G4.1	27,86 $\pm$ 3,61	16,39 $\pm$ 2,14	18,26 $\pm$ 2,77	80,64 $\pm$ 2,36	70,66 $\pm$ 2,13	149,37 $\pm$ 3,85	6,11 $\pm$ 0,18

10 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
11 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
12 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
13 teste de Tukey ($P < 0,05$).

14

15 Na comparação direta entre G2 e G4 (Tabela 12), observou-se
16 comportamento semelhante para os parâmetros de motilidade e velocidade.
17 Diferença significativa foi observada apenas para ALH, com valores de 5,93 μm
18 para G2 e 6,17 μm para G4 (Tabela 12).

19

20 Tabela 12. Comparação dos parâmetros cinemáticos de espermatozoides equinos
21 criopreservados nos meios G2 e G4

Grupo	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
G2	32,74 $\pm$ 3,44	16,73 $\pm$ 1,70	22,29 $\pm$ 2,41	80,54 $\pm$ 2,02	68,22 $\pm$ 1,75	144,13 $\pm$ 3,12	5,93 $\pm$ 0,15 ^a
G4	29,77 $\pm$ 3,41	16,35 $\pm$ 1,68	20,13 $\pm$ 2,38	79,85 $\pm$ 1,99	68,54 $\pm$ 1,73	149,19 $\pm$ 3,08	6,17 $\pm$ 0,15 ^b

22 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade progressiva (MP), motilidade total
23 (MT), espermatozoides rápidos (RAP), velocidades média (VAP), curvilínea (VCL) e linear (VSL),
24 e amplitude lateral de cabeça (ALH). Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo
25 teste de Tukey ($P < 0,05$).

26

De forma integrada, as combinações envolvendo o diluente de centrifugação BotuSÊMEN GOLD® associadas principalmente aos meios BC e G2 apresentaram os melhores parâmetros de motilidade e cinética espermática pós-descongelamento. As combinações envolvendo o diluente KZ® apresentaram menores valores cinéticos e de motilidade ao longo das avaliações. Adicionalmente, a inclusão de leite desnatado nas formulações G2.1 e G4.1 não promoveu alterações significativas nos parâmetros espermáticos avaliados.

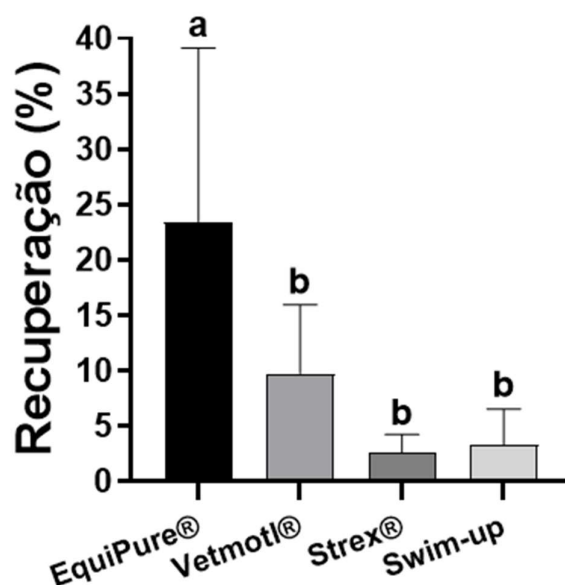
6.4 Experimento IV – Avaliação da influência de diluentes centrifugação sobre a viabilidade pós-descongelamento e a hiperativação espermática de sêmen equino congelado

O Experimento IV avaliou o impacto de diferentes métodos de seleção espermática, swim-up (SU), centrifugação em gradiente de densidade (EquiPure® – EP), e dois sistemas microfluídicos (VetMotl® – VM e Strex®), sobre a recuperação, cinética, integridade funcional e morfologia de espermatozoides equinos após o descongelamento. Foram utilizadas amostras de sêmen criopreservado em BotuCRIO® provenientes de oito garanhões com baixa tolerância à congelamento, conforme descrito na metodologia.

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os métodos de seleção para todas as variáveis avaliadas ($P < 0,05$), incluindo taxa de recuperação espermática, parâmetros cinemáticos, integridade e estabilidade de membrana, potencial mitocondrial, produção de ânion superóxido e morfologia espermática.

A taxa de recuperação espermática (Figura 9), corrigida para o volume final de processamento de cada técnica, diferiu significativamente entre os tratamentos ($P < 0,001$). O método EquiPure® apresentou a maior recuperação de espermatozoides ($23,43 \pm 15,69\%$), sendo estatisticamente superior a todos os demais métodos ($P < 0,05$). O sistema VetMotl® apresentou valores intermediários ($9,74 \pm 6,19\%$), não diferindo estatisticamente do swim-up ($3,29 \pm 3,22\%$) nem do Strex® ($2,56 \pm 1,65\%$), embora numericamente superiores. Swim-up e Strex® formaram um grupo estatisticamente homogêneo com as menores taxas de recuperação.

1 Figura 9. Percentual de recuperação espermática após diferentes métodos de seleção aplicados
2 ao sêmen equino descongelado: EquiPure®, VetMotl®, Strex® e swim-up. Os dados são
3 apresentados como média $\pm$ desvio padrão.



4
5 Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Created in
6 GraphPad Prism

7
8 A análise cinemática por CASA revelou desempenho superior dos
9 métodos EquiPure® e VetMotl® para os principais indicadores de motilidade
10 (Tabela 13). Ambos os métodos resultaram em maiores valores de motilidade
11 total ($50,0 \pm 10,0\%$ e $51,5 \pm 10,0\%$), motilidade progressiva ($27,0 \pm 6,0\%$ e $22,4$
12 $\pm 6,8\%$) e proporção de espermatozoides rápidos ($36,7 \pm 10,4\%$ e $36,6 \pm 8,9\%$),
13 quando comparados aos grupos Strex® e swim-up ($P < 0,05$).

1 Tabela 13. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos parâmetros cinemáticos espermáticos
2 avaliados por análise computadorizada (CASA) após diferentes métodos de seleção aplicados
3 ao sêmen equino descongelado: pós-descongelação (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e
4 swim-up.

Parâmetro s	Pós descong.	EquiPure®	VetMotl®	Strex®	Swim-up
MT (%)	43.6 $\pm$ 5.2 ^a	50.0 $\pm$ 10.0 ^a	51.5 $\pm$ 10.0 ^a	18.4 $\pm$ 5.7 ^b	18.6 $\pm$ 3.5 ^b
MP (%)	16.6 $\pm$ 3.8 ^{ab}	27.0 $\pm$ 6.0 ^a	22.4 $\pm$ 6.8 ^a	8.4 $\pm$ 4.4 ^{ab}	4.1 $\pm$ 1.6 ^b
RAP (%)	26.4 $\pm$ 5.7 ^{ab}	36.7 $\pm$ 10.4 ^a	36.6 $\pm$ 8.9 ^a	20.2 $\pm$ 9.3 ^{ab}	8.3 $\pm$ 3.7 ^b
VAP (μ m/s)	78.4 $\pm$ 4.1	88.2 $\pm$ 6.6	86.6 $\pm$ 6.2	69.0 $\pm$ 8.2	73.5 $\pm$ 11.4
VSL (μ m/s)	63.8 $\pm$ 2.9	76.1 $\pm$ 5.2	67.6 $\pm$ 4.3	70.5 $\pm$ 12.4	61.8 $\pm$ 1.8
VCL (μ m/s)	148.6 $\pm$ 4.6	155.9 $\pm$ 8.9	153.0 $\pm$ 12.8	130.0 $\pm$ 13.8	129.4 $\pm$ 19.5
ALH (μ m)	6.7 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 1.2
BCF (Hz)	34.1 $\pm$ 3.4 ^b	35.4 $\pm$ 3.1 ^b	37.1 $\pm$ 1.1 ^{ab}	42.5 $\pm$ 5.0 ^{ab}	45.8 $\pm$ 4.1 ^a
STR (%)	81.7 $\pm$ 0.8	85.8 $\pm$ 2.0	81.0 $\pm$ 2.5	79.1 $\pm$ 5.0	78.2 $\pm$ 3.2
LIN (%)	44.5 $\pm$ 9.0	50.3 $\pm$ 6.2	45.2 $\pm$ 7.2	42.8 $\pm$ 1.5	44.8 $\pm$ 3.3

5 Legenda: Médias ($\pm$ erro padrão) dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva
6 (MP), proporção de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade média do trajeto (VAP),
7 velocidade em linha reta (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral
8 da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retidão (STR) e linearidade (LIN).
9 Letras distintas na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

10

11 Apesar das diferenças observadas para MT, MP e RAP, não foram
12 detectadas variações estatisticamente significativas para os parâmetros VAP,
13 VCL, STR e LIN ($P > 0,05$), indicando que os métodos de seleção não alteraram
14 de forma consistente o padrão de deslocamento ou a linearidade do movimento
15 espermático.

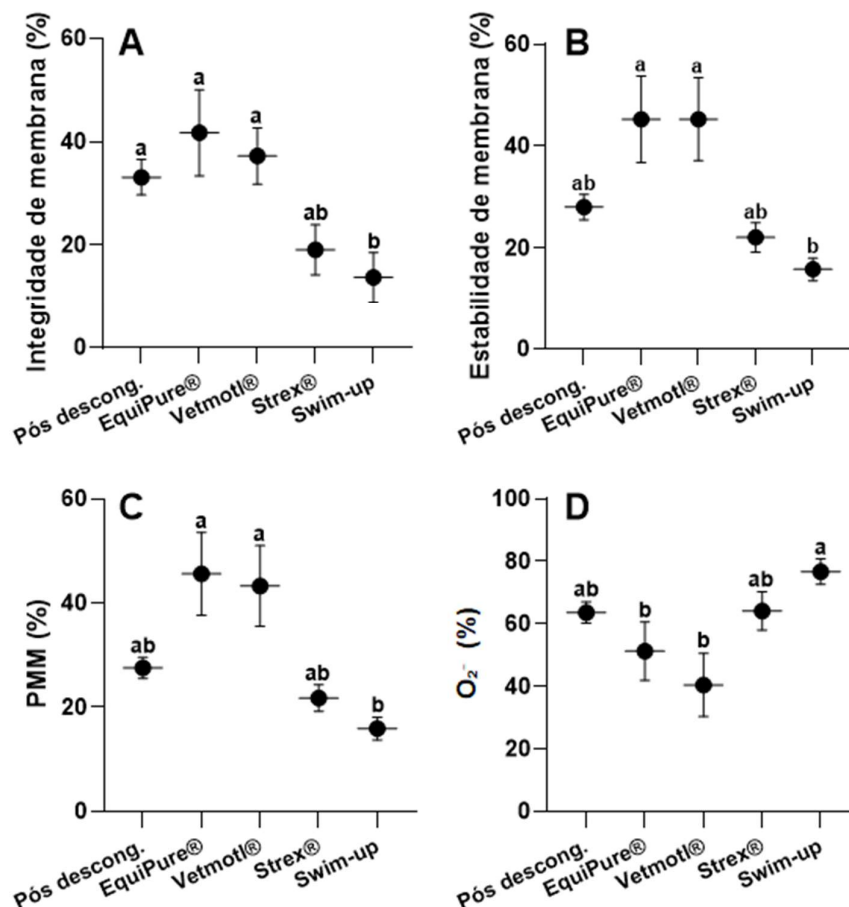
16 Em contraste, os métodos Strex® e swim-up resultaram em populações
17 espermáticas com qualidade cinética inferior ao grupo pós-descongelação.
18 Ambos apresentaram valores significativamente reduzidos de motilidade total
19 (18,4 $\pm$ 5,7% e 18,6 $\pm$ 3,5%) e progressiva (8,4 $\pm$ 4,4% e 4,1 $\pm$ 1,6%), além de
20 menor proporção de espermatozoides rápidos, quando comparados ao controle
21 pós-descongelação ($P < 0,05$). Adicionalmente, esses métodos apresentaram
22 valores mais elevados de frequência de batimento flagelar (BCF), sugerindo
23 padrões de movimento distintos e potencialmente menos eficientes do ponto de
24 vista funcional.

1 Nos parâmetros biofuncionais (Figura 10), EquiPure® e VetMotl® também
2 apresentaram desempenho superior. Ambos exibiram maiores proporções de
3 espermatozoides com membrana plasmática íntegra e estável, bem como maior
4 percentual de células com alto potencial mitocondrial, quando comparados aos
5 métodos swim-up e Strex® ($P < 0,05$).

6 A análise da produção de ânion superóxido revelou padrão inverso, com
7 o swim-up apresentando a maior porcentagem de células MitoSOX⁺, enquanto
8 EquiPure® e VetMotl® exibiram valores significativamente menores, indicando
9 menor estresse oxidativo mitocondrial.

10

11 Figura 10. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrana (A), estabilidade de membrana
12 (B), alto potencial mitocondrial (PMM; C) e produção de ânion superóxido (O_2^- ; D) de
13 espermatozoides equinos congelados-descongelados submetidos a diferentes métodos de
14 seleção espermática: pós-descongelação (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e swim-up



15

16 Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Created in
17 GraphPad Prism

1 Na avaliação morfológica, o sistema VetMotl® destacou-se por apresentar
 2 a menor incidência de defeitos de cabeça e alterações acrossomais,
 3 evidenciando elevada seletividade estrutural. Além disso, VetMotl® e EquiPure®
 4 promoveram redução significativa na frequência de defeitos de peça
 5 intermediária em comparação ao sêmen pós-descongelamento, enquanto não
 6 foram observadas diferenças entre os métodos para defeitos de cauda.

7
 8 Tabela 14. Valores médios $\pm$ desvio padrão das categorias de defeitos morfológicos
 9 espermáticos avaliadas após diferentes métodos de seleção espermática aplicados ao sêmen
 10 equino congelado-descongelado: pós-descongelamento (controle), EquiPure®, VetMotl®, Strex® e
 11 swim-up. As categorias analisadas incluem defeitos de cabeça, acrossoma, peça intermediária
 12 e cauda.

Região	Pós descong.	EquiPure®	VetMotl®	Strex®	Swim-up
Cabeça	4.88 $\pm$ 1.41 ^{ab}	9.50 $\pm$ 2.46 ^a	3.88 $\pm$ 0.89 ^b	4.63 $\pm$ 1.03 ^{ab}	4.88 $\pm$ 0.61 ^{ab}
Acrossoma	1.75 $\pm$ 0.77 ^{ab}	2.25 $\pm$ 0.59 ^a	0.63 $\pm$ 0.38 ^b	1.25 $\pm$ 0.45 ^{ab}	1.50 $\pm$ 0.19 ^{ab}
Peça intermediária	14.88 $\pm$ 1.81 ^a	7.50 $\pm$ 2.03 ^b	7.38 $\pm$ 2.93 ^b	10.63 $\pm$ 1.86 ^{ab}	13.50 $\pm$ 3.25 ^{ab}
Cauda	9.75 $\pm$ 2.06	10.13 $\pm$ 1.97	11.50 $\pm$ 2.78	10.00 $\pm$ 1.84	11.00 $\pm$ 2.65

13 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos
 14 ($P < 0,05$).

15
 16 De forma geral, os resultados do Experimento IV demonstram que os
 17 métodos EquiPure® e VetMotl® são mais eficazes na recuperação de
 18 espermatozoides estrutural e funcionalmente íntegros após o descongelamento.
 19 A tecnologia microfluídica, representada pelo VetMotl®, mostrou-se
 20 particularmente promissora, associando boa taxa de recuperação a elevados
 21 índices de integridade funcional, baixo estresse oxidativo e elevada seletividade
 22 morfológica.

6.5 Experimento V – Dinâmica do efluxo de colesterol durante a capacitação espermática de sêmen equino criopreservado

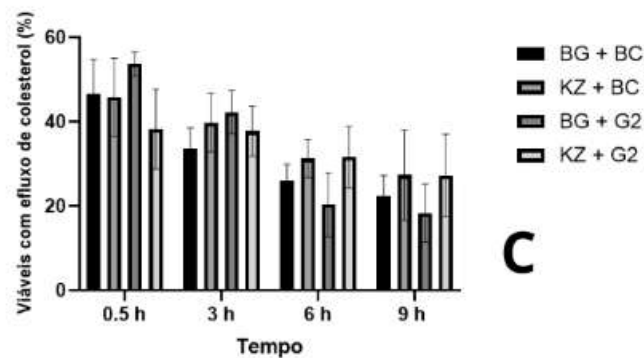
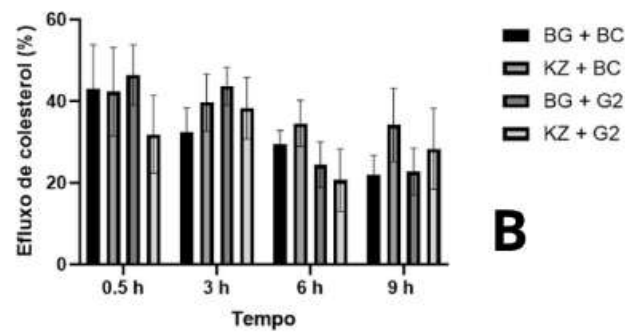
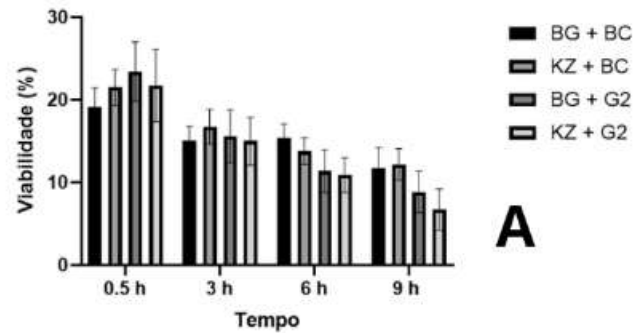
O Experimento V (Figura 11) avaliou a dinâmica temporal do efluxo de colesterol em espermatozoides equinos congelados durante a incubação in vitro, considerando tanto a população espermática total quanto a fração de células viáveis. Foram analisadas diferentes combinações entre diluentes de centrifugação BotuSÊMEN GOLD® (BG) e BotuSÊMEN KZ® (KZ), associadas aos meios de congelação BotuCRIO® (BC) e G2, nos tempos de 0,5, 3, 6 e 9 horas de incubação.

A análise da viabilidade espermática demonstrou redução progressiva ao longo do período de incubação, independentemente da combinação de diluentes utilizada. Nos tempos iniciais de incubação (0,5 e 3 h), foram observadas maiores porcentagens de células viáveis, enquanto aos 6 e 9 h ocorreu redução consistente da viabilidade espermática. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as combinações BG + BC, KZ + BC, BG + G2 e KZ + G2 dentro de um mesmo tempo experimental ($P > 0,05$) (Figura 11A).

Em relação ao efluxo de colesterol na população espermática total, observaram-se maiores porcentagens de células com perda de colesterol nos tempos iniciais de incubação. Aos 0,5 h, os valores de efluxo variaram entre aproximadamente 40% e 55%, dependendo da combinação de diluentes utilizada. Aos 3 h, os valores permaneceram elevados, embora com discreta redução em relação ao tempo inicial. A partir de 6 h, observou-se redução mais acentuada do efluxo de colesterol, com estabilização dos valores até 9 h de incubação. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes meios de congelação ou centrifugação dentro de um mesmo tempo experimental ($P > 0,05$) (Figura 11B).

Quando avaliada especificamente a população de espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol, observou-se padrão semelhante ao identificado na população total. As maiores proporções de células viáveis apresentando efluxo de colesterol foram observadas nos tempos iniciais de incubação (0,5 e 3 h), seguidas por redução progressiva aos 6 e 9 h (Figura 11C).

1 Figura 11. Viabilidade espermática (A), porcentagem de espermatozoides com efluxo de
2 colesterol (B) e porcentagem de espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol (C) após 0,5,
3 3, 6 e 9 horas de incubação *in vitro*. Foram avaliadas diferentes combinações entre diluentes de
4 centrifugação (BotuSÊMEN GOLD® – BG e BotuSÊMEN KZ® – KZ) e meios de congelamento
5 (BotuCRIO® – BC e G2). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média
6 (EPM). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as combinações
7 de diluentes dentro de um mesmo tempo experimental ($P > 0,05$).



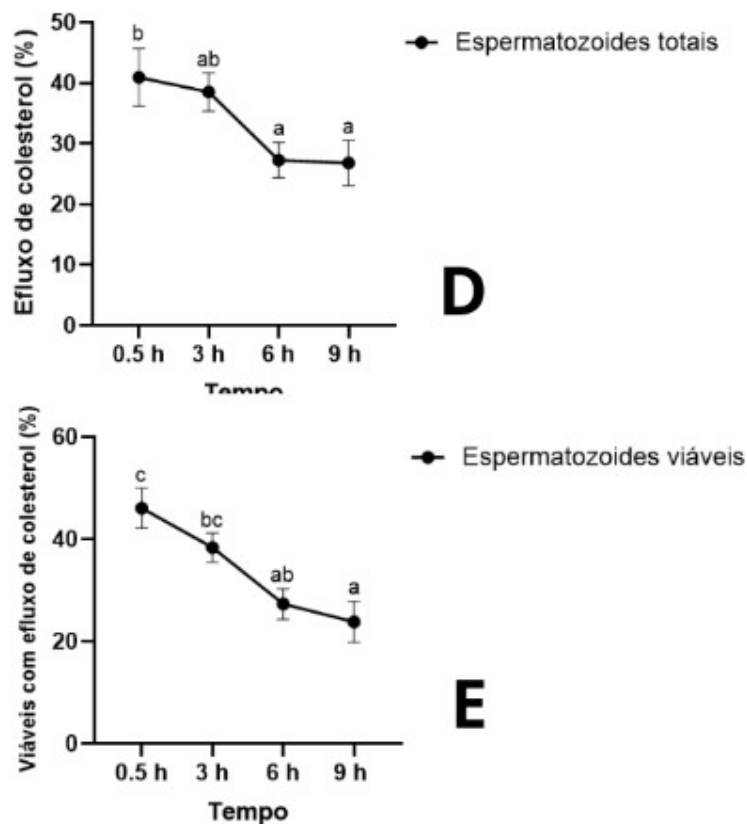
8

9 Created in GraphPad Prism

1 A análise do efeito isolado do tempo de incubação (Figura 12),
2 independentemente da combinação de diluentes, demonstrou que o efluxo de
3 colesterol ocorreu predominantemente nos tempos iniciais. Para a população
4 espermática total, foram observadas diferenças estatisticamente significativas
5 entre os tempos iniciais (0,5 e 3 h) e os tempos tardios (6 e 9 h), com redução
6 aproximada de 40–45% nos primeiros tempos para cerca de 25–27% nos tempos
7 finais de incubação ($P < 0,05$) (Figura 12D). Tendência semelhante foi observada
8 para os espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol, com maiores valores
9 aos 0,5 h e redução progressiva até 9 h de incubação ($P < 0,05$) (Figura 12E).

10

11 Figura 12. Efeito do tempo de incubação *in vitro* sobre o efluxo de colesterol em espermatozoides
12 equinos totais (D) e em espermatozoides viáveis com efluxo de colesterol (E). Os dados
13 representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), independentemente da combinação de
14 diluentes utilizada.



15

16 Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos de incubação
17 ($P < 0,05$). Created in GraphPad Prism

1 De forma integrada, os resultados demonstraram que o efluxo de
2 colesterol ocorreu predominantemente nas primeiras horas de incubação *in vitro*,
3 independentemente do meio de congelamento ou do diluente de centrifugação
4 utilizado. As combinações BG + BC, KZ + BC, BG + G2 e KZ + G2 apresentaram
5 comportamento semelhante quanto à dinâmica temporal do efluxo de colesterol,
6 sem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos dentro de um
7 mesmo tempo experimental.

8

9 6.6 Experimento VI - Fertilização *in vitro* com sêmen congelado

10

11 Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foram
12 selecionadas as combinações BG + BC e BG + G2 para avaliação da capacidade
13 fecundante *in vitro* de espermatozoides equinos congelados e submetidos à
14 capacitação *in vitro*. O objetivo deste experimento foi verificar se as diferenças
15 observadas nos parâmetros espermáticos nos ensaios prévios se refletiriam na
16 competência fecundante e no desenvolvimento embrionário inicial.

17 Na primeira aspiração folicular, foram recuperados 46 oócitos
18 provenientes de seis éguas doadoras, todos destinados à fertilização *in vitro*
19 utilizando sêmen do grupo BG + G2. Do total de oócitos inseminados, 8
20 apresentaram clivagem (17,4%) e 5 atingiram o estágio de blastocisto (10,9%),
21 resultando em uma taxa de formação de blastocistos de 62,5% entre os embriões
22 clivados (Tabela 15).

1 Tabela 15. Taxas de clivagem, formação e classificação morfológica de blastocistos produzidos
2 por fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado do grupo G2 + BotuSÊMEN GOLD®

Variável	BG + G2	N (%)
Oócitos recuperados	46	100,0
Oócitos clivados	8	17,4
Blastocistos formados	5	10,9
Taxa de blastocisto entre clivados	—	62,5
Blastocistos Grau I	1	20,0
Blastocistos Grau II	2	40,0
Blastocistos Grau III	2	40,0

3 Valores absolutos e percentuais de oócitos equinos submetidos à fertilização *in vitro* utilizando
4 sêmen congelado e capacitado *in vitro* do grupo G2 + BotuSÊMEN GOLD®. A classificação
5 morfológica dos blastocistos foi realizada segundo Canesin et al. (2020), considerando a
6 expansão da blastocele, a integridade da zona pelúcida e a organização da massa celular
7 interna.

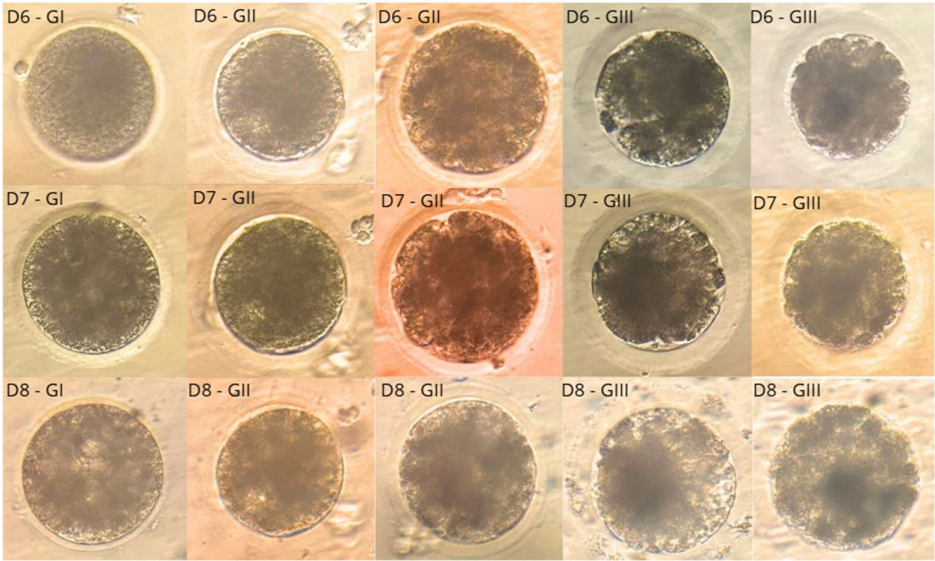
8

9 Quanto à qualidade embrionária, os blastocistos obtidos apresentaram
10 distribuição equilibrada entre as classes morfológicas (Figura 13). Um embrião
11 foi classificado como Grau I, caracterizado por blastocele bem expandida, zona
12 pelúcida íntegra e massa celular interna (MCI) compacta e bem definida. Dois
13 embriões foram classificados como Grau II, apresentando expansão adequada
14 da blastocele, porém com discreta heterogeneidade celular. Dois blastocistos
15 foram classificados como Grau III, exibindo sinais de colapso parcial da
16 blastocele e desorganização celular, compatíveis com degeneração progressiva
17 observada a partir do D7 de cultivo, conforme os critérios propostos por Canesin
18 et al. (2020).

19 Devido à impossibilidade técnica de desnudar os oócitos antes da
20 coincubação com os espermatozoides, não foi possível determinar a taxa de
21 maturação nuclear, sendo todos os oócitos imediatamente destinados à
22 fertilização *in vitro*. Dessa forma, os resultados de clivagem e formação de
23 blastocistos refletem exclusivamente o desempenho fecundante do sêmen
24 utilizado e a competência global dos oócitos recuperados.

25

1 Figura 13. Desenvolvimento embrionário dos dias D6, D7 e D8 de blastocistos produzidos pela
2 técnica de fertilização *in vitro* a partir de espermatozoides descongelados e capacitados *in vitro*



3
4 Fonte: O autor

5
6 Na segunda aspiração folicular, 24 oócitos foram recuperados e
7 distribuídos igualmente entre os grupos BG + BC e BG + G2 (12 oócitos por
8 grupo). Em ambas as combinações, 2 oócitos apresentaram clivagem (16,7%),
9 entretanto não houve formação de blastocistos em nenhum dos grupos (Tabela
10 16), indicando limitação na progressão do desenvolvimento embrionário nessa
11 coleta específica, independentemente do meio de congelação associado ao
12 diluente de centrifugação BG (Figura 14).

13
14 Tabela 16. Taxas de clivagem, formação e classificação morfológica de blastocistos produzidos
15 por fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado dos grupos BotuCrio® + BotuSÊMEN GOLD®
16 e G2 + BotuSÊMEN GOLD®

Variável	BC + BG	N (%)	G2 + BG	N (%)
Oócitos recuperados	12	100,0	12	100,0
Oócitos clivados	2	16,7	2	16,7
Blastocistos formados	0	0,0	0	0,0

17 Valores absolutos e percentuais de oócitos equinos submetidos à fertilização *in vitro* utilizando
18 sêmen congelado e capacitado *in vitro* do grupo G2 + BotuSÊMEN GOLD®. A classificação
19 morfológica dos blastocistos foi realizada segundo Canesin et al. (2020), considerando a
20 expansão da blastocele, a integridade da zona pelúcida e a organização da massa celular
21 interna. Fonte: Do autor

1 Figura 14. Embriões em estágio de clivagem (D3) obtidos a partir da segunda aspiração folicular,
2 produzidos pela técnica de fertilização *in vitro* utilizando espermatozoides descongelados e
3 capacitados *in vitro*.



4
5 Fonte: O autor

6 4. Discussão

7
8
9 O presente estudo investigou, de forma integrada, como etapas do
10 processamento seminal — diluentes de centrifugação, composição dos meios de
11 congelação, aditivos proteicos, métodos de seleção espermática, dinâmica do
12 efluxo de colesterol e aplicação em fertilização *in vitro* — modulam a
13 funcionalidade de espermatozoides equinos criopreservados. Em conjunto, os
14 resultados indicam que a competência pós-descongelação depende do equilíbrio
15 entre preservação estrutural e reatividade fisiológica, fortemente influenciado
16 pela matriz lipídica dos diluentes e pelo modo como os eventos iniciais da
17 capacitação são desencadeados *in vitro*.

18 No Experimento 1, espermatozoides criopreservados em BotuCRIO® e
19 pré-centrifugados em BotuSÊMEN®, BotuSÊMEN Special®, BotuSÊMEN KZ®
20 ou BotuSÊMEN Gold® foram expostos ao meio indutor de capacitação (FT-
21 PHE). Observou-se VCL elevado nas fases iniciais, porém sem aumento
22 proporcional de ALH, sugerindo atividade cinética intensa em meio capacitante,
23 mas sem o padrão típico de hiperativação, considerada evento tardio e
24 dependente de remodelamento avançado de membrana e sinalização
25 sustentada (Meyers, 2019; Leemans et al., 2019; Maitan et al., 2020).

26 Esse achado é compatível com a possibilidade de que, apesar da boa
27 preservação estrutural promovida pelo BotuCRIO®, as condições avaliadas não
28 tenham favorecido efluxo de colesterol suficientemente efetivo para permitir a
29 transição para eventos tardios da capacitação, fenômeno particularmente

1 sensível ao contexto lipídico em equinos (Gadella; Harrison, 2002; Leemans et
2 al, 2016; Leemans et al., 2019). As diferenças entre diluentes de centrifugação
3 foram discretas, sugerindo efeito limitado frente ao impacto dominante do meio
4 de congelação na expressão funcional pós-descongelação (Gadella; Harrison,
5 2002; Maitan et al., 2020).

6 Com base nesse racional, o Experimento 2 avaliou formulações de
7 congelação com diferentes proporções de gema de ovo, glicerol e amidas (BC,
8 G2, G3, G4 e G5). G2 e G4 apresentaram melhor desempenho que G3 e G5,
9 com maiores motilidade total, progressiva e proporção de espermatozoides
10 rápidos, em concordância com evidências de que o glicerol, em concentrações
11 adequadas, preserva viabilidade e cinética ao reduzir danos osmóticos e
12 estruturais durante a criopreservação (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 2000;
13 Hinrichs et al., 2002).

14 Por sua vez, amidas têm sido exploradas em equinos por apresentarem
15 maior permeabilidade e menor toxicidade osmótica relativa, mas seu efeito é
16 dependente da interação com a carga lipídica do diluente e com a sensibilidade
17 individual do ejaculado (Vidament et al., 1997; Medeiros et al., 2002; Squires et
18 al., 2004; Alvarenga et al., 2005; Papa et al., 2008). Isso pode contribuir para
19 explicar o desempenho inferior de G3 e G5, possivelmente associado a
20 estabilização excessiva da membrana e menor reatividade fisiológica. Apesar do
21 bom desempenho de G2 e G4, o BotuCRIO® permaneceu superior,
22 especialmente na manutenção do vigor cinético pós-descongelação, em
23 consonância com Hernández-Avilés et al. (2025), que reportaram melhor
24 preservação cinética com BotuCRIO® em comparação a diluentes com menor
25 teor de gema, sugerindo que o desempenho decorre da formulação integrada
26 (lipídios, crioprotetores e estabilizantes), e não apenas da redução da fração
27 lipídica.

28 Esses resultados reforçam que a criopreservação eficiente exige
29 equilíbrio entre proteção e plasticidade funcional: enquanto lipoproteínas da
30 gema protegem a membrana, estabilização excessiva pode retardar eventos
31 iniciais da capacitação, como o efluxo de colesterol (Gadella; Harrison, 2002;
32 Gadella, 2008).

33 No Experimento 3, testou-se se a adição de leite desnatado às
34 formulações BC, G2 e G4 alteraria a funcionalidade pós-descongelação,

1 considerando o uso de proteínas lácteas (caseínas) como estabilizantes de
2 membrana. A suplementação com leite não melhorou de forma consistente
3 cinética ou integridade funcional, e as formulações sem leite foram semelhantes
4 ou discretamente superiores, sugerindo ausência de benefício adicional quando
5 a base já confere proteção suficiente.

6 Mecanicamente, caseínas podem se associar a fosfolipídios e
7 colesterol formando camada protetora; porém, essa estabilização pode
8 aumentar rigidez de membrana e dificultar reorganizações necessárias à
9 progressão funcional após a descongelação, especialmente em equinos
10 (Manjunath et al., 2002; Bergeron; Manjunath, 2006; Gadella; Harrison, 2002;
11 Gadella, 2008; Leemans et al., 2019). BotuCRIO® manteve superioridade
12 independentemente do leite, corroborando evidências de melhor preservação
13 funcional frente a outras formulações (Hernández-Avilés et al., 2025). Além
14 disso, grupos pré-centrifugados em BotuSÊMEN Gold® superaram BotuSÊMEN
15 KZ®, sugerindo que o meio prévio à congelação pode influenciar a preservação
16 da cinética pós-descongelação, possivelmente por estabilização inicial mais
17 homogênea da membrana (Manjunath et al., 2002; Spizziri et al., 2010).

18 No Experimento 4, a seleção espermática pós-descongelação impactou
19 diretamente integridade estrutural, metabolismo mitocondrial, equilíbrio oxidativo
20 e estabilidade funcional. EquiPure® (gradiente coloidal) e VetMotl®
21 (microfluídica) superaram swim-up e Strex®, reforçando a vantagem de
22 abordagens menos invasivas e mais seletivas (Nosrati et al., 2014; Bhat et al.,
23 2019; Vigolo et al., 2022). A microfluídica, ao explorar fluxo laminar e reotaxia,
24 reduz necessidade de centrifugação, minimiza geração de espécies reativas de
25 oxigênio e preserva $\Delta\Psi_m$ — aspecto crítico em sêmen equino criopreservado,
26 sensível ao estresse oxidativo (Ball; Vo, 2001; Ortega-Ferrusola et al., 2009).

27 Achados prévios também apontam enriquecimento funcional com
28 VetMotl®, incluindo maior viabilidade, menor estresse oxidativo e assinaturas
29 associadas à manutenção de membrana e atividade mitocondrial (Orsolini et al.,
30 2022). Embora EquiPure® melhore qualidade estrutural, evidências indicam
31 desempenho reprodutivo superior do VetMotl® em fertilização *in vitro*, sugerindo
32 maior recuperação de subpopulações com plasticidade funcional para responder
33 ao ambiente capacitante (Felix et al., 2025). A BCF elevada em swim-up e
34 Strex®, quando acompanhada de pior motilidade progressiva e queda de $\Delta\Psi_m$,

1 é mais compatível com instabilidade funcional do que hiperativação fisiológica
2 verdadeira (Mortimer, 1997; Gadella; Harrison, 2002; Ortega-Ferrusola et al.,
3 2009).

4 Diferenças interespecíficas e ausência de validação específica podem
5 contribuir para a performance intermediária do Strex® (Nosrati et al., 2014;
6 Vigolo et al., 2022). No swim-up, o uso direto de meio capacitante (FERT-TALP)
7 pode ter induzido ativação metabólica precoce e maior demanda energética
8 durante o processamento, influenciando os resultados (Hinrichs et al., 2002;
9 Felix et al., 2023).

10 No Experimento 5, o efluxo de colesterol (BODIPY-colesterol) foi
11 predominantemente precoce e dependente do tempo, com maiores taxas até 3
12 horas e estabilização posterior, sem diferenças entre BG + BC, BG + G2, KZ +
13 BC e KZ + G2 quando expostos ao meio capacitante. Esse padrão é consistente
14 com a capacitação, em que o efluxo de colesterol é um dos primeiros eventos,
15 promovendo reorganização de microdomínios lipídicos e ativação de vias que
16 sustentam etapas subsequentes, como fosforilação em tirosina e alterações
17 iônicas (Visconti et al., 1999; Cross, 1998).

18 O uso de BODIPY-colesterol fornece robustez metodológica por
19 mimetizar o comportamento do colesterol de membrana e permitir quantificação
20 objetiva, com vantagens em relação a abordagens que refletem
21 predominantemente redistribuição lateral (Bernecic et al., 2019a). A
22 estabilização do sinal após 3 horas é compatível com um evento autolimitado e
23 deve ser interpretada em conjunto com a queda progressiva de viabilidade em
24 incubações prolongadas (Bernecic et al., 2019b).

25 Por fim, no Experimento 6, a fertilização *in vitro* com sêmen congelado e
26 capacitado *in vitro* confirmou que, sob controle adequado de criopreservação,
27 seleção e capacitação, é possível restaurar competência fecundante pós-
28 descongelamento e sustentar desenvolvimento embrionário até blastocisto. As
29 taxas observadas (clivagem 17,4%; blastocisto 10,9%; 62,5% dos clivados
30 evoluindo a blastocisto) situam-se na faixa reportada em protocolos
31 contemporâneos de fertilização *in vitro* equina com sêmen congelado e
32 capacitação prolongada (Felix et al., 2023; Felix et al., 2025; Hernández-Avilés
33 et al., 2025; Gonzalez-Castro et al., 2025).

1 Considerando as limitações históricas da fertilização *in vitro* equina, como
2 dificuldade de induzir capacitação completa, hiperativação e interação eficiente
3 com a zona pelúcida, especialmente após criopreservação, os resultados
4 reforçam o avanço técnico do conjunto de estratégias empregadas (Hinrichs,
5 2010; Leemans et al, 2016).

6 A escolha de BG + G2 e BG + BC foi baseada no desempenho integrado
7 dos experimentos anteriores, e a obtenção de blastocistos no grupo BG + G2 na
8 primeira aspiração sugere que formulações com menor carga lipídica e glicerol
9 podem favorecer a progressão funcional necessária ao desenvolvimento
10 embrionário inicial, em concordância com estudos que reportam melhores
11 desfechos com extensores com 2% de gema na composição (Roasa et al., 2007;
12 Felix et al., 2025; Hernández-Avilés et al., 2025).

13 A ausência de blastocistos na segunda aspiração, apesar de clivagem
14 semelhante, é compatível com a variabilidade intrínseca da competência
15 oocitária em equinos (Galli et al., 2014; Hinrichs, 2018; Gonzalez-Castro et al.,
16 2025), enquanto a morfologia dos blastocistos obtidos está alinhada com
17 descrições prévias em fertilização *in vitro* com sêmen congelado (Canesin et al.,
18 2020; Felix et al., 2025).

19 Em síntese, o conjunto dos achados sustenta que a integração entre
20 criopreservação eficiente, seleção espermática adequada, capacitação
21 prolongada em TALP/PHE e cultivo controlado permite restabelecer a
22 competência fecundante do espermatozoide equino pós-descongelção e
23 consolidar a fertilização *in vitro* convencional como alternativa fisiologicamente
24 relevante e tecnicamente promissora em programas modernos de reprodução
25 assistida.

26

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstram que a funcionalidade de espermatozoides equinos criopreservados depende da integração entre a composição dos diluentes, o método de criopreservação, a estratégia de seleção espermática e a dinâmica temporal da capacitação *in vitro*. A eficiência pós-descongelção não está associada exclusivamente à preservação estrutural, mas ao equilíbrio entre estabilidade de membrana e manutenção da plasticidade funcional necessária à progressão ordenada da capacitação espermática.

As formulações de congelação influenciaram de forma decisiva a qualidade espermática, com destaque para o BotuCRIO®, que promoveu melhor preservação da cinética e da integridade funcional pós-descongelção. Entretanto, os resultados indicam que a estabilização excessiva da membrana pode limitar eventos tardios da capacitação, reforçando a importância de diluentes que preservem a viabilidade sem comprometer a reatividade fisiológica. A seleção espermática por microfluídica destacou-se por recuperar subpopulações estruturalmente íntegras, metabolicamente estáveis e mais responsivas ao ambiente capacitante, enquanto o efluxo de colesterol foi confirmado como evento precoce, dependente do tempo de incubação e pouco influenciado pelos diluentes avaliados.

Por fim, a aplicação dos protocolos desenvolvidos na fertilização *in vitro* confirmou que o controle integrado das etapas de criopreservação, seleção espermática e capacitação permite restaurar a competência fecundante do espermatozoide equino pós-descongelção e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de blastocisto. Esses achados reforçam o potencial da fertilização *in vitro* convencional como alternativa biologicamente viável e cientificamente consistente nos programas modernos de reprodução assistida em equinos, contribuindo para o aprimoramento de estratégias reprodutivas com sêmen criopreservado.

1 **AGRADECIMENTOS**

2 O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa
3 do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do projeto de Mestrado nº
4 2024/03500-9 e do Auxílio à Pesquisa nº 2024/08969-5, além do apoio da
5 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil
6 (CAPES) – Código de Financiamento 001.

7

8 **CONFLITO DE INTERESSES**

9 Os autores declaram não haver conflito de interesses.

1 REFERÊNCIAS

- 2
3
4 Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W. Effect of sperm
5 cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro
6 fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*. 2001;56(5):817-29.
- 7 Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L.
8 (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal*
9 *reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
10 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>.
- 11 BALL, B. A., & Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the
12 effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and
13 mitochondrial membrane potential. *Journal of andrology*, 22(6), 1061-1069.
14 <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x>.
- 15 Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C.G.,
16 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability,
17 acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid
18 peroxidation. *J. Androl.* 21, 895–902. [https://doi.org/10.1002/j.1939-](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03424.x)
19 [4640.2000.tb03424.x](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03424.x)
- 20 Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003. Reactive oxygen
21 species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine
22 spermatozoa. *J. Androl.* 24, 621–628. [https://doi.org/10.1002/j.1939-](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02713.x)
23 [4640.2003.tb02713.x](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02713.x).
- 24 Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the
25 mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction*
26 *and development*, 73(10), 1338-1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>.
- 27 Bernecic, N. C., Gadella, B. M., Leahy, T., & de Graaf, S. P. (2019b). Novel
28 methods to detect capacitation-related changes in
29 spermatozoa. *Theriogenology*, 137,56-66.
30 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.038>.
- 31 Bernecic, N. C., Zhang, M., Gadella, B. M., Brouwers, J. F. H. M., Jansen, J. W.
32 A., Arkesteijn, G. J. A., ... & Leahy, T. (2019a). BODIPY-cholesterol can be
33 reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian
34 spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 9804. [https://doi.org/10.1038/s41598-](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45831-7)
35 [019-45831-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45831-7).
- 36 Bhat, R., Prasad, S., Yadav, G., Hassan, R., 2024. Microfluidics: a novel
37 technique for high-quality sperm selection for greater ART outcomes. *FASEB*
38 *BioAdv.* 6, e10057.
39 <https://doi.org/10.1096/fba.2024-00041>
- 40 Bromfield EG, Aitken RJ, Gibb Z, Lambourne SR, Nixon B. Capacitation in the
41 presence of methyl- β -cyclodextrin results in enhanced zona pellucida-binding

1 ability of stallion spermatozoa. *Reproduction*. 2014;147(2):153-66.
2 doi:10.1530/REP-13-0393.

3 Broothaers, K., Angel-Velez, D., & Smits, K. (2025b). Higher blastocyst rates
4 after IVF with frozen-thawed semen compared to ICSI in horses. *Journal of*
5 *Equine Veterinary Science*, 145, 105268.
6 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2024.105268>.

7 Broothaers, K., Angel-Velez, D., De Coster, T., Hedia, M., Molto, F. L. G., &
8 Smits, K. (2025a). Capacitation of frozen-thawed semen improves ICSI-
9 outcomes in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 145, 105269.
10 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2024.105269>.

11 Canesin, H. S., Ortiz, I., Rocha Filho, A. N., Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J.
12 G., & Hinrichs, K. (2020). Effect of warming method on embryo quality in a
13 simplified equine embryo vitrification system. *Theriogenology*, 151, 151-158.
14 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.012>.

15 Carneiro, J.A.M., Papa, F.O., Dell'Aqua Jr., J.A., Alvarenga, M.A., Monteiro,
16 G.A., Melo, C.M., et al., 2018. Effects of coenzyme Q10 on semen
17 cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing
18 ability. *Anim. Reprod. Sci.* 192, 107–118.
19 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.016>.

20 Contreras, M. J., Arias, M. E., Silva, M., Cabrera, P., & Felmer, R. (2022). Effect
21 of cholestanol and cholesterol-loaded cyclodextrin on stallion sperm function
22 and capacitation post-cryopreservation. *Theriogenology*, 189, 1-
23 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.005>. DOI: 10.1530/REP-16-
24 0420.

25 Cross, N. L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of*
26 *reproduction*, 59(1), 7-11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.7>.

27 Felix, M. R., & Hinrichs, K. (2023). Selection of frozen-thawed semen for
28 standard in vitro fertilization. *Journal of Equine Veterinary Science*, 125,
29 104648. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104648>.

30 Felix, M. R., Dobbie, T., Woodward, E., Linardi, R., Okada, C., Santos, R., &
31 Hinrichs, K. (2025). Equine in vitro fertilization with frozen–thawed semen is
32 associated with shortened pre-incubation time and modified capacitation-related
33 changes. *Biology of Reproduction*, 112(5), 867-879.
34 <https://doi.org/10.1093/biolre/iaof043>

35 Felix, M. R., Turner, R. M., Dobbie, T., & Hinrichs, K. (2022). Successful in vitro
36 fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after
37 prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, 107(6),
38 1551-1564. doi:10.1093/biolre/iaoc172.

39 Gadella, B. M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for
40 fertilization. *Animal reproduction science*, 107(3-4), 229-236.
41 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.006>.

- 1 Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic
2 adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure
3 of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm
4 cells. *Biology of reproduction*, 67(1), 340-350.
5 <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.340>.
- 6 Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2014). Ovum pick
7 up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle,
8 buffalo and horses: from the research laboratory to clinical
9 practice. *Theriogenology*, 81(1), 138-151.
10 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.008>.
- 11 Gonzalez-Castro, R. A., Porflidt, C., Ash, A. L., Rodriguez, J. S., Fluery, P.,
12 Squires, E. L., & Carnevale, E. M. Frozen-Thawed Sperm Binding to Zona
13 Pellucida and Production of Blastocysts after in Vitro Fertilization of Oocytes
14 from Young and Old Mares. *Available at SSRN 5175383*.
- 15 Guasti, P.N., Papa, F.O., 2020. Exame andrológico em garanhões. In: Papa,
16 F.O. (Ed.), *Reprodução de garanhões*. MedVet, São Paulo, pp. 55–80.
- 17 Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of
18 mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11(1),
19 73-88. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>.
- 20 Hernández-Avilés, C., Varner, D. D., Ramírez-Agámez, L., Samper, J. C., &
21 Love, C. C. (2025). Results of the “test-freeze” approach in a commercial
22 program of stallion sperm cryopreservation and the relationship between pre-
23 freeze sperm quality and “freezability.”. *Theriogenology*, 238, 117373.
24 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117373>.
- 25 Hinrichs K. The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental
26 competence. *Mol Reprod Dev*. 2010;77(8):651-61. doi:10.1002/mrd.21186.
- 27 Hinrichs, K. (2018). Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in*
28 *Domestic Animals*, 53, 4-13. <https://doi.org/10.1111/rda.13259>.
- 29 Hinrichs, K., Love, C. C., Brinsko, S. P., Choi, Y. H., & Varner, D. D. (2002). In
30 vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation
31 medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and
32 comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biology of*
33 *Reproduction*, 67(1), 256-262. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.256>.
- 34 Jacobson, C. C., Choi, Y. H., Hayden, S. S., & Hinrichs, K. (2010). Recovery of
35 mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation
36 after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 73(8), 1116-1126.
37 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.013>.
- 38 Leemans B, Gadella BM, Stout TAE, Sostaric E, De Schauwer C, Nelis H, et al.
39 Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination
40 which physically prevents equine sperm-oviduct binding. *Reproduction*.
41 2016;151(4):313-30. doi:10.1530/REP-15-0471.

- 1 Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A., De Schauwer, C., Nelis, H.,
2 Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2016). Why doesn't conventional IVF work in
3 the horse? The equine oviduct as a microenvironment for
4 capacitation/fertilization. *Reproduction*, 152(6), R233-R245.
- 5 Leemans, B., Stout, T. A., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs,
6 M., ... & Gadella, B. M. (2019). Update on mammalian sperm capacitation: how
7 much does the horse differ from other species?. *Reproduction*, 157(5), R181-
8 R197. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0541>
- 9 Maitan, P., Bromfield, E. G., Stout, T. A., Gadella, B. M., & Leemans, B. (2022).
10 A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: In vivo and
11 in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*, 246,
12 106848. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106848>.
- 13 Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Ménard, M. (2002). Major proteins of
14 bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg
15 yolk. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1250-1258.
16 <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1250>.
- 17 Martin-Peláez S, de la Fuente A, Takahashi K, Tirado-Pérez I, Orozco J, Okada
18 CTC, et al. IVF with frozen-thawed sperm after prolonged capacitation yields
19 comparable results to ICSI in horses: a morphokinetics study. *Theriogenology*.
20 2025;232:39-45. doi:10.1016/j.theriogenology.2024.10.032.
- 21 Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M.
22 A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides.
- 23 Meyers, S.A., Bulkeley, E., Foutouhi, A., 2019. Sperm mitochondrial regulation
24 in motility and fertility in horses. *Reprod. Domest. Anim.* 54(Suppl. 3), 22–28.
25 <https://doi.org/10.1111/rda.13461>
- 26 Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and
27 analysis of sperm movement in mammals. *Human reproduction update*, 3(5),
28 403-439. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>.
- 29 Mugnier, S., Dell'Aquila, M. E., Pelaez, J., Douet, C., Ambruosi, B., Santis, T.
30 D., ... & Goudet, G. (2009). New insights into the mechanisms of fertilization:
31 comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona
32 pellucida between horses and pigs. *Biology of Reproduction*, 81(5), 856-870.
33 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077651>.
- 34 Nosrati, R., Vollmer, M., Eamer, L., San Gabriel, M. C., Zeidan, K., Zini, A., &
35 Sinton, D. (2014). Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab on a*
36 *Chip*, 14(6), 1142-1150.
- 37 Orsolini, M.F., Verstraete, M.H., van Heule, M., Orellana, D., Ortega, A.,
38 Meyers, S., Dini, P., 2022. Characterization of sperm cell membrane charge
39 and selection of high-quality sperm using microfluidics in stallions.
40 *Theriogenology* 190, 129–140.
41 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.014>.

- 1 Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B., Salazar-
2 Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., ... & Pena, F. J.
3 (2009). Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion
4 spermatozoa. *Biology of reproduction*, 81(6), 1106-1111.
5 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078220>.
- 6 Papa FO, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA Jr, Zahn FS. Effect of seminal plasma
7 removal and addition of different extenders during stallion semen freezing.
8 *Theriogenology*. 2002;58(2-4):237-40. doi:10.1016/S0093-691X(02)00762-8.
- 9 Papa, F. O., Melo, C. M., Fioratti, E. G., Dell'Aqua Jr, J. A., Zahn, F. S., &
10 Alvarenga, M. A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal*
11 *Reproduction Science*, 107(3-4), 293-301.
12 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.003>.
- 13 Papas M, Fernández M, Carreño JM, Dell'Aquila ME, Ortiz I, et al. Development
14 of the first equine blastocyst produced by conventional IVF and in vitro culture in
15 Europe resulting in the birth of a foal. *Vlaams Diergeneeskde Tijdschr*.
16 2024;93:95-9. <https://doi.org/10.21825/vdt.91527>.
- 17 Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & First, N. L. (1989). Capacitation of bovine
18 sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular
19 pH. *Biology of reproduction*, 41(4), 683-699.
20 <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683>.
- 21 Ramírez-Agámez L, Crowley JB, Love CC, Hernández-Avilés C. Blastocyst
22 production by conventional in vitro fertilization (cIVF) in horses: effects of sperm
23 storage method, incubation timing of cool-stored semen, and comparisons with
24 ICSI. *Theriogenology*. 2025;248:117611.
25 doi:10.1016/j.theriogenology.2025.117611.
- 26 Rath R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro
27 capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*. 2001;65(2):462-70.
28 doi:10.1095/biolreprod65.2.462.
- 29 Roasa, L. M., Choi, Y. H., Love, C. C., Romo, S., Varner, D. D., & Hinrichs, K.
30 (2007). Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of
31 horse oocytes in vitro. *Theriogenology*, 68(4), 560-566.
32 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.057>.
- 33 Sano, H., Matsuura, K., Naruse, K., Funahashi, H., 2010. Application of a
34 microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced
35 the incidence of polyspermic penetration. *Theriogenology* 74, 863–870.
36 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.011>
- 37 Spizziri, B. E., Fox, M. H., Bruemmer, J. E., Squires, E. L., & Graham, J. K.
38 (2010). Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions
39 spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 255-264.
40 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.001>.

- 1 Squires, E. L., Keith, S. L., & Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative
2 cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6),
3 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.024>.
- 4 Vidament, M., Dupere, A. M., Julianne, P., Evain, A., Noue, P., & Palmer, E.
5 (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field
6 results. *Theriogenology*, 48(6), 907-917. [https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00319-1)
7 691X(97)00319-1.
- 8 Vigolo, V., Gautier, C., Falomo, M.E., Aurich, C., 2023. Selection of frozen–
9 thawed stallion semen by microfluidic technology. *Reprod. Domest. Anim.* 58,
10 443–449.
11 <https://doi.org/10.1111/rda.14305>
- 12 Visconti, P. E., Ning, X., Fornés, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A.,
13 & Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in
14 mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine
15 phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental*
16 *biology*, 214(2), 429-443. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9428>.
- 17 Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved
18 semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
19 [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- 20 Zahn, F. S., Papa, F. O., & Dell'Aqua Júnior, J. A. (2002). Cholesterol
21 incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm
22 parameters and fertility.