

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

DEFESA DE MESTRADO

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL INTERESPÉCIE NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA UTERINA DE JUMENTAS (*Equus asinus*)**

Luana de Santa Davanso

BOTUCATU

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**EFEITO DO PLASMA SEMINAL INTERESPÉCIE NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA UTERINA DE JUMENTAS (*Equus asinus*)**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Lorenzo Garrido
Teixeira Martini Segabinazzi

BOTUCATU
2026

D245e Davanso, Luana de Santa

Efeito do plasma seminal interespecie na resposta
inflamatória uterina em jumentas (*Equus asinus*) / Luana de Santa
Davanso. -- Botucatu, 2026

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
1. Asinino (*Equus asinus*). 2. Interespecie. 3. Plasma
seminal. 4. Resposta inflamatória uterina. I. Título.

Nome do autor (a): Luana de Santa Davanso

Título: EFEITO DO PLASMA SEMINAL INTERESPÉCIE NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA DE JUMENTAS (*Equus asinus*)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lorenzo Segabinazzi

Presidente e orientador

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

Prof. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro

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

Prof. Dra. Veronica Flores da Cunha Scheeren

Membro

Departamento de Reprodução Animal – UDESC – Lages/ SC

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e me conceder força, coragem e sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional e incentivo em todos os momentos, sendo sempre meu porto seguro.

Ao meu orientador, Lorenzo Segabinazzi, pela paciência, dedicação e orientação exemplar, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento nesse período.

À professora Camila Dell'Aqua, ao professor Gabriel Monteiro e à professora Fernanda Saules, pelo inestimável apoio na condução do experimento, incluindo a realização das práticas, pelo compartilhamento de conhecimento e pela parceria ao longo de todo o trabalho.

Às minhas amigas de mestrado, Amanda e Camila, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, parceria, risadas e apoio constante ao longo desta jornada.

Ao meu noivo e sócio, Geidson, por acreditar em mim, compartilhar meus desafios e comemorar comigo cada conquista.

Às residentes Giovana e Luana e aos estagiários que estiveram comigo, pela colaboração, companheirismo e aprendizado compartilhado durante todo o percurso.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade, meu sincero muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

DAVANSO, LS. **Efeito do plasma seminal interespécie na resposta inflamatória uterina de jumentas (*Equus asinus*)**. Botucatu, 2026, p.63. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, FMVZ – Campos Botucatu.

RESUMO

A produção interespécies na criação de híbridos com sêmen fresco de jumentos em éguas tem taxas de gestação satisfatórias. No entanto, quando o sêmen de garanhões é utilizado para inseminar jumentas, verifica-se uma redução significativa nos índices de concepção. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do plasma seminal homólogo e heterólogo de equinos e asininos sobre a qualidade espermática, a resposta inflamatória uterina pós-cobertura e a fertilidade em jumentas. Foram utilizados jumentos e garanhões e o sêmen foi coletado por vagina artificial e avaliado quanto à concentração e motilidade. O plasma seminal foi obtido por centrifugação, filtrado e armazenado para posterior uso. No experimento *in vitro*, ejaculados foram fracionados e diluídos (50×10^6 espermatozoides/mL) em quatro tratamentos: controle, sêmen sem plasma, sêmen com plasma seminal homólogo e sêmen com plasma seminal heterólogo. As amostras foram avaliadas por sistema CASA e citometria de fluxo quanto à motilidade e integridade de membrana plasmática e acrossômica. No experimento *in vivo*, 18 jumentas foram distribuídas em grupos experimentais e inseminadas com sêmen fresco ajustado a 2×10^9 espermatozoides. A resposta inflamatória uterina foi avaliada por citologia endometrial nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas pós-inseminação, além da avaliação ultrassonográfica de fluido intrauterino. A fertilidade foi determinada por coleta embrionária e diagnóstico gestacional. Os diferentes tratamentos não alteraram significativamente parâmetros convencionais de qualidade espermática, como motilidade e espermatozoides rápidos. Entretanto, a integridade da membrana plasmática apresentou maior índice em equinos ($P < 0,05$). Nos asininos, a motilidade progressiva mostrou maior estabilidade ao longo do tempo ($P < 0,05$). A resposta inflamatória uterina apresentou padrão semelhante entre os grupos, porém com

alterações significativas, sendo observada menor expressão no grupo C2 em comparação ao grupo J2 no momento de 48 horas ($P < 0,05$). *In vivo*, os asininos apresentaram taxas de prenhez superiores ($P < 0,05$), e o uso de plasma seminal asinino em sêmen equino sugeriu efeito benéfico sobre a fertilidade. Esses resultados evidenciam que diferenças fisiológicas interespecíficas influenciam a funcionalidade espermática e os desfechos reprodutivos, indicando o potencial do plasma seminal de jumento para otimizar cruzamentos interespecíficos e estratégias de produção de híbridos.

Palavras-chave: asininos, endometrite, fertilidade.

DAVANSO, L. S. **Effect of interspecies seminal plasma on the uterine inflammatory response (*Equus asinus*)**. Botucatu, 2026. p.63.
Masters Thesis – São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, School of Veterinary Medicine and Animal Science – Botucatu Campus.

ABSTRACT

Interesting production in the creation of hybrids using fresh semen from water has satisfactory pregnancy rates. However, when stallion semen is used to inseminate jennies, a significant reduction in conception rates is observed. The present study aimed to evaluate the effect of homologous and heterologous equine and donkey seminal plasma on sperm quality, post-mating uterine inflammatory response, and fertility in jennies. Donkeys and stallions were used, and semen was collected via artificial vagina and evaluated for concentration and motility. Seminal plasma was obtained by centrifugation, filtered, and stored for later use. In the in vitro experiment, ejaculates were fractionated and diluted (50×10^6 spermatozoa/mL) into four treatments: control, semen without plasma, semen with homologous seminal plasma, and semen with heterologous seminal plasma. Samples were evaluated by CASA system and flow cytometry for motility and plasma and transverse membrane integrity. In the in vivo experiment, 18 jennies were distributed into experimental groups and inseminated with fresh semen adjusted to 2×10^9 spermatozoa. Uterine inflammatory response was evaluated by endometrial cytology at 0, 6, 24, and 48 hours post-insemination, in addition to ultrasonographic evaluation of intrauterine fluid. Fertility was determined by embryo collection and gestational diagnosis. The different treatments did not significantly alter sperm quality, with conventional changes such as motility and rapid spermatozoa. However, plasma membrane integrity showed a higher index in horses ($P < 0.05$). In donkeys, progressive motility showed greater stability over time ($P < 0.05$). The uterine inflammatory response showed a similar pattern between the groups, but with significant alterations, with lower expression observed in group C2 compared to group J2 at the 48-hour time point ($P < 0.05$). In vivo, donkeys showed higher pregnancy rates ($P < 0.05$), and

the use of donkey seminal plasma in equine semen suggested a beneficial effect on fertility. These results demonstrate that interspecific physiological differences influence sperm functionality and reproductive stages, showing the potential of donkey seminal plasma for optimizing interspecific crosses and hybrid production strategies.

Keywords: donkeys, endometritis, fertility.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias ajustadas ($\pm$ erro-padrão) da concentração de polimorfonucleares (PMNs) nos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo (0, 6, 24 e 48 horas).....	58
--	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Delineamento experimental *in vitro* apresentando os grupos Controle, Sem Plasma Seminal, Homólogo e Heterólogo de equinos e asininos avaliados no estudo.50
- FIGURA 2.** Delineamento experimental *in vivo* apresentando os grupos Equino Homólogo (C1), Equino Heterólogo (C2), Asinino Homólogo (J1), Asinino Heterólogo (J2) e Asinino Sem Plasma Seminal (J3) avaliados no estudo.52
- FIGURA 3.** Parâmetros de cinética espermática avaliados no momento 0 e 2 horas nos grupos CT, HOM, HET e SP de asininos e equinos no experimento *in vitro*. (A) Representa a porcentagem de motilidade total (MT), (B) motilidade progressiva (MP), (C) espermatozoides rápidos (RAP), (D) integridade de membrana plasmática (IMP).54
- FIGURA 4.** Parâmetros de cinética espermática avaliados nos grupos J1, J2, J3, C1 e C2 avaliados no experimento *in vivo*. (A) Representa a porcentagem de motilidade total (MT), (B) motilidade progressiva (MP), (C) espermatozoides rápidos (RAP).55
- FIGURA 5.** Taxas de prenhez obtidas nos diferentes grupos experimentais e a comparação entre asininos e equinos do experimento *in vivo*. (A) Porcentagem de prenhez efetivada entre os grupos: J1, J2, J3, C1 e C2, (B) Porcentagem de prenhez de jumentas efetivadas com asininos e equinos.56
- FIGURA 6.** Porcentagem de polimorfonucleares (PMNs) em citologia endometrial de jumentas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas após inseminação artificial nos grupos J1, J2, J3, C1 e C2 do experimento *in vivo*.57
- FIGURA 7.** Campos em aumento de 40x de lâmina de citologia uterina nos momentos (A) 0 hora, (B) 6 horas, (C) 24 horas e (D) 48 horas após inseminação artificial, com presença de células endometriais e polimorfonucleares.58

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C: grau Celsius

ALH: amplitude lateral de cabeça

ANOVA: análise de variância

BCF: frequência de batimento de cabeça

BSP: *bindin of sperm protein*

CASA: *computer assisted sperm analysis*

CAT: catalase

COX: ciclooxigenase

CRISP3: proteína secretora rica em cisteína 3

CRISPs: proteínas secretoras ricas em cisteína

CTSV: cathepsina V

DEFB126: beta-defensina 126

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECG: gonadotrofina coriônica equina

Fn-2: domínio tipo II de fibronectina

GPX5: glutathione peroxidase 5

GSR: glutathione reductase

GST: glutathione S-transferase

HSP: proteínas de choque térmico

IL1: interleucina 1

IL1RN: antagonista do receptor da interleucina 1

IL3: interleucina 3

IL4: interleucina 4

IL6: interleucina 6

IM: via intramuscular

IMP: integridade de membrana plasmática

KDA: quilodalton

KLK1E2: peptidase relacionada à calicreína 1 E2

LCN2: lipocalina 2

LDL: *low-density lipoprotein*

LIN: linearidade
LOX: lisil oxidase
Mg: miligrama
Mm: milímetro
MP: motilidade progressiva
mRNA: RNA mensageiro
MT: motilidade total
N: haploide
NETS: armadilhas extracelulares de neutrófilos
P: nível de significância
PCR: reação em cadeia da polimerase
PGE1: prostaglandina E1
PGE3: prostaglandina E3
PMN's: polimorfonucleares
PSA: antígeno prostático específico
PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados
RAP: espermatozoides rápidos
SERPINE2: serina protease inibidora
SOD: superóxido dismutase
SPINK2: inibidor de serina protease
STR: retilinearidade
TNF: fator de necrose tumoral
UI: unidade internacional
Um: micrometro
VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média
VCL: velocidade curvilínea
VSL: velocidade progressiva

Sumário

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Criação de híbridos	18
2.2 Reprodução interespécie	19
2.3 Sêmen asinino e sêmen equino.....	20
2.4 Diluentes	21
2.5 Plasma Seminal.....	24
2.6 Resposta inflamatória uterina	30
2.6.1 Barreiras de defesa e resposta inflamatória fisiológica	30
2.6.2 Mecanismos imunológicos e mediadores da inflamação uterina.....	31
2.6.2 Resolução da inflamação e fatores moduladores	33
2.6.3 Diferenças interespecíficas da resposta inflamatória uterina	34
3. CONCLUSÃO	35
4. REFERÊNCIAS	36
5. HIPÓTESES E OBJETIVOS	43
5.1 Hipóteses	43
5.2 Objetivos	43
CAPÍTULO 2	44
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1 Seleção dos animais.....	48
2.2 Colheita de sêmen	49
2.3 Pool de plasma seminal	49
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.1 Delineamento experimental – <i>in vitro</i>	49
3.2 Design experimental – <i>in vivo</i>	50
3.3 Acúmulo de fluído intrauterino.....	53
3.4 Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS	53
4.1 Experimento <i>in vitro</i>	53
4.2 Experimento <i>in vivo</i>	55
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	61
7. AGRADECIMENTOS.....	61
8. REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os asininos são criados e reconhecidos mundialmente, com grande interesse, principalmente no Brasil, no cruzamento com éguas para a criação e comércio de muares (Canisso et al., 2010). Esses animais são amplamente empregados em atividades que demandam resistência, força e rusticidade, características resultantes da combinação genética entre equinos (*Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*). O fenômeno conhecido como vigor híbrido confere aos muares elevada capacidade de trabalho, adaptação a diferentes condições ambientais e maior resistência física, o que explica sua utilização em atividades rurais, turismo e manejo de rebanhos (Canisso et al., 2019).

Apesar da relevância desses híbridos, a eficiência reprodutiva nos cruzamentos interespecíficos ainda representa um desafio. Interessantemente, a inseminação interespecies com sêmen fresco de jumento em éguas resulta em satisfatórias taxas de gestação. Porém, os resultados são significativamente mais baixos quando o sêmen equino é utilizado para inseminação de jumentas (Fanelli et al., 2023). Essas diferenças têm sido atribuídas a particularidades fisiológicas e imunológicas entre as espécies, especialmente relacionadas às interações entre o sêmen e o ambiente uterino (Allen; Short, 1997).

Entre os fatores que influenciam o sucesso reprodutivo destacam-se as características do sêmen, como a qualidade espermática e a composição do plasma seminal. Atualmente, o plasma seminal é reconhecido como um componente biologicamente ativo, responsável pela proteção dos espermatozoides e pela modulação da resposta inflamatória uterina. Após a inseminação, ocorre uma resposta inflamatória fisiológica no útero para a remoção de espermatozoides inviáveis e microrganismos, entretanto, quando essa reação não é resolvida adequadamente, pode evoluir para uma endometrite persistente pós cobertura, comprometendo a fertilidade. Evidências indicam que essa resposta pode apresentar variações entre espécies, sendo frequentemente mais intensa ou prolongada em jumentas quando comparada às éguas.

Os motivos causadores dessas baixas taxas de fertilidade de fêmeas asininas quando inseminadas com sêmen equino não são completamente entendidos, apesar de muitas hipóteses serem levantadas na indústria equestre.

CANISSO, I. F.; REIS, E. L.; TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M.; SANTOS, R. R.; MARTINS, M. I. Uterine inflammatory response in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Theriogenology**, v. 150, p. 103–111, 2020.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E.; et al. Persistent breeding induced endometritis in mares — A multifaceted challenge: from clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, art. 1432, 2020.

CANISSO, I. F.; STEWART, L. A.; DA SILVA, R. J. Endometrial cytology in mares: techniques and interpretation. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 925–933, 2016.

CANISSO, I. F.; PANZANI, D.; MIRÓ, J.; ELLERBROCK, R. E. Key aspects of donkey and mule reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 35, n. 3, p. 607–642, 2019.

CASTIGLIONE MORELLI, M. A.; OSTUNI, A.; GIANGASPERO, B.; CECCHINI, S.; CARLUCCIO, A.; BONI, R. Relationships between seminal plasma metabolites, semen characteristics and sperm kinetics in donkey (*Equus asinus*). **Animals**, v. 11, n. 1, art. 201, 2021.

CELEGHINI, E. C. C.; FIORAVANTI, M. C. S.; KISS, F. L. M. Immunological responses of the equine endometrium after breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 175, p. 29–38, 2017.

CELEGHINI, E. C.; LOPES, M. D.; MOREIRA, F. L.; CASTRO, P. H. G.; SILVA, P. M. R.; PINTO, R. A. Uterine inflammatory response after insemination in mares: cellular and molecular mechanisms. **Theriogenology**, v. 103, p. 1–8, 2017.

CHRISTOERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESSEN, A. M.; PETERSEN, M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Vet. Res.** v.8, p. 41, 2012.

CONTRAN, C. W.; BREEN, D. E.; FISHER, J. P.; KELLEY, D. **Histology**. 10. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

COSTA, L. M. L.; FREITAS, M. S. E.; GARCÍA, H. D. M.; FIALA RECHSTEINER, S. M.; FONTES, C. S.; TEIXEIRA, C. S.; VIANA, J. H. M.; ALBINO, M. V.; CARNEIRO, G. F.; RIBEIRO, G. C. Does the uterine inflammatory response differ between mares and donkey jennies inseminated with frozen donkey semen? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, art. 104703, 2023.

DALAL, J.; CHANDOLIA, R. K.; PAWARIA, S.; KUMAR, A.; KUMAR, D.; SELOKAR, N. L.; et al. Low-density lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: unraveling mechanism of action. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 12, p. 1231–1244, 1 dez. 2020.

FANELLI, D.; MORONI, R.; BOCCI, C.; CAMILLO, F.; ROTA, A.; PANZANI, D. Interspecific and intraspecific artificial insemination in domestic equids. **Animals**, v. 13, n. 4, art. 582, 2023.

FEDORKA, C. E.; SCOGGIN, K. E.; BOAKARI, Y. L.; HOPPE, N. E.; SQUIRES, E. L.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H. T. The anti-inflammatory effect of exogenous lactoferrin on breeding-induced endometritis when administered post-breeding in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 120, p. 147–152, 2018.

FERRER, M. S. Post-breeding endometritis after low-dose insemination in the mare. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, **Veterinary Clinical Sciences**, University of Buenos Aires, 2005.

FERRIS, R. A. Endometrial cytology and uterine health in mares. 2. ed. London: **Equine Veterinary Publishing**, 2016.

FRANCO, M.M. ; SANTOS, J.B.F. ; MENDONÇA, A.S. ; SILVA, T.C.F. ; ANTUNES, R.C. ; MELO, E.O. . Short Communication Quick method for identifying horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) hybrids. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-7, 2016.

GABRY'S, J.; KIJ, B.; KOCHAN, J.; BUGNO-PONIEWIERSKA, M. Interspecific hybrids of animals—in nature, breeding and science: a review. **Annals of Animal Science**, v. 21, p. 403–415, 2021.

GOBATO, M. L. M.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; SCHEEREN, V. F. C.; BANDEIRA, R. S.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Ability of donkey sperm to tolerate cooling: effect of extender base and removal of seminal plasma on sperm parameters and fertility rates in mares. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 9, 2022.

GUASTI, P. N.; SOUZA, F. F.; SCOTT, C.; PAPA, P. M.; CAMARGO, L. S.; SCHMITH, R. A.; MONTEIRO, G. A.; HARTWIG, F. P.; PAPA, F. O. Equine seminal plasma and sperm membrane: functional proteomic assessment. **Theriogenology**, v. 156, p. 70–81, 2020.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759–778, 2011.

LEBLANC, M. M. Endometrial cytology in the mare. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 26, n. 1, p. 205–214, 2010.

LEEB, T.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility lessons from humans and mice. *Animal Reproduction Science*, v. 89, n. 1-4, p. 21-29, 2005.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 65, p. 217-228, 2007.

MARTÍ, E. et al. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, v. 67, n. 9, p. 1446–1454, 2007.

MATEO OTERO, Y.; ZAMBRANO, F.; CATALÁN, J.; SÁNCHEZ, R.; YESTE, M.; MIRÓ, J.; FERNÁNDEZ FUERTES, B. Seminal plasma, and not sperm, induces time and concentration dependent neutrophil extracellular trap release in donkeys. *Equine Veterinary Journal*, v. 54, n. 2, p. 415–426, 2022.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L.; FAUST, M. R. Reproductive physiology of the mare. In: E. S. E. HAFEZ & B. HAFEZ (Ed.), *Reproduction in Farm Animals*. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 123–145, 2011.

MCLEAN, A. K.; WANG, W.; NAVAS-GONZALEZ, F. J.; et al. Reference intervals for hematological and blood biochemistry reference values in healthy mules and hinnies. *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, n. 4, p. 871–878, 2016.

MCLEAN, A.K.; NAVAS GONZÁLEZ, F.J.; CANISSO, I.F.. Donkey and mule behavior. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 35, p. 575–588, 2019.

MIRAGAYA, M. H.; NEILD, D. M.; ALONSO, A. E. A review of reproductive biology and biotechnologies in donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 65, p. 55–61, 2018.

MIRÓ, J.; PAPAS, M.; CATALÁN, J.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; BONILLA-CORREAL, S.; GACEM, S. Seminal plasma from jacks reduces neutrophil binding to spermatozoa in vitro. *Theriogenology*, v. 80, n. 2, p. 134–141, 2013.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; et al. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v. 72, p. 1017–1022, 2009.

MIRÓ, J.; CATALÁN, J.; MARÍN, H.; YÁÑEZ-ORTIZ, I.; YESTE, M. Specific seminal plasma fractions are responsible for the modulation of sperm–PMN binding in the donkey. *Animals*, Basel, v. 11, n. 5, art. 1388, 2021.

MIRÓ, J.; GUTIÉRREZ-REINOSO, M.; AGUIAR DA SILVA, J.; FERNANDES, C.; REBORDÃO, M. R.; ALEXANDRE-PIRES, G.; CATALÁN, J.; FERREIRA-DIAS, G. Collagen and eosinophils in jenny's endometrium: do they differ with endometrial classification?. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, art. 631, 2020.

NEVES, E. S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 247–255, 2002.

NOORI, S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*, v. 1, n. 8, p. 1–9, 2012.

OSTHAUS, B., L. PROOPS, I. HOCKING AND F. BURDEN. Spatial cognition and perseveration by horses, donkeys and mules in a simple A-not-B detour task. **Animal Cognition** 16(2): 301-305. 2013.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; GUASTI, P. N.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 293–301, 2008.

PAPA, F. O. **Reprodução de garanhões**. 1. ed. Botucatu: MedVet, 2020.

PAPAS, M.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; CATALÁN, J.; BONILLA-CORREAL, S.; GACEM, S.; MIRÓ, J. Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. **Theriogenology**, v. 140, p. 180-187, 2019.

PODICO, G.; BITTAR, J. H.; LOUX, S. C.; SOUZA, F. F.; CANISSO, I. F. The interaction between seminal plasma, sperm, and endometrium in inter- and intra-species breeding in equids. **Reproduction**, v. 167, e230472, 2024.

POMMER, A.C.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1493-1501, 2002.

PRASINOU, P.; DE AMICIS, I.; FUSARO, I.; BUCCI, R.; CAVALLINI, D.; PARRILLO, S.; et al. The lipidomics of spermatozoa and red blood cells membrane profile of Martina Franca donkey: preliminary evaluation. **Animals**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2023.

PROOPS, L.F.; BURDEN, F.; OSTHAUS, B. Social relation in a mixed group of mules, ponies and donkeys reflect differences in equid type. **Behavioural Processes**, v. 90, p. 337-342, 2012.

PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores. 2009. 123 f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

RODRIGUES, L.T.; SOUSA, F.E.M.R.; CANUTO, L.E.F.; SILVA, L.F.M.C.; ANDRADE Jr, L.R.P.; OLIVEIRA, S. N.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA Jr,

J.A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes e da remoção do plasma seminal na refrigeração do sêmen asinino (*Equus asinus*). **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 15, p. 143-144, 2018.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; et al. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, p. 1846–1854, 2012.

ROTA, A.; SGORBINI, M.; PANZANI, D.; et al. Effect of housing system on reproductive behaviour and on some endocrinological and seminal parameters of donkey stallions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 40–47, 2018.

RUA, R. R.; OLIVEIRA, R. R.; SILVA, M. R.; COSTA, L. M.; PEREIRA, F. R. Endometrial cytology in mares: evaluation of inflammatory cell populations. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1843–1850, 2016.

SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B.; LOVE C.C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. **Reprod Dom Anim** 49, p. 989-994. 2014.

SCHRÖDER, K.; PICKRELL, A. M.; HAMPSON, L.; IRVINE, K. M.; HAYNES, J. D.; HERSHEY, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.

TALLURI, T. R.; MAL, G.; RAVI, S. K. Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jacks. **Vet World**, v. 10, n. 2, p. 214–220, 2017.

TAYLOR, M. J.; SHORT, R. V. Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p. 441–445, 1972.

TIZARD, I. R. Immunology: an introduction. 7. ed. London: **Elsevier**, 2009.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M. Equine endometritis: immune mechanisms and clinical implications. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 1–10, 2016.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M.; HODGSON, D. R.; COLE, D. J. Seminal plasma reduces neutrophil binding to stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p. 411–424, 2001.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M.; HODGSON, D. R.; COLE, D. J. Seminal plasma enhances sperm survival and modulates neutrophil function in the mare. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1206–1216, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M.; JACOBSEN, S.; LEHN-JENSEN, H. Seminal plasma reduces the polymorphonuclear neutrophil response and

improves pregnancy rates in mares. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 482–493, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M.; JACOBSEN, S.; LEHN-JENSEN, H. Seminal plasma modulates neutrophil function and protects stallion spermatozoa from immune-mediated damage. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 625–634, 2014.

VAN DEN BRANDEN, C. Anatomy and clinical implications of the reproductive tract in mares and jennies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 101, p. 45–53, 2021.

VILÉS, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; et al. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 143, p. 57–63, 2013.

WEN, X.; REN, H.; HE, Q.; YI, M.; ULAANGEREL, Tseweendolmaa; BOU, Gerelchimeg. Comparative Analysis of Proteomic Characteristics in Seminal Plasma Between Horses and Donkeys. **Animals**, Basel, v. 15, n. 11, p. 1532, 23 maio 2025.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine breeding-induced endometritis: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 9, p. 673–682, 2013.

WOODWARD, E.M.; TROEDSSON, M.H.T. Equine breeding-induced endometritis: A review. **J. Equine Vet. Sci.** 2013, 33, 673–682.

5. HIPÓTESES E OBJETIVOS

5.1 Hipóteses

- A inflamação uterina pós-cobertura não difere em jumentas inseminadas com sêmen de jumento ou garanhão.
- O plasma seminal heterólogo (de jumento) no sêmen equino pode ser benéfico para as taxas de fertilidade na reprodução de bardotos

5.2 Objetivos

Caracterizar aspectos reprodutivos (inflamação uterina após cobertura e fertilidade) em jumentas inseminadas com sêmen de garanhão e avaliar o efeito do plasma seminal homólogo e heterólogo sobre a qualidade espermática e a fertilidade de garanhões e jumentos utilizados para a produção de bardotos, mulas e jumentos.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido de acordo com as normas da revista *Animal Reproduction Science* (Elsevier), ISSN 0378-4320, classificada no estrato A2 no Qualis CAPES na área de Medicina Veterinária/Ciências Agrárias.

Efeito do plasma seminal interespécies na resposta inflamatória uterina em jumentas (*Equus asinus*)

Davanso, L.S.¹, Silva, A. C.¹, Zanardi, C. S.¹, Segabinazzi, L. G. T. M.^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil
luana.davanso@unesp.br

²Ross University School of Veterinary Medicine, PO Box 334, Basseterre, St. Kitts, West Indies

Highlights

- O plasma seminal de jumento melhora a fertilidade em inseminações interespecíficas em jumentas.
- A utilização de plasma asinino pode aumentar as taxas de prenhez em comparação ao sêmen equino com plasma homólogo.
- Diferenças interespecíficas no plasma seminal influenciam a resposta uterina e o sucesso reprodutivo.

Resumo

Apesar da eficiência reprodutiva entre equinos e asininos na produção de muares, a fertilidade na geração de bardotos é menor. Este estudo avaliou os efeitos do plasma seminal homólogo e heterólogo sobre a qualidade espermática, a resposta inflamatória uterina e a fertilidade em jumentas inseminadas com sêmen de jumentos e garanhões. No experimento *in vitro*, ejaculados de jumentos e garanhões foram submetidos a diferentes tratamentos: sêmen diluído em meio à base de caseinato de sódio e colesterol, com ou sem adição de plasma seminal (CT e SP), além da adição de plasma homólogo ou heterólogo (HOM e HET). Avaliaram-se a cinética espermática e a integridade da membrana plasmática (IMP). No experimento *in vivo*, 18 jumentas foram

distribuídas em cinco grupos experimentais (J1, J2, J3, C1 e C2), totalizando 90 inseminações com sêmen fresco. A resposta inflamatória uterina foi avaliada por citologia endometrial, enquanto a fertilidade foi determinada por coleta embrionária e diagnóstico gestacional. Nos resultados *in vitro*, a motilidade progressiva foi significativamente maior nos tratamentos com sêmen asinino (CT, HOM e HET) ($P < 0,05$). Nos resultados *in vivo* as taxas de prenhez foram significativamente mais elevadas nos grupos envolvendo asininos (J1, J2 e J3) em relação ao grupo C1 ($P < 0,05$) e a resposta inflamatória uterina foi menor no grupo C2 em comparação ao J2 após 48 horas ($P < 0,05$). Os resultados sugerem que o plasma seminal de jumentos pode contribuir para melhorar a fertilidade em cruzamentos interespecíficos.

Palavras-chave: asininos, endometrite, fertilidade.

Abstract

Despite the reproductive efficiency of horses and donkeys in mule production, fertility in hinnies is lower. This study evaluated the effects of homologous and heterologous seminal plasma on sperm quality, uterine inflammatory response, and fertility in jennies inseminated with semen from donkeys and stallions. In the *in vitro* experiment, ejaculates from donkeys and stallions were subjected to different treatments: semen diluted in a sodium caseinate and cholesterol-based medium, with or without the addition of seminal plasma (CT and SP), as well as the addition of homologous or heterologous plasma (HOM and HET). Sperm kinetics and plasma membrane integrity (IMP) were evaluated. In the *in vivo* experiment, 18 jennies were distributed into five experimental groups (J1, J2, J3, C1, and C2), totaling 90 inseminations with fresh semen. Uterine inflammatory response was assessed by endometrial cytology, while fertility was determined by embryo collection and gestational diagnosis. *In vitro* results showed significantly higher progressive motility in the donkey semen treatments (CT, HOM, and HET) ($P < 0.05$). *In vivo* results showed significantly higher pregnancy rates in the donkey groups (J1, J2, and J3) compared to group C1 ($P < 0.05$), and the uterine inflammatory response was lower in group C2 compared to J2 after 48 hours ($P < 0.05$). The results suggest that donkey seminal plasma may

contribute to improved fertility in interspecific crosses.

Keywords: donkeys, endometritis, fertility.

1. INTRODUÇÃO

O interesse pela reprodução de jumentos e pela produção de híbridos tem crescido mundialmente em função da importância econômica e funcional desses animais. A produção de muare, especialmente mulas e bardotos, tem relevância crescente na atividade equestre, o que reforça a necessidade de compreender melhor a fisiologia reprodutiva dos asininos. Embora compartilhem algumas características com equinos, os asininos apresentam particularidades endócrinas e reprodutivas ainda pouco exploradas, o que dificulta a aplicação direta de protocolos desenvolvidos para cavalos.

O cruzamento interespecie entre éguas e jumentos, que resulta em mulas ou burros, apresenta taxas de fertilidade comparáveis ou até superiores às obtidas em cruzamentos intraespecíficos. Por outro lado, o cruzamento envolvendo jumentas e garanhões exibe fertilidade marcadamente inferior, conforme descrito por Allen e Short (1997) e reforçado por estudos mais recentes (Fanelli et al., 2023). Essa assimetria interespecífica representa um desafio biológico importante e ainda não totalmente compreendido.

Os componentes do plasma seminal têm papel fundamental na sobrevivência e modulação da função espermática no trato genital feminino (Troedsson et al., 2005). Segundo Podico et al. (2024) o plasma seminal de jumentos promove uma resposta inflamatória pós-infusão significativamente menor no útero de éguas, quando comparado ao sêmen e ao plasma seminal de cavalo.

Além disso, evidências sugerem que diferenças entre o plasma seminal de garanhões e jumentos podem influenciar de maneira distinta o ambiente uterino da jumenta, que apresenta uma resposta inflamatória mais intensa que as éguas após o depósito de sêmen (Miró et al., 2009). Esse fenômeno pode ser ainda mais acentuado quando se utiliza sêmen congelado ou sêmen de garanhões, contribuindo para as baixas taxas de concepção relatadas (Rota et al., 2012).

Apesar dessas observações, ainda há escassez de estudos que investiguem diretamente a interação entre o sêmen equino e o útero da jumenta,

especialmente no contexto interespecífico. Essa lacuna limita o avanço de biotécnicas aplicadas à produção de bardotos e evidencia a necessidade de caracterizar os mecanismos envolvidos na resposta uterina e na fertilidade das jumentas quando inseminadas com garanhões.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar aspectos reprodutivos de jumentas inseminadas com garanhões, incluindo a resposta inflamatória uterina pós-cobertura, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário, visando compreender fatores que possam explicar a baixa eficiência reprodutiva na produção de bardotos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº 000.266. O ensaio clínico foi executado entre fevereiro de 2024 e agosto de 2025.

2.1 Seleção dos animais

Para este estudo, foram utilizados vinte e oito animais, sendo cinco jumentos, um garanhão e nove jumentas oriundos do Centro de Melhoramento Genético da UniFil, localizado em Londrina, PR, Brasil, bem como dois asininos, dois garanhões e nove jumentas provenientes do Departamento de Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil. Os animais foram alojados individualmente em galpões, com acesso livre ao pasto, água *ad libitum* e alimentação composta por mistura de alfafa e feno de capim, 2 kg de concentrado e suplementação mineral. Antes do estudo, foi realizado um exame de aptidão reprodutiva, que confirmou que todas as fêmeas apresentavam citologia uterina negativa (<5% de PMNs) e fertilidade comprovada e todos os machos foram avaliados pelo CASA (IVOS 12, Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA) e também tiveram fertilidade comprovada (Brook, 1993).

2.2 Colheita de sêmen

Inicialmente, os animais tiveram três ejaculados coletados em dias consecutivos com o objetivo de esgotar os reservatórios epididimários. As coletas foram realizadas com a vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, Brasil), utilizando um manequim e a presença de uma fêmea (égua ou jumenta) em estro para estímulo sexual. Logo após a colheita, o sêmen foi imediatamente filtrado em filtro de nylon estéril, e os parâmetros seminais registrados. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, e a motilidade foi analisada por meio do sistema computadorizado CASA (IVOS 12, Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA).

2.3 Pool de plasma seminal

Os animais foram coletados, e o sêmen foi centrifugado a $600 \times g$ por 10 minutos. O plasma seminal recuperado (sobrenadante) foi novamente centrifugado a $1.000 \times g$ por 20 minutos, sendo posteriormente filtrado em filtro de seringa de $45 \mu m$ e, em seguida, em filtro de $22 \mu m$, para remoção completa de debris celulares. O plasma puro foi então identificado e armazenado em congelador em alíquotas de 10 mL. No momento da preparação dos tratamentos, os plasmas foram aquecidos a $37^\circ C$ em banho-maria e homogeneizados em proporções iguais para formação dos pools específicos de jumento e de cavalo.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Delineamento experimental – *in vitro*

Foram utilizados cinco asininos e quatro equinos para o experimento *in vitro*, com quatro ejaculados de cada animal (N=36). Cada ejaculado foi fracionado em quatro alíquotas iguais e diluído a 50×10^6 espermatozoides/mL nos seguintes tratamentos: **Controle** (CT) – sêmen diluído em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®, Botupharma, Brasil), centrifugado e homgeinizado novamente no sobrenadante; **Sem plasma seminal** (SP) – sêmen centrifugado e resuspendido em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®); **Plasma seminal homólogo** (HOM) – sêmen centrifugado e ressuspendido em plasma da mesma espécie (equino ou asinino) + diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®); **Plasma seminal heterólogo** (HET) – sêmen centrifugado e

ressuspendido em plasma de espécie (equino ou asinino) diferente + diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®). Nos tratamentos com plasma, após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, o sêmen foi diluído em plasma seminal na concentração de $200 \times 10^6/\text{mL}$ e depois diluído em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol até $50 \times 10^6/\text{mL}$.

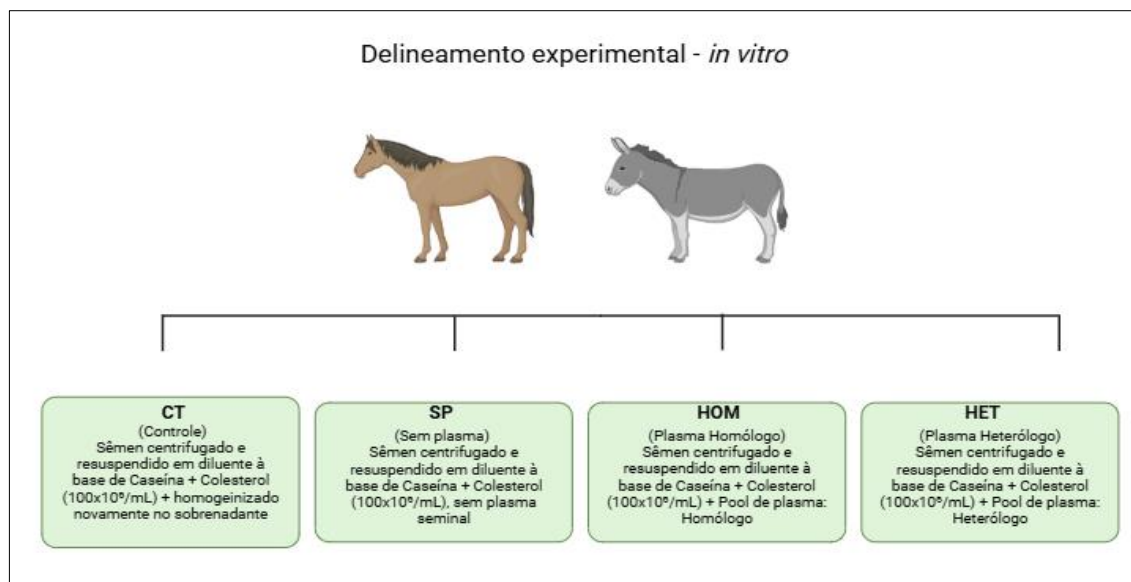


FIGURA 1. Delineamento experimental *in vitro* apresentando os grupos Controle, Sem Plasma Seminal, Homólogo e Heterólogo de equinos e asininos avaliados no estudo.

Logo após a preparação, as amostras foram submetidas à refrigeração a 5°C e avaliadas nos momentos 0h e 2h. Todas as amostras foram analisadas quanto a motilidade espermática pelo sistema computadorizado CASA (IVOS 12, Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA) e quanto a integridade de membrana plasmática e acrossômica (IMPA) por citometria de fluxo.

Foram avaliados os seguintes parâmetros cinéticos: MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvilinear), ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça), BCF (frequência de batimento de cauda), STR (retilinearidade), LIN (linearidade) e RAP (porcentagem de espermatozoides rápidos).

3.2 Design experimental – *in vivo*

Ao total, 18 jumentas foram submetidas aos cinco grupos experimentais ($N=90$). No grupo **Cavalo homólogo** (C1), as jumentas foram inseminadas com sêmen fresco de equino diluído a 100 milhões de espermatozoides/mL em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®) contendo

plasma seminal homólogo na proporção 1:1. No grupo **Cavalo heterólogo** (C2), as jumentas foram inseminadas com sêmen fresco de garanhão diluído a 100 milhões de espermatozoides/mL em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®) suplementado com plasma seminal heterólogo (plasma seminal asinino). No grupo **Jumento homólogo** (J1), as jumentas foram inseminadas com sêmen fresco de asinino diluído a 100 milhões de espermatozoides/mL em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®) suplementado com plasma seminal homólogo. No grupo **Jumento heterólogo** (J2), as jumentas foram inseminadas com sêmen fresco de asinino diluído a 100 milhões de espermatozoides/mL em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®) e plasma seminal heterólogo (plasma seminal equino). Por fim, no grupo **Jumento Sem Plasma Seminal** (J3), as jumentas foram inseminadas com sêmen fresco de jumento diluído a 100 milhões de espermatozoides/mL em diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BotuGold®) sem plasma seminal. Todos os grupos estão descritos na Figura 2. Para a preparação da dose inseminante, o ejaculado foi previamente avaliado, diluído na proporção de 1:1 em diluente base de leite desnatado (BotuSêmen®) e submetido a centrifugação a 600xg por 10 minutos para a retirada do plasma seminal e adição dos componentes do grupo selecionado, obtendo ao final a dose inseminante de 2.000×10^6 .

Jumentas foram monitoradas por ultrassonografia transretal três vezes por semana para o acompanhamento do ciclo estral. Quando um folículo pré-ovulatório (29–32 mm de diâmetro) era identificado, realizava-se a primeira inseminação. Após 24 horas da primeira inseminação, as jumentas foram induzidas à ovulação com acetato de histrelina (500 µg/IM, Strelin®, Botupharma, EUA) e, 24 horas após a indução, foram novamente inseminadas com sêmen fresco contendo 2×10^9 espermatozoides. O acúmulo de fluido intrauterino foi avaliado por ultrassonografia, e a citologia endometrial foi obtida utilizando uma escova citológica no momento da indução da ovulação (0h), e 6, 24, 48 h após a IA.

O diagnóstico de gestação e a recuperação embrionária foram realizados aos 14 e 8 dias após a ovulação, respectivamente, como forma de avaliação da fertilidade no presente estudo. Para a recuperação embrionária, foram utilizados quatro litros de solução de ringer com lactato. Após a lavagem uterina ou o

diagnóstico de gestação, administrou-se 0,075 mg de cloprostenol por via intramuscular para indução do retorno ao estro. Todas as jumentas passaram por um ciclo controle entre os tratamentos, durante o qual foram monitoradas por ultrassonografia transretal, além da realização de citologia uterina para confirmar a ausência de alterações inflamatórias no útero.

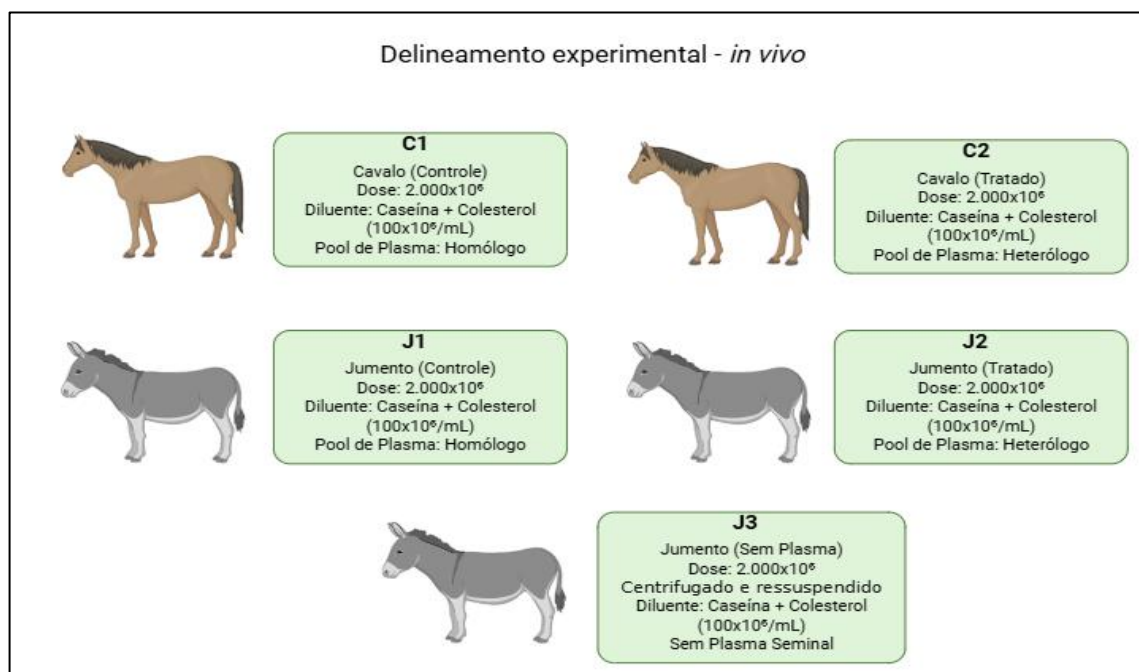


FIGURA 2. Delineamento experimental *in vivo* apresentando os grupos Equino Homólogo (C1), Equino Heterólogo (C2), Asinino Homólogo (J1), Asinino Heterólogo (J2) e Asinino Sem Plasma Seminal (J3) avaliados no estudo.

Citologias uterinas foram colhidas utilizando-se escovas citológicas para éguas (PROVAR®, Brasil), nos momentos D0 (inseminação) e 6, 24 e 48 horas após a IA. Nessa técnica, a cânula protetora da escova foi introduzida através da cérvix e avançada até o lúmen uterino utilizando luva estéril, garantindo a minimização de contaminação. Em seguida, a escova citológica foi exposta por aproximadamente 30 segundos, sendo efetuados movimentos rotatórios no sentido horário e anti-horário para a coleta do material endometrial. Após a colheita, a escova foi novamente retraída para dentro da cânula, removida do trato reprodutivo da fêmea e o material obtido, transferido para lâmina de vidro por meio de movimentos rotatórios, visando à adequada fixação da amostra.

As amostras citológicas foram depositadas em lâminas de vidro, secas ao ar e coradas pelo método *Diff-Quick*. As lâminas foram lidas em microscopia ótica em aumento de 400x. Ao todo 200 células foram contadas para a determinação da porcentagem de PMN's e células endometriais

3.3 Acúmulo de fluido intrauterino

O acúmulo de fluido intrauterino foi avaliado por meio de ultrassonografia transretal, utilizando transdutor linear de alta frequência. A avaliação foi realizada com a sonda posicionada em ângulo de aproximadamente 30–45° em relação ao corpo uterino, permitindo visualização nítida da bifurcação uterina e dos cornos.

3.4 Análise estatística

A normalidade e distribuição dos dados foram avaliadas por meio dos testes de Shapiro–Wilk e Cramér–von Mises. Os dados paramétricos foram avaliados utilizando-se modelo misto e bonferroni. Para a variável PM, que não atendeu aos pressupostos de normalidade, foi aplicada uma transformação Box–Cox, sendo o modelo posteriormente ajustado com os dados transformados. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento *in vitro*

A Figura 3 ilustra a porcentagem de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), espermatozoides rápidos (RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) nos grupos (CT, SP, HET e HOM) de jumento e cavalo avaliados em (CASA) e por citometria de fluxo.

De forma mais detalhada, os resultados indicam que, para a variável MT, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo HET dentro de cada tempo na espécie asinina ($P < 0,05$). Porém, não houveram outras diferenças consistentes entre tempos dentro de um mesmo grupo ($P > 0,05$), o que sugere que os tratamentos avaliados não influenciaram esse parâmetro ao longo do período experimental. Da mesma forma, as comparações entre espécies para MT não revelaram diferenças significativas dentro dos mesmos grupos e tempos, indicando comportamento semelhante entre asininos e equinos para essa variável.

Em relação à MP, após a aplicação da transformação Box–Cox para atender aos pressupostos de normalidade, verificou-se que houve um efeito consistente da espécie, com asininos apresentando valores de MP significativamente mais elevados ($P < 0,05$) do que equinos em praticamente

todos os grupos e tempos avaliados, especialmente nos grupos CT, HOM e SP, evidenciando um padrão fisiológico distinto entre as espécies. Além disso, o grupo SP de asininos apresentou uma diferença significativa em comparação ao grupo HET. Quanto à RAP, os resultados demonstraram estabilidade desse parâmetro em asininos e equinos, sem diferenças significativas entre grupos ou entre tempos ($P > 0,05$), indicando manutenção da motilidade rápida progressiva ao longo do tempo experimental.

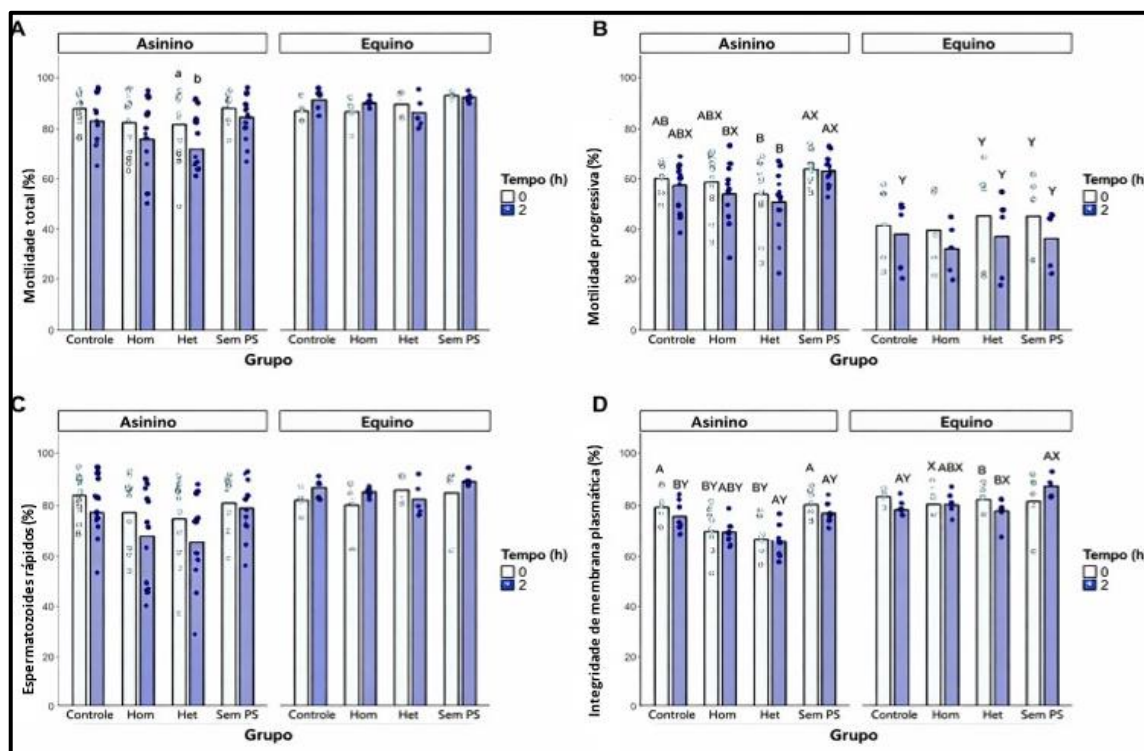


FIGURA 3. Parâmetros de cinética espermática avaliados no momento 0 e 2 horas nos grupos CT, HOM, HET e SP de asininos e equinos no experimento *in vitro*. (A) Representa a porcentagem de motilidade total (MT), (B) motilidade progressiva (MP), (C) espermatozoides rápidos (RAP), (D) integridade de membrana plasmática (IMP).

Os dados de PMI foram transformados por Box-Cox e analisados por modelo linear misto, considerando grupo, tempo, espécie e suas interações como efeitos fixos, ejaculado como covariável e macho como efeito aleatório. A distribuição dos resíduos foi considerada adequada.

Em jumentos, houve efeito do grupo experimental nos tempos 0 e 2, com maiores valores de PMI nos grupos CT e SP em comparação aos grupos HET e HOM ($P < 0,05$). Em cavalos, não foram observadas diferenças entre os grupos no tempo 0 ($P > 0,05$). Contudo, no tempo 2, o grupo SP apresentou valores de PMI superiores aos grupos CT e HET ($P < 0,05$).

Não houve efeito do tempo dentro de cada grupo, independentemente da espécie ($P > 0,05$). Na comparação entre espécies, os cavalos apresentaram valores de PMI superiores aos jumentos nos grupos HET e HOM em ambos os tempos ($p < 0,05$). No grupo SP, essa diferença foi observada apenas no tempo 2 ($P < 0,05$), enquanto no grupo Controle não houve diferença entre as espécies.

4.2 Experimento *in vivo*

Em conjunto, os resultados demonstraram que a motilidade espermática total (Painel A) e espermatozoides rápidos (Painel C) não tiveram diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, a porcentagem de motilidade espermática progressiva diferiu entre os grupos experimentais, conforme apresentado na Figura 4. O grupo J1 apresentou motilidade progressiva significativamente maior do que o grupo J2 com relação à MP ($P < 0,05$).

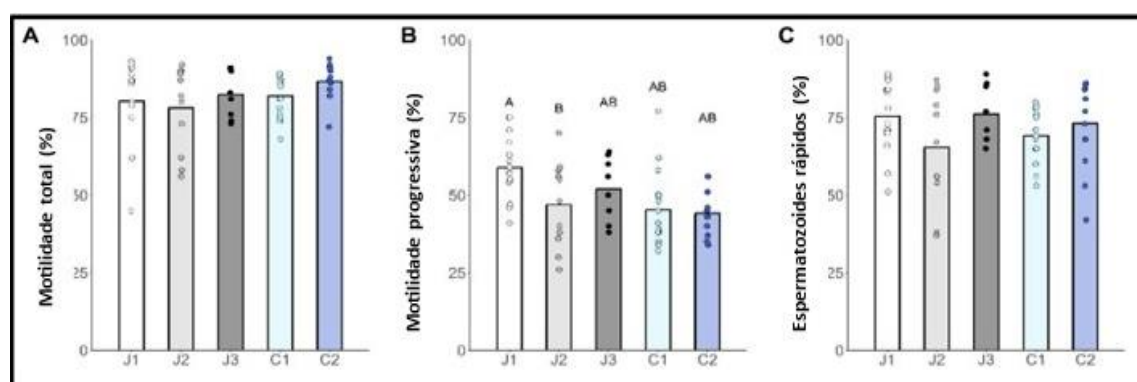


FIGURA 4. Parâmetros de cinética espermática avaliados nos grupos J1, J2, J3, C1 e C2 avaliados no experimento *in vivo*. (A) Representa a porcentagem de motilidade total (MT), (B) motilidade progressiva (MP), (C) espermatozoides rápidos (RAP).

Além disso, observou-se maior variabilidade entre os grupos, com os grupos J1 e J3 apresentando valores médios superiores aos grupos J2, C1 e C2 ($P < 0,05$), enquanto alguns grupos não diferiram estatisticamente entre si, conforme indicado pelo agrupamento por letras (AB).

A Figura 5 apresenta a porcentagem de prenhez efetivada entre os diferentes grupos de jumento e cavalo. Foi observado associação significativa entre os grupos J1, J2, J3 e taxa de prenhez elevada e o grupo C1 com a menor taxa de prenhez.

Os resultados obtidos *in vivo* indicaram que a taxa de prenhez foi significativamente influenciada pelo grupo experimental e pela espécie. Verificou-se associação significativa entre grupo e prenhez ($\chi^2 = 17,73$; $p =$

0,001), sendo o grupo C1 caracterizado pelas menores taxas, enquanto os grupos J1, J2 e J3 apresentaram maior probabilidade de prenhez. Esses achados foram corroborados pela análise de regressão logística, a qual evidenciou aumento significativo nas chances de prenhez nos grupos J1 (OR = 9,10), J2 (OR = 17,50) e J3 (OR = 9,63) quando comparados ao C1, destacando-se o grupo J2 como aquele com maior efeito positivo. As análises de comparações múltiplas confirmaram diferença significativa entre o grupo C1 e os grupos J, sem diferenças estatísticas entre estes últimos ($P > 0.05$).

Quanto à espécie, observou-se efeito expressivo, com os jumentos

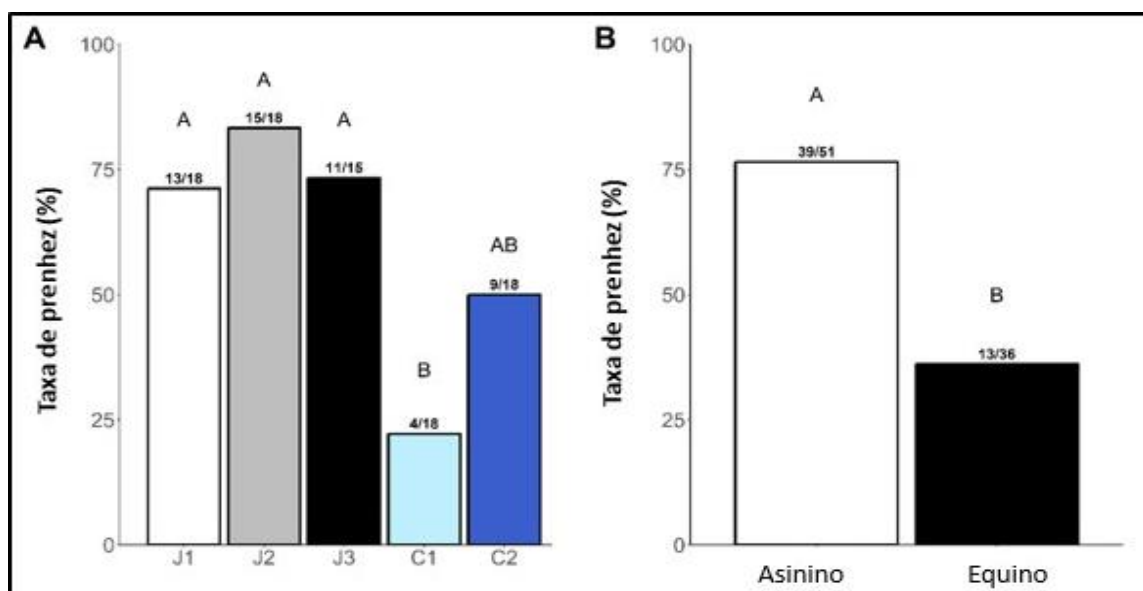


FIGURA 5. Taxas de prenhez obtidas nos diferentes grupos experimentais e a comparação entre asininos e equinos do experimento *in vivo*. (A) Porcentagem de prenhez efetivada entre os grupos: J1, J2, J3, C1 e C2, (B) Porcentagem de prenhez de jumentas efetivadas com asininos e equinos.

apresentando taxas de prenhez significativamente superiores às dos garanhões ($\chi^2 = 12,67$; $P < 0,001$), além de odds de prenhez aproximadamente 5,75 vezes maiores nos asininos em relação aos equinos. Em relação ao fator macho, embora o teste do qui-quadrado tenha indicado associação global significativa ($P = 0,013$), a regressão logística e as comparações múltiplas não identificaram diferenças consistentes entre os indivíduos após os ajustes estatísticos, sugerindo elevada variabilidade e possível limitação do tamanho amostral.

Em relação a presença de células inflamatórias avaliadas nos tempos 0,6 e 24 horas pós inseminação, a Figura 6 destacou que entre os grupos do experimento, não houve diferença estatística, mas houve uma tendência similar

entre os grupos, que descreve a resposta inflamatória uterina com um aumento exacerbado nas primeiras 6 horas e reduz significativamente até as 48 horas.

Observou-se aumento significativo da porcentagem de neutrófilos (PMN)

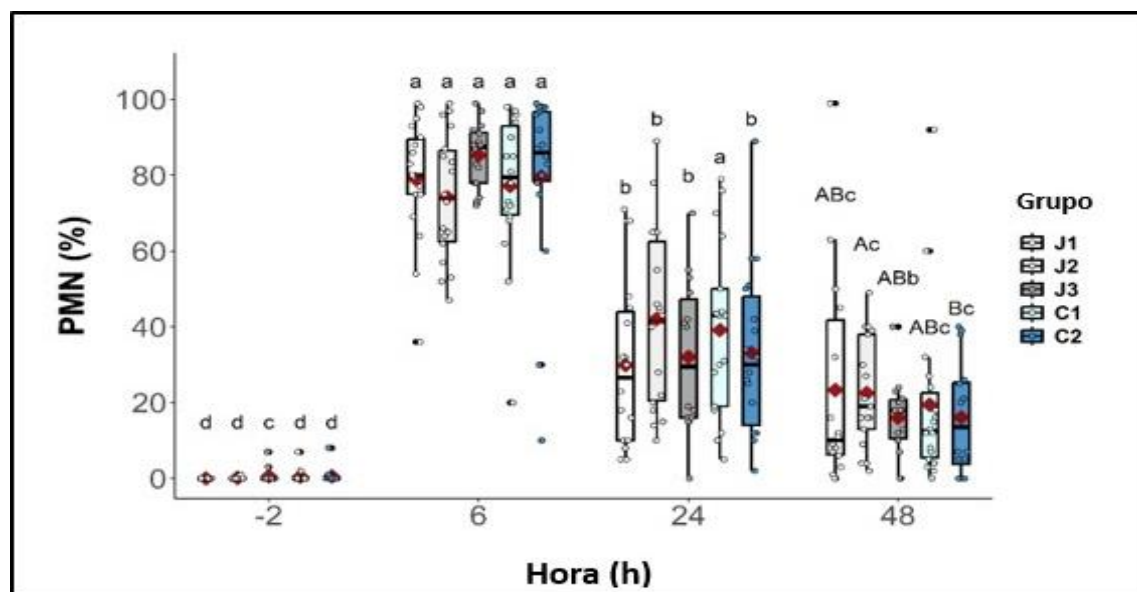


FIGURA 6. Porcentagem de polimorfonucleares (PMNs) em citologia endometrial de jumentas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas após inseminação artificial nos grupos J1, J2, J3, C1 e C2 do experimento *in vivo*.

em todos os grupos às 6 horas, caracterizando o pico da resposta inflamatória aguda, sem diferenças estatísticas entre os grupos. Em 24 horas, houve redução significativa dos níveis de PMN, indicando início do processo de resolução inflamatória. Em 48 horas, os grupos J2 e C2 apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, com uma menor expressão de inflamação no C2, porém todos os grupos apresentaram redução de polimorfonucleares comparado às 24 horas, evidenciando padrões de resolução da inflamação.

A Figura 7 representa a resposta inflamatória uterina das jumentas avaliadas no experimento *in vivo*, onde A apresenta o momento prévio à inseminação artificial, com ausência de polimorfonucleares indicando útero sadio. A imagem B representa o pico inflamatório no momento 6 horas com maior índice de células inflamatórias. As imagens C e D representam os momentos 24 e 48 horas respectivamente, e demonstram uma redução significativa ao longo do tempo de PMNs, elucidando a redução da resposta inflamatória uterina.

Na tabela 1, foi observado efeito significativo da hora sobre a concentração de PMN ($P < 0,001$), independentemente do grupo experimental. As médias ajustadas ($\pm$ erro-padrão) foram maiores no momento 6 horas (4,35

$\pm 0,09$), seguidas por 24 horas ($3,34 \pm 0,09$) e 48 horas ($2,51 \pm 0,09$), sendo o momento 0 hora aquele com os menores valores ($0,14 \pm 0,09$). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos dentro de um mesmo período apenas entre os grupos J2 e C2 no momento 48 horas ($P > 0,05$). Com relação a presença de fluido intrauterino, não houveram diferenças significativas entre os grupos avaliados ($P < 0,05$).

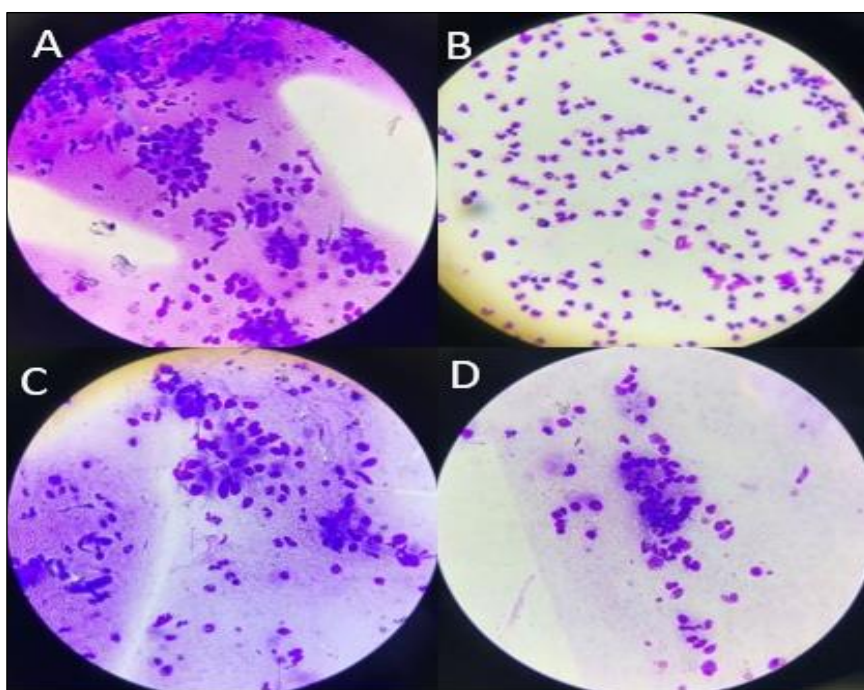


FIGURA 7. Campos em aumento de 40x de lâmina de citologia uterina nos momentos (A) 0 hora, (B) 6 horas, (C) 24 horas e (D) 48 horas após inseminação artificial, com presença de células endometriais e polimorfonucleares.

Tabela 1. Médias ajustadas ($\pm$ erro-padrão) da concentração de polimorfonucleares (PMNs) nos diferentes grupos experimentais ao longo do tempo (0, 6, 24 e 48 horas).

Grupo	0 Hora	6 Horas	24 Horas	48 Horas
C1	$0,19 \pm 0,18^a$	$4,32 \pm 0,18^d$	$3,51 \pm 0,19^c$	$2,52 \pm 0,18^b$
C2	$0,20 \pm 0,18^a$	$4,30 \pm 0,18^d$	$3,28 \pm 0,18^c$	$2,18 \pm 0,19^b$
J1	$0,04 \pm 0,19^a$	$4,40 \pm 0,19^d$	$3,18 \pm 0,19^c$	$2,52 \pm 0,19^b$
J2	$0,12 \pm 0,19^a$	$4,35 \pm 0,18^d$	$3,63 \pm 0,18^c$	$2,92 \pm 0,19^b$
J3	$0,14 \pm 0,21^a$	$4,37 \pm 0,21^c$	$3,09 \pm 0,22^b$	$2,39 \pm 0,22^b$

Médias ajustadas obtidas por modelo linear misto, considerando grupo, hora e sua interação como efeitos fixos, ciclo como covariável e animal como efeito aleatório. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre dias dentro de cada grupo ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os resultados do delineamento experimental *in vitro*, referentes à qualidade espermática avaliada pelos parâmetros de motilidade total, proporção de espermatozoides rápidos e integridade da membrana plasmática, demonstraram que, embora os tratamentos não tenham promovido diferenças expressivas entre os grupos, foram observadas diferenças interespecíficas. Houve manutenção da motilidade progressiva ao longo do tempo no grupo de asininos, enquanto, nos equinos, a integridade de membrana plasmática teve um índice maior.

Ao avaliar os parâmetros de motilidade total dos ejaculados utilizados nos ciclos das jumentas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, havendo apenas pequenas variações entre eles. Esse resultado corrobora os dados previamente obtidos *in vitro*, nos quais a motilidade total dos grupos mostrou-se satisfatória. Apesar disso, a manutenção da motilidade progressiva nos asininos pode ter contribuído para as taxas de fertilidade satisfatórias observadas nesses grupos.

Os resultados obtidos entre os grupos do experimento com relação a fertilidade, corroboraram com os dados já descritos por Fanelli (2023), no qual o cruzamento entre garanhões e jumentas tiveram uma taxa de gestação significativamente inferior (16,3%), em relação aos embriões de jumentos com éguas que tiveram uma taxa de gestação de (42,9%). As taxas de fertilidade obtidas no estudo, foram de 36% nas gestações de jumentas e garanhões, e 76% nas gestações de jumentas e jumentos.

Ao comparar os grupos J1, J2 e J3 entre si, não houveram diferenças significativas com relação a taxa de prenhez. Entretanto, ao comparar os grupos de cavalos entre si, foi possível observar que o grupo C2 obteve uma taxa de fertilidade de 50%, (2,3 vezes maior) que o grupo C1 com taxa de 22%. O que difere entre os dois grupos é a presença do plasma asinino no sêmen equino do grupo C2. Em síntese, o plasma seminal é um componente essencial do sêmen, cuja complexa composição proteica e metabólica exerce influência direta sobre a qualidade espermática, a resposta inflamatória do trato reprodutivo feminino e as taxas de fertilidade.

Um estudo realizado por Wen et al. (2025), em proteômica permitiu identificar aproximadamente 2380 proteínas no plasma seminal de cavalos e

2385 no de jumentos. Sete das 10 proteínas mais expressas foram encontradas em ambas as espécies e estão intimamente relacionadas à qualidade espermática e à prenhez. Porém, também foram evidenciadas a presença de assinaturas proteômicas específicas, com 158 proteínas apresentando expressão aumentada e 190 com expressão reduzida no plasma seminal de jumentos em comparação aos cavalos. Além disso, foram identificadas proteínas diferencialmente expressas entre as espécies, 59 proteínas específicas em equinos, e 64 proteínas específicas em jumentos. Esses resultados evidenciam diferenças relevantes na fisiologia reprodutiva entre as espécies e refletem variações em suas estratégias reprodutivas e adaptação ao ambiente reprodutivo.

Proteínas com peso molecular entre 30 e 100 kDa, foram associadas ao papel imunomodulador do plasma seminal em um estudo recente feito por Miró et al. (2021), no qual forneceu as primeiras evidências de que nem todas as proteínas do plasma seminal exercem os mesmos efeitos sobre a função espermática, a sobrevivência e a interação espermatozoide-PMN em jumentas. Dessa forma, sugere-se que a presença de componentes específicos no plasma seminal de cada espécie pode estar associada ao efeito exercido sob os espermatozoides e o processo até a fertilização.

Podico et al. (2024) forneceram evidências de que o plasma seminal de jumento exerce efeito imunomodulador benéfico no útero da égua pois apresentam altas concentrações de lactoferrina, que possui propriedades antioxidantes, protegendo os espermatozoides contra a peroxidação lipídica. Além disso, também apresentam maiores níveis de prostaglandinas PGE1 e PGE3 em comparação aos equinos, com efeitos anti-inflamatórios e a modulação da resposta imune no trato reprodutivo feminino, atuando na inibição da quimiotaxia de leucócitos e na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Embora não tenha sido observado diferença estatística entre os grupos com relação a resposta inflamatória uterina no experimento, um estudo feito por Mateo-Otero et al. (2022) evidenciou que o plasma seminal de jumentos é responsável pela indução de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) em PMNs de jumentas, que segue um comportamento dependente do tempo e da concentração. As NETs são redes de DNA, histonas e proteínas granulares

liberadas por neutrófilos para aprisionar e destruir patógenos. Em cavalos, uma proteína do plasma seminal com atividade de Dnase, demonstrou prevenir a formação de NETs e reduzir a ligação espermatozoide-neutrófilo (Alghamdi et al., 2009). Esse processo pode também representar uma estratégia reprodutiva pela qual o trato reprodutivo feminino das jumentas selecionam os espermatozoides.

O que precisa ser levado em consideração no delineamento desse estudo é que as taxas de fertilidade podem ter sofrido variação já que em algumas jumentas foram realizados a colheita de embrião ao invés do diagnóstico gestacional por se tratarem de animais comerciais, podendo ocorrer colheitas falso negativas. Além disso, no que se refere ao sêmen utilizado nos grupos do experimento, o sêmen foi proveniente de ejaculados, que foram imediatamente submetidos a centrifugação para a retirada do plasma. Entretanto, esse contato prévio com o plasma autólogo não descarta uma possível interferência nos resultados obtidos. Todavia, para que não houvesse essa exposição ao plasma autólogo, seria necessário a realização da colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo, o que torna inviável esse feito já que, seria necessário realizar a castração dos machos reprodutores para obter esse material e a criopreservação para o armazenamento do sêmen, o que já é descrito como uma técnica limitada em jumentas.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão o presente estudo determinou que o plasma seminal de jumento pode compor nutrientes que interferem positivamente na fertilidade das jumentas e que se associa a capacidade espermática e seu processo até a fertilização quando este é ressuspendido ao sêmen equino na produção de bardotos.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

8. REFERÊNCIAS

Alghamdi, A. S. et al., (2009) Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding. *Animal Reproduction Science*, v. 114, n. 1–3, p. 331–344.

Allen, W. R.; Short, R. V., (1997) Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *Journal of heredity*, v. 88, p. 384–392.

Fanelli, D.; Moroni, R.; Bocci, C.; Camillo, F.; Rota, A.; Panzani, D., (2023) Interspecific and intraspecific artificial insemination in domestic equids. *Animals*, v. 13, p. 582.

Mateo-Otero, Y.; Zambrano, F.; Catalán, J.; Sánchez, R.; Yeste, M.; Miró, J.; Fernández-Fuertes, B., (2022) Seminal plasma, and not sperm, induces time and concentration-dependent neutrophil extracellular trap release in donkeys. *Equine veterinary journal*, v. 54, n. 2, p. 415–426.

Miró, J.; Catalán, J.; Marín, H.; Yáñez-Ortiz, I.; Yeste, M., (2021) Specific seminal plasma fractions are responsible for the modulation of sperm–pmn binding in the donkey. *Animals*, basel, v. 11, n. 5, art. 1388.

Miró, J.; Taberner, E.; Rivera, M.; et al., (2009) Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated catalonian donkey semen. *Theriogenology*, v. 72, p. 1017–1022.

Podico G., Bittar J.H., Loux S.C., Souza F.F., Canisso I.F., (2024) The interaction between seminal plasma, sperm, and endometrium in inter- and intra-species breeding in equids. *Reproduction*, 167: e230472.

Rota, A.; Panzani, D.; Sabatini, C. et al., (2012) Donkey jack (*equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, v. 78, p. 1846–1854.

Wen, Xin; Ren, Hong; He, Gianqian; Yi, Minna., (2025) ulaangerel, tseweendolmaa; bou, gerelchimeg. Comparative analysis of proteomic characteristics in seminal plasma between horses and donkeys. *Animals*, basel, v. 15, n. 11, p. 1532.