

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Giovanna Sinigalia Leme Nogueira

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO
CRIOPRESERVADO APÓS A ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.**

Belo Horizonte
2025

Giovanna Sinigalia Leme Nogueira

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO
CRIOPRESERVADO APÓS A ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Monique de Albuquerque Lagares.

Belo Horizonte

2025

Nogueira, Giovanna Sinigalia Leme, 1999 -
N778a Avaliação in vitro da qualidade do Sêmen Equino criopreservado após a adição de vesículas
extracelulares / Giovanna Sinigalia Leme Nogueira.- 2025.
39f: il

Orientador: Munique de Albuquerque Lagares
Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção do título Mestre em Ciência Animal
Area de concentração: Reprodução Animal
Inclui bibliografia.

1. Equino - Teses - 2. Garanhão - Teses - 3. Reprodução Animal –
Teses - I. Lagares, Monique de Albuquerque. - II. Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.108 926

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos santos CRB 3589

Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

GIOVANNA SINIGALIA LEME NOGUEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Reprodução Animal**. Defesa da dissertação intitulada: "**AVALIAÇÃO IN VITRO DA QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO APÓS A ADIÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.**"

Aprovado(a) em 05 de maio de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Monique de Albuquerque Lagares - Orientador(a)
Dr.(a). Priscila Fantini
Dr.(a). Juliano Coelho da Silveira



Documento assinado eletronicamente por **Monique de Albuquerque Lagares, Professora do Magistério Superior**, em 13/05/2025, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliano Coelho da Silveira, Usuário Externo**, em 14/05/2025, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Fantini, Professora do Magistério Superior**, em 14/05/2025, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4175677** e o código CRC **BB1E17FB**.

”O sucesso não é uma questão de sorte, mas sim de perseverança e resiliência.
Persista, mesmo quando tudo parecer impossível.”
Karlonan Guimarães

AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre me incentivou e apoiou em toda trajetória até aqui, sem nunca questionar a distância e a saudade que com ela só aumenta. Especialmente a meus pais, Sandra e Marcelo por todo amor e carinho, sempre presentes sendo minha base e motivo de melhora a cada dia. Obrigada pela oportunidade.

Ao meu amor, Teco, que sempre encorajou minhas loucuras e apoiou minhas decisões, trabalhando também à distância, mas me ajudando em cada etapa do caminho.

Aos meus filhotes felinos, Elsa e Luci, por serem meu amparo nos dias difíceis e meus exemplos de amor incondicional, além de sempre me reafirmarem o quanto vale essa linda profissão.

Aos incríveis ICs que eu poderia conhecer e orientar durante essa trajetória, César, Larissa, Sophia, Isabela; vocês foram base e acolhimento em um lugar totalmente desconhecido.

Aos colegas de trabalho que eu pude conhecer e ter o prazer de desenvolver pesquisa, mesmo que por um tempo curto, Ighor, Auana e Natália; uma equipe sem igual que não entrega nada menos que os 110% (que as vezes nem tínhamos).

As grandes amigas que eu criei, Sophia, Eduarda e César; vocês não serão nada menos que meus eternos confidentes, ombros de choro e conforto, fontes de fofoca e risadas de tirar o fôlego. Sou grata demais por ter tido vocês comigo nesses anos.

As minhas mineirinhas, Stéffany e Ingrid, as irmãs mais acolhedoras que eu conheço e fizeram de tudo para que a mudança para BH se tornasse leve e divertida. Família não é só de sangue.

As minhas amigas da graduação, Tatiane, Eliana, Natália, Maitê e Beatriz, por também me acompanharem em mais uma jornada através de uma tela e ainda me deixarem continuar sendo parte dos novos ciclos de vida.

As minhas meninas de São Paulo, Liziane, Bruna, Gabriela e Rafaela, um grupo que nunca me negou atenção e desde o colégio me serviu como âncora para não esquecer minha cidade natal. A cada passo do caminho vocês estavam lá, e sou grata por essa amizade continuar tão forte.

A minha orientadora, Monique, que foi além de uma professora, se tornou minha amiga. Obrigada pelo acolhimento, paciência, ensinamentos e oportunidades.

Ao Fogo, que mais que um ganhão de hospital-escola foi uma companhia em meio a loucura das rotinas.

Aos médicos veterinários Tiago Resende, Raphael Gouvea, Júnio Mota, Amanda Salles e Haras Morada Nova que me ajudaram cedendo os animais para a pesquisa. Ao professor Diêgo dos Santos Ferreira pelo apoio e assistência no processo de isolamento das vesículas extracelulares. Ao professor Guilherme Mattos Jardim Costa que ajudou com o corante para análise em citometria de fluxo.

Ao professor Juliano da Silveira, e colaboradores da USP, pelos ensinamentos e acolhimento para desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao pesquisador Márcio Sobreira, do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ Minas, pelo auxílio nas análises no citômetro de fluxo.

Aos professores Camila Stefanie Fonseca de Oliveira e Raphael Rocha Wenceslau pela análise estatística e resultados.

Resumo

Embora a criopreservação do sêmen equino possibilite a preservação e o transporte do material genético, o processo de congelamento provoca danos aos espermatozoides. O plasma seminal (PS) possui em sua composição vesículas extracelulares (EVs), partículas carreadoras de moléculas, que atuam como mediadores da comunicação intercelular. O objetivo deste estudo foi melhorar a qualidade do sêmen criopreservado equino com a adição de EVs do PS heterólogo de um garanhão com motilidade progressiva alta. As EVs foram isoladas do PS e preservadas em dois diferentes veículos Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) e BotuCrio® diluidor de congelamento de sêmen equino. Para testar o efeito das EVs sobre a qualidade espermática do sêmen de seis garanhões, este foi congelado (100×10^6 espermatozoides/ml) com diluidor de congelamento de sêmen equino BotuCrio® e suplementado com 400 e 800×10^6 /ml de EVs. Foram realizados sete tratamentos: 1) Controle, 2) D-PBS sem EVs, 3) D-PBS + 400×10^6 /ml EVs, 4) D-PBS + 800×10^6 /ml EVs, 5) BotuCrio® sem EVs, 6) BotuCrio® + 400×10^6 /ml EVs, e 7) BotuCrio® + 800×10^6 /ml EVs. As amostras de sêmen foram descongeladas e analisadas quanto aos parâmetros de motilidade e cinemática com o sistema de análise espermática computadorizado, morfologia com microscopia de contraste de fase, funcionalidade de membrana plasmática com o teste hiposmótico (HOST), integridade de membrana plasmática, taxa de reação acrossômica e potencial de membrana mitocondrial espermáticos com citometria de fluxo. Os dados foram analisados com análise de variância (ANOVA) e testes de pressupostos (Shapiro-Wilk para normalidade e Bartlett para homocedasticidade). As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey. Nos casos em que os pressupostos não foram atendidos, aplicou-se o teste de Skillings-Mack, seguido pelo teste de Durbin para comparação entre os grupos. A probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa. No presente trabalho foi observado que a adição de PBS sem as EVs resultou em uma redução significativa do parâmetro de cinemática frequência do batimento cruzado de cabeça (BCF) ($8,7 \pm 0,3$ Hz) quando comparado ao controle ($9,5 \pm 0,5$ Hz). As outras variáveis de motilidade e cinemática espermática e os outros parâmetros avaliados não foram afetados pelos tratamentos. Em conclusão, as concentrações testadas de EVs derivadas do plasma seminal não influenciaram a qualidade do sêmen equino após o descongelamento.

Palavras chave: epididimossomos; reprodução; criopreservação; espermatozoide; garanhão; congelamento

Abstract

Although equine semen cryopreservation enables the preservation and transport of genetic material, the freezing process causes damage to spermatozoa. Seminal plasma (SP) contains extracellular vesicles (EVs) in its composition, which are particles that carry molecules and act as mediators of intercellular communication. The objective of this study was to improve the quality of cryopreserved equine semen by adding heterologous SP-derived EVs from a stallion with high progressive motility. EVs were isolated from SP and preserved in two different vehicles: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) and BotuCrio®, an equine semen freezing extender. To test the effect of EVs on sperm quality from six stallions, semen was cryopreserved (100×10^6 spermatozoa/mL) using the BotuCrio® extender and supplemented with 400 and 800×10^6 EVs/mL. Seven treatments were performed: 1) Control, 2) D-PBS without EVs, 3) D-PBS + 400×10^6 EVs/mL, 4) D-PBS + 800×10^6 EVs/mL, 5) BotuCrio® without EVs, 6) BotuCrio® + 400×10^6 EVs/mL, and 7) BotuCrio® + 800×10^6 EVs/mL. Semen samples were thawed and analyzed for motility and kinematic parameters using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system; morphology by phase-contrast microscopy; plasma membrane functionality using the hypoosmotic swelling test (HOST); plasma membrane integrity, acrosome reaction rate, and mitochondrial membrane potential by flow cytometry. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and assumption tests (Shapiro–Wilk for normality and Bartlett's test for homoscedasticity). Means were compared using Tukey's test. When assumptions were not met, the Skillings–Mack test was applied, followed by Durbin's test for group comparisons. A probability of $P < 0.05$ was considered statistically significant. In the present study, the addition of PBS without EVs resulted in a significant reduction in the kinematic parameter beat cross frequency (BCF) (8.7 ± 0.3 Hz) compared with the control (9.5 ± 0.5 Hz). Other sperm motility and kinematic variables, as well as the remaining evaluated parameters, were not affected by the treatments. In conclusion, the tested concentrations of SP-derived EVs did not influence post-thaw sperm quality in equine sperm.

Keywords: epididymosomes; reproduction; cryopreservation; spermatozoa; stallion; freezing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

Figura 1: Esquema da morfologia espermática. Fonte: Araujo et al., 2017 13

Figura 2: Estrutura da membrana plasmática. Fonte: Adaptada de Carlson, 2019 13

Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de secreção apócrina nos segmentos do epidídimo e glândulas sexuais acessórias masculinas: formação de vesículas apicais e a degradação de grandes vesículas liberadas no lúmen com subsequente liberação de vesículas extracelulares. Fonte: Rocca et al., 2022. 17

CAPITULO 2 – Artigo 1

Figure 1. Representative TEM image of isolated EVs (arrow). 29

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 – Artigo 1

Table 1. Number of positive events/ μL in the different experimental groups for the distinct extracellular vesicle (EV) markers	30
Table 2. Equine sperm characteristics of fresh semen (n=6)	30
Table 3. Post-thawed sperm motility and kinematic parameters evaluated by CASA system in different treatments with different concentrations of EVs ($X \pm SE$)	30
Table 4. Percentage of sperm morphology with EVs addition ($X \pm SE$)	31
Table 5. Sperm percentage with functional (HOST+), and intact plasma membrane, and with spontaneous acrosome reaction (AR) with EVs addition ($X \pm SE$)	31
Table 6. Sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker) ($X \pm SE$)	32

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Espermatozoide	12
2.2 Plasma seminal	14
2.3 Criopreservação do sêmen	14
2.4 Diluidores de sêmen	15
2.4.1 Crioprotetores	15
2.4.2 Antioxidantes	16
2.5 Vesículas extracelulares	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2	24
Artigo: <i>In vitro</i> evaluation of post-thaw equine semen quality after the addition of different concentrations of extracellular vesicles.	
Abstract	24
Introduction	25
Materials and Methods	25
Experiment 1: Isolation of EVs from the seminal plasma of a stallion with high sperm motility.	
1. Semen collection and evaluation	26
2. Plasma seminal extracellular vesicles isolation	26
3. Characterization and quantification of EVs	26
3.1 Nanoparticle tracking analysis	26
3.2 Transmission electron microscopy	26
3.3 Nano-flow cytometry	26
Experiment 2: <i>In vitro</i> evaluation of post-thaw equine semen quality after the addition of different concentrations of plasma seminal EVs.	
1. Semen collection and evaluation	27
2. Equine semen freezing	27
3. Sperm Motility and Kinematic Analysis	27
4. Assessment of Plasma Membrane Integrity and Spontaneous Acrosome Reaction	28
5. Assessment of Plasma Membrane Functionality	28
6. Sperm Lipid Peroxidation	28
7. Mitochondrial Membrane Potential	28
8. Statistical Analysis	29
Results	29
Discussion	32
Conclusion	33
Funding statement	33
Acknowledgements	33
Conflict of interest	33
Author contributions	33
Data availability statement	33
ORCID	33
References	34
ANEXO I – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	37

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura representa um setor em constante crescimento no Brasil e no exterior, com grande relevância econômica e social. Segmentos como o esporte e o turismo rural têm se beneficiado diretamente desse crescimento, impulsionando a valorização do cavalo como instrumento de trabalho, lazer e investimento (Lima et al., 2012). A crescente demanda por animais de alto desempenho estimulou o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas, como o resfriamento e a criopreservação do sêmen, visando otimizar o aproveitamento do potencial genético e reprodutivo dos garanhões (Brandão, 2008; Hezavehei et al., 2018).

Entretanto, a espécie equina apresenta índices de fertilidade inferiores em comparação com outras espécies domésticas, atribuídos, em parte, à ausência de seleção genética voltada para parâmetros reprodutivos (Merkt, 1986; Ginther et al., 1992). A criopreservação do sêmen oferece diversas vantagens, como o prolongamento da vida útil dos espermatozoides, maior facilidade do manejo reprodutivo, a preservação do material genético fora da estação de monta e a superação de barreiras geográficas (Barreto et al., 2008). No entanto, os processos de congelamento e descongelamento provocam danos espermáticos, resultando em redução da qualidade, motilidade e capacidade fecundante dos espermatozoides (Alvarez e Storey, 1989; Bell et al., 1993).

Diante desse cenário, estratégias como a adição de antioxidantes e moléculas bioativas promotoras da motilidade aos diluentes de sêmen têm sido estudadas como alternativas para melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento (Martins et al., 2018; Alves et al., 2020; Lagares et al., 2020; Lagares et al., 2022).

As vesículas extracelulares (EVs) são partículas envoltas por uma bicamada lipídica, liberadas por diversas células do organismo vivo (Lötvall et al., 2014) e carregam uma variedade de moléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos, enzimas e miRNAs (Keerthikumar et al., 2016). Nos machos, as EVs são produzidas pelas células da próstata, vesículas seminais e epidídimo (Rocca et al., 2022), e estão presentes no plasma seminal após a ejaculação (Barranco et al., 2021).

As aplicações das EVs na reprodução animal têm se expandido, destacando-se na modulação do desenvolvimento embrionário bovino e na regulação da maturação de gametas (Da Silveira et al., 2017; Da Silveira et al., 2018; Andrade et al., 2019; Ávila et al., 2019). As EVs estão envolvidas em processos essenciais da fisiologia espermática, como a capacitação, a reação acrossômica e a interação entre espermatozoides e oócitos (Leahy et al., 2020).

Embora tenham sido reportados resultados positivos da adição das EVs ao diluidor de congelamento de sêmen de touro (Lange-Consiglio et al., 2022; Kowalczyk and Kordan, 2024), homem (Mahdavinezhaz et al., 2022), lobos vermelhos e guepardos (Ferraz et al., 2020), ainda não foi citada sua adição no congelamento de sêmen equino. Portanto, a utilização das EVs pode ser uma alternativa para a melhorar a qualidade seminal do sêmen equino criopreservado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatozoide

O espermatozoide é uma célula altamente especializada e diferenciada, cujo objetivo é alcançar o oócito e realizar a fertilização (Florman e Fissore, 2015). Ele é composto por duas partes morfológicas e funcionalmente distintas: cabeça e cauda (Meyers, 2009; Amann e Pickett, 1987). A cabeça do espermatozoide contém o núcleo, que abriga a cromatina em sua forma condensada. Na região apical, encontra-se o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas responsáveis pela lise da zona pelúcida (ZP) do oócito durante o processo de fecundação (Chlopik e Wysokińska, 2020). Conectando a cabeça ao flagelo está o pescoço, ou colo (Avidor-Reiss, 2018). A cauda, ou flagelo, é composta por três partes: peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária é caracterizada pela presença de um grande número de mitocôndrias dispostas em formato helicoidal, envolvendo o axonema e as fibras externas densas. Sua principal função é produzir a energia necessária para a motilidade espermática (Toshimori e Eddy, 2015; Auger, 2018; Gerton e Vadnais, 2018).

Em mamíferos, o axonema consiste em um par central de microtúbulos circundado por nove pares periféricos (Chlopik e Wysokińska, 2020). O par de microtúbulos centrais conecta-se por pequenas pontes compostas por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (Warner, 1976, Alberts et al., 2004). Quando o ATP produzido pelas mitocôndrias é degradado pelas ATPases presentes na dineína, ocorre a conversão da energia química em energia cinética. Esse processo se dá através do deslocamento dos microtúbulos adjacentes uns sobre os outros, resultando na flexão do axonema, o que dá início ao movimento flagelar (Mortimer, 1997).

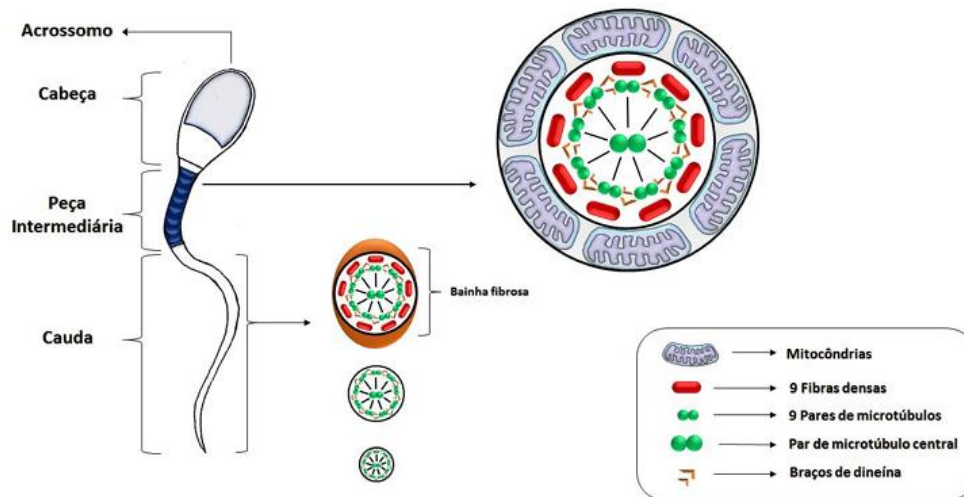


Figura 1. Esquema da morfologia espermática. Fonte: Araujo et al., 2017

Os espermatozoides possuem cinco diferentes membranas, membrana plasmática (MP), acrossômica externa e interna, nuclear e a membrana mitocondrial, cada uma com funções essenciais para sua sobrevivência e capacidade de fertilização. Nas células espermáticas a MP segue o modelo estrutural de bicamada fosfolipídica associada a proteínas, como colesterol e glicoproteínas (Chlopik e Wysokińska, 2020, Fig. 2). A MP envolve todo o espermatozoide (Amann e Graham, 1992; Andrade et al, 2011), e no equino sua composição é de aproximadamente 57% de fosfolipídios, 37% de colesterol e 6% de glicolipídios (Gadella et al., 2001).

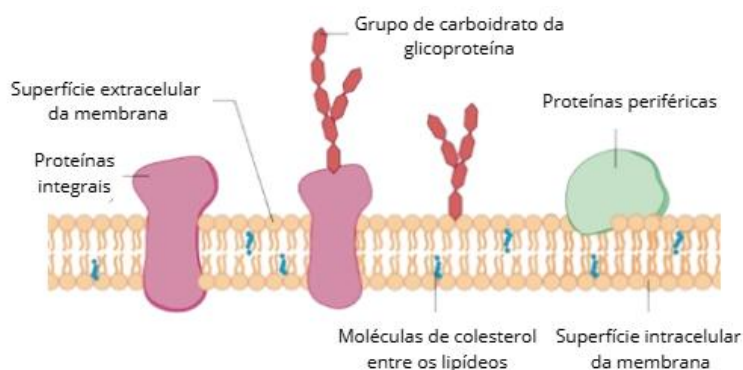


Figura 2. Estrutura da membrana plasmática. Fonte: Adaptada de Carlson, 2019.

Para a fertilização ocorrem modificações estruturais na MP espermática desde a espermatogênese até a ligação do espermatozoide-oócito (Cunha, 2002). A fluidez da membrana depende de alguns fatores, como temperatura, concentração de colesterol, o grau de saturação lipídica e proporção entre colesterol e fosfolipídios (Andrade et al, 2010). Os ácidos graxos saturados garantem maior rigidez, enquanto que os insaturados conferem maior fluidez a membrana (Andrade et al, 2010).

No espermatozoide equino a proporção entre colesterol e fosfolipídios é de 0,36, um valor médio em comparação a outras espécies (0,45 bovino, 0,99 humano e 0,26 suíno) (Amann e Graham, 1992; Parks e Graham, 1992). A maior concentração de colesterol estabiliza a MP tornando-a menos fluida e

flexível, e com isso mais resistente às mudanças de temperatura. Por possuir pouco colesterol na sua MP, o espermatozoide equino é mais sensível ao choque térmico durante resfriamento ou congelamento (Amann e Pickett, 1987).

As membranas acrossômicas interna e externa, nuclear e mitocondriais são mais suscetíveis aos danos causados pela redução brusca de temperatura (Amann e Graham, 2011). Quando submetidas ao resfriamento sofrem mudança irreversível, acarretando em perda de motilidade espermática, aumento na permeabilidade, redução do metabolismo celular e perda de componentes celulares (Graham, 1996). Durante as fases de resfriamento e descongelamento ocorrem os principais danos sofridos pela célula no processo de criopreservação. Por isso, é necessária uma taxa de resfriamento e aquecimento adequadas, bem como adição de diluentes para prevenir injúrias à membrana devido ao choque térmico (Amann e Pickett, 1987).

2.2 Plasma seminal

O plasma seminal (PS) é um fluido heterogêneo formado pela mistura de secreções do testículo, epidídimo e glândulas anexas (Lavon e Bournell, 1975; Varner et al., 1987). Além de envolver os espermatozoides no sêmen, ele desempenha um papel importante para a sobrevivência e transporte dessas células pelos órgãos genitais masculinos e femininos (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

O PS constitui a maior parte do volume total do ejaculado, enquanto os componentes celulares, como espermatozoides, células redondas e vesículas extracelulares (EVs), representam apenas cerca de 1% na espécie equina (KARESKOSKI e KATILA, 2008). Além de compostos celulares, também estão presentes no PS eletrólitos, proteínas, hormônios esteroides, açúcares e enzimas (Clément, 2018). Todos os componentes possuem uma grande importância para a funcionalidade do espermatozoide, seja para modular a geração de energia, a interação com o trato reprodutivo feminino ou a motilidade. Porém, a grande maioria das funções relacionadas com a fertilidade se atribuem à grande quantidade de proteínas desse fluido (humano 25–55 g/L; galo 7.5–9.0 g/L; suíno 30–60 g/L) (Rodriguez-Martinez et al., 2021).

As proteínas atuam como um tampão para manter o pH e osmolaridade adequados, além de fornecer fontes de energia para os espermatozoides, em condições aeróbicas e anaeróbicas. Elas também influenciam a maturação espermática, estabilização da MP, capacitação dos espermatozoides e interação com as secreções da tuba uterina (Topfer-Petersen et al., 1998).

O PS também contém antioxidantes importantes para a criopreservação dos espermatozoides, como ascorbato, urato, glutatona, α -tocoferol, e enzimas como catalases, superóxido dismutase e glutatona redutase (Hofner et al, 2020).

No entanto, o PS é removido em procedimentos como no congelamento de sêmen e na fertilização *in vitro* (FIV) e, por possuir proteínas que induzem a capacitação espermática. Existem controvérsias quanto aos efeitos positivos e negativos do PS sobre função espermática durante a criopreservação de sêmen dependendo da espécie (Alvarenga et al., 2017). Essas variações de respostas podem ser explicadas pelas diferentes composições de proteínas do PS entre as espécies (Maxwell et al., 1999; Leahy et al., 2010).

Estudos destacaram o efeito deletério do PS no resfriamento e congelamento do sêmen equino (Alvarenga et al., 2017; Alghamdi et al., 2019). A motilidade espermática total apresenta-se mais alta quando o sêmen é criopreservado com baixas taxas de PS (aproximadamente 5%), comparado a altas taxas (10% - 30%) (Alvarenga et al., 2017; Alghamdi et al., 2019). No entanto, Brinsko et al. (2000) sugerem que a presença de pequena porcentagem de PS é necessária para o armazenamento do sêmen e a fertilidade, devido ao seu papel antioxidante. A incubação do espermatozoide equino pós-descongelamento com PS foi capaz de diminuir a fosforilação da tirosina, indicativo de capacitação espermática (Andrade et al., 2008). Além disso, estudos recentes evidenciam que a influência do PS sobre o espermatozoide, seja ela benéfica ou não, depende da composição desse meio, e por consequência, do indivíduo (Menezes et al., 2020; Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022).

2.3 Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que permite não só a criação de bancos de material com alto valor genético, como a sua preservação por longos períodos (Lebedeva et al., 2015),

permitindo o uso de outras biotecnologias (Gibb e Aitken, 2016), o transporte por longas distâncias e menor transmissão de doenças (Buranaamnuay et al., 2009). Contudo, o uso de sêmen congelado equino é limitado, pois sua fertilidade é reduzida e inferior à de outras espécies, como bovinos (Maziero et al., 2019). Existe uma diferença na criotolerância dos espermatozoides entre espécies (Barbas e Mascarenhas 2009; Hezavehei et al., 2018; Ezzati et al., 2020), e dentro da espécie equina também é possível notar uma variação individual (Vidament et al., 1997; Tischner 1979; Al-Essawe et al., 2018; Oddi et al., 2021).

Segundo Miguel-Jimenez et al. (2020) após o descongelamento de sêmen equino a motilidade espermática total fica entre 40 e 60% no máximo, enquanto na espécie bovina a motilidade mínima é de 60%. O sêmen dos garanhões pode ser classificado em alta e baixa congelabilidade, sendo a característica analisada a motilidade espermática pós-descongelamento. Animais com baixa congelabilidade espermática apresentam uma média de motilidade progressiva <20%, enquanto os de alta >50% pós descongelamento (Lançoni et al., 2022). Estima-se que um terço dos garanhões possuem sêmen de baixa congelabilidade, caracterizado pela baixa motilidade e viabilidade pós descongelamento (Hidalgo et al., 2017).

Durante a criopreservação dos espermatozoides de mamíferos, a redução de temperatura de 18 °C a 5°C leva a fase de transição da MP do estado líquido cristalino para o estado de gel (Graham, 1996, Medeiros, 2002). As modificações estruturais da MP podem ser irreversíveis em casos onde a curva de resfriamento não é controlada adequadamente (Sieme et al., 2015), caracterizando choque térmico. Em situações como esta, no pós-descongelamento características como motilidade, sobrevida, metabolismo espermático e capacidade de fecundação podem ser afetadas (Graham, 1996; Squires et al., 1999).

Os espermatozoides também estão sujeitos ao choque osmótico quando criopreservados e descongelados (Contreras et al., 2023), sendo a curva de resfriamento determinante para o dano celular (Oldenhof et al., 2017). Fisiologicamente, ao atingir 0°C formam-se cristais de gelo extracelulares, tornando o ambiente concentrado em relação ao espermatozoide, o que acarreta na desidratação deste (Vidament et al., 2000; Wolkers et al., 2007). Em taxas de resfriamento lentas, essa desidratação é exacerbada e prejudicial à célula espermática (Oldenhof et al., 2017), causando o que é chamado de efeito solução. No entanto, em uma taxa alta de congelamento, o espermatozoide não tem tempo suficiente para perder a água para o meio extracelular hipertônico, podendo ocorrer a formação de gelo intracelular, e morte do espermatozoide (Ricker et al., 2006; Oldenhof et al., 2017; Silva e Monteiro, 2019). Além das curvas de resfriamento adequadas (Silva e Monteiro, 2019), para preservar a integridade e funcionalidade celular durante a criopreservação são utilizados diferentes diluidores, crioprotetores (gema de ovo, glicerol, amidas), agentes antioxidantes, estimulantes de metabolismo e outros (Graham, 1996; Ricker et al., 2006; Nascimento et al., 2015; Alves et al., 2021).

2.4 Diluidores de sêmen

Devido aos danos causados pelo processo de criopreservação é necessário que sejam utilizados diluidores de sêmen com objetivo de manter a qualidade espermática no pós-descongelamento (Coelho e Dias, 2021). O desenvolvimento desses meios envolve tanto a fase de resfriamento quanto a de congelamento (Santos et al., 2018), com foco em minimizar os efeitos deletérios do choque térmico, osmótico e oxidativo, das variações de pH, do crescimento bacteriano e contaminação, além das alterações do metabolismo celular e funcionalidade espermática (Foote et al., 1964; Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Aidar, 2013; Malik et al., 2018; Raheja et al., 2018).

2.4.1 Crioprotetores

Crioprotetores (CP) são substâncias utilizadas no meio diluidor de sêmen que preservam a viabilidade espermática durante os processos de congelamento e descongelamento (Silva e Monteiro, 2019). Eles agem principalmente através da alteração da permeabilidade da MP e do ponto de solidificação da solução, controlando a desidratação da célula espermática nas mudanças de temperatura (Devireddy et al., 2002; Oldenhof et al., 2010; Akhoondi et al., 2011; Xu et al., 2014; Silva e Monteiro, 2019). Eles podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes, de acordo com sua capacidade de atravessar a membrana plasmática (Mckinnon, 1996).

Crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas e hidrossolúveis, que protegem o espermatozoide dos danos causados pela formação de cristais de gelo através da redução do ponto de congelamento da água no interior da célula, evitando também a desidratação excessiva e lise celular (Mazur, 1984; Arakawa e Timasheff, 1985). Os principais utilizados na espécie equina são o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e as amidas (Alvarenga, 2002, Vidament et al., 2009; Aidar, 2013; Swegen et al., 2020).

Os agentes não penetrantes são representados por macromoléculas como as proteínas do leite e gema de ovo, sacarose, glicose, lactose, trealose e outros (McKinnon, 1996). Eles atuam no meio extracelular, controlando a osmolaridade e promovendo a saída da água intracelular de maneira controlada (Oliveira et al., 2013), além de promoverem maior estabilidade da MP do espermatozoide (Amam e Pickett, 1987).

Contudo, quando em concentrações elevadas os crioprotetores se tornam tóxicos ao espermatozoide, diminuindo a sobrevivência deste ao congelamento e afetando a fertilidade do sêmen (Woods et al., 2004; De Vita, 2006). Além da concentração, fatores como o tempo de exposição e o período de contato com as células antes da criopreservação também representam riscos importantes à viabilidade espermática (Watson, 2000; Moore et al., 2006). Em um estudo comparando taxas de resfriamento e crioprotetores, a motilidade progressiva e a viabilidade espermática não apresentaram diferença após resfriamento com taxas entre 5°C/min e 45°C/min, independentemente do CP utilizados (glicerol, dimetil formamida e etilenoglicol; Moore et al., 2006). Entretanto a concentração de 4% de glicerol apresentou pós descongelamento a melhor motilidade total dentre os tratamentos (Moore et al., 2006).

2.4.2 Antioxidantes

A adição de antioxidantes aos diluidores de sêmen tem como objetivo diminuir o estresse oxidativo durante o processo de criopreservação (Baumber et al., 2004). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causa danos à motilidade espermática, a MP, ao DNA e às mitocôndrias dos espermatozoides na espécie equina (Baumber et al., 2001; Baumber et al., 2002; Baumber et al., 2003). Compostos como vitamina E, glutatona, catalase, superóxido dismutase (SOD) e melatonina têm demonstrado efeitos positivos na preservação da motilidade, integridade da membrana e funcionalidade mitocondrial em várias espécies, incluindo equinos (Ball, 2008; Neild et al., 2005). O plasma seminal contém uma variedade de antioxidantes que atuam na neutralização dos efeitos deletérios das EROs (Muiño-Blanco et al., 2008; Papas et al., 2019; Papas et al., 2020; Catalán et al., 2022). Três enzimas principais têm sido descritas no PS equino a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase (GPX/GSR) (Baumber et al., 2005; Papa et al., 2019). As vesículas extracelulares (EVs) presentes no plasma seminal também têm sido alvo de grandes estudos devido seu potencial antioxidante (Du et al., 2016; Xuan et al., 2023; Ribas-Maynou et al., 2025). Estudos indicam que essas vesículas contribuem para a preservação da motilidade, da integridade de membrana e da capacidade antioxidante dos espermatozoides (Du et al., 2016).

2.5 Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (EVs) são estruturas esféricas delimitadas por uma bicamada lipídica que atuam como mediadoras da comunicação intercelular, realizando o transporte de um conteúdo (carga) de uma célula para outra (Théry et al., 2002). Elas são liberadas pela maioria das células do organismo vivo, não possuem núcleo e nem capacidade de replicação (Lötvall et al., 2014). Estudos caracterizaram o conteúdo de EVs em bovinos, murinos, humanos (Thimon et al., 2008; Girouard et al., 2011; Nixon et al., 2019). Existe uma variedade de moléculas e íons que são transportados pelas EVs, como diversas proteínas, lipídios (esfingomielinas), DNA e tipos de RNA, (microRNAs (miRNAs) e fragmentos de mRNA), cálcio, sódio e zinco (Fabiani et al., 1995; Théry et al., 2009; Keerthikumar et al., 2016).

As EVs podem ser classificadas quanto ao seu tamanho, sendo 1) exossomos partículas entre 40–100 nm de diâmetro (Crescitelli et al., 2013), 2) microvesículas entre 50–1000 nm e 3) corpos apoptóticos entre 800 a 5000 nm (Théry et al., 2009; Crescitelli et al., 2013; EL Andaloussi et al., 2013;

Traver et al., 2014). Elas também podem ser nomeadas de acordo com a sua origem, como por exemplos os prostassomos (ou prostatossomos) que são EVs oriundas da próstata, e os epididimossomos oriundos do epidídimo (Colombo et al., 2014). Os prostassomos possuem uma função protetora (Sullivan e Saez, 2013), inibindo a capacitação prematura e a reação acrossômica em humanos (Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998). Isso ocorre devido à composição da membrana rica em colesterol e esfingomiéline dos prostassomos (Arienti et al. 1998), que após a fusão com os espermatozoides promove a diminuição da fluidez da MP espermática. Já o conteúdo dos epididimossomos indica que estes atuam nos processos de aquisição de motilidade, capacidade de fertilização dos espermatozoides e proteção contra EROS em touros (Frenette et al., 2006).

As EVs podem ser produzidas por três principais mecanismos: o primeiro envolve a invaginação da MP e a formação de corpos multivesiculares (MVBs), os quais posteriormente se fundem com a membrana celular, liberando exossomos (Denzer et al., 2000; Laulagnier et al., 2004); o segundo ocorre por meio da brotação (ou protrusão) direta da MP, originando as microvesículas (Willms et al., 2018); e o terceiro e mais comum corresponde à secreção apócrina, onde ocorre liberação das vesículas a partir do destacamento de porções da região apical da célula (Hermo and Jacks, 2002; Nickel 2003), como na figura 3.

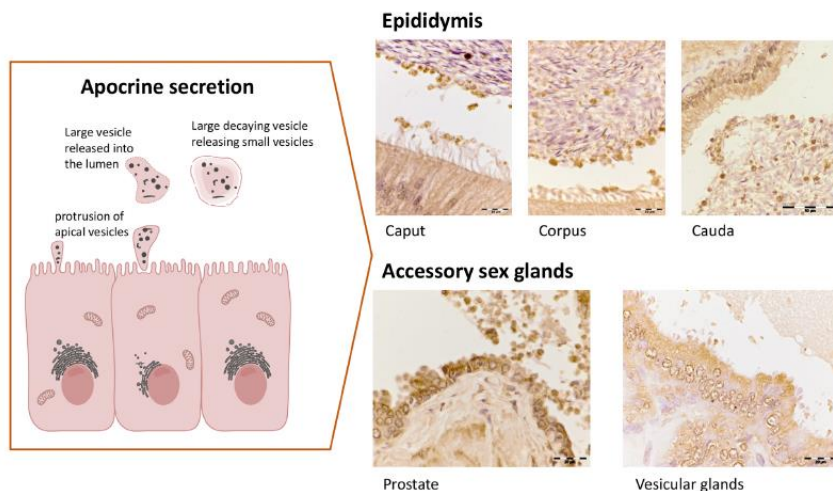


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de secreção apócrina nos segmentos do epidídimo e glândulas sexuais acessórias masculinas: formação de vesículas apicais e a degradação de grandes vesículas liberadas no lúmen com subsequente liberação de vesículas extracelulares. Fonte: Rocca et al., 2022.

Em relação à interação das vesículas com a célula-alvo, podem ser citados diferentes modos: por meio da adesão às moléculas de lipídios e ligantes presentes na superfície da célula receptora (Théry et al., 2009), pela internalização completa da vesícula (Record et al., 2011) ou ainda pela fusão direta da membrana da EV com a MP da célula-alvo (Arienti et al., 1998).

A interação entre as EVs e espermatozoides ocorre durante a passagem do espermatozoide no trato reprodutivo do macho e da fêmea (Roca et al., 2022). Algumas se ligam aos espermatozoides durante a ejaculação, enquanto outras no trato reprodutivo feminino, influenciado por fatores como o pH local (Aalberts et al., 2013; Du et al., 2016). Os prostatossomos têm sua fusão com espermatozoide inibida em ambiente alcalino, o que evita a ativação precoce espermática. Já no pH ácido da vagina, essa fusão é estimulada, propiciando a transferência do conteúdo das vesículas para a célula (Arienti et al. 1998).

As EVs têm sido estudadas em diversas áreas da reprodução animal, como moduladores do desenvolvimento embrionário bovino, agentes reguladores da maturação de gametas e sua interação com células dos cumulus de oócitos bovinos (Da Silveira et al., 2017; Da Silveira et al., 2018; Andrade et al., 2019; Ávila et al., 2019). Atualmente, as EVs têm ganhado destaque como ferramentas para melhoria da fertilidade masculina, devido sua capacidade de modular processos como a capacitação espermática,

influenciar a integridade da MP, motilidade e a viabilidade espermática em diversas espécies como lobos-vermelho e guepardos (Ferraz et al., 2020) humanos (Mahdavinezhad et al., 2022; Kowalczyk e Kordan, 2024), bovinos (Lange-Consiglio et al., 2022) e suínos (Du et al., 2016). As EVs estão envolvidas na retirada de proteínas da membrana plasmática levando a capacitação, reação acrossômica e ligação espermatozoide- oócito ovino (Leahy et al., 2020).

A incubação do sêmen fresco equino com EVs da tuba uterina e útero (400×10^6 EVs/ml) por quatro horas aumentou a hiperativação, a reação acrossômica espermática, e a taxa de fecundação *in vitro* comparado ao grupo controle (44% vs. 0%) (Lange-Consiglio et al., 2022a). A adição de EVs derivadas de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo equino (25 e 50 $\mu\text{g/ml}$) ao sêmen criopreservado aumentou a motilidade total e progressiva, e a integridade de membrana (Sawicki et al., 2024). EVs da tuba uterina de éguas em estro quando incubadas com sêmen fresco equino aumentaram a taxa de reação acrossômica e a hiperativação espermática comparadas as EVs obtidas no diestro e do grupo controle sem EVs (Granier, 2023).

As EVs do PS de humanos e bovinos foram adicionadas ao sêmen congelado aumentando a taxa de fecundação *in vitro* (Mahdavinezhad et al., 2022; Lange-Consiglio et al., 2022b), enquanto que as de garantões foram somente caracterizadas, sendo as de menor tamanho observadas no sêmen de boa congelabilidade (Barranco et al., 2025).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERTS, M., SOSTARIC, E., WUBBOLTS, R., WAUBEN, M. W., NOLTE, E. N., GADELLA, B. M., ... and STORVOGEL, W. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1834, n. 11, p. 2326-2335, 2013.

AIDAR, N. B. Criopreservação de sêmen equino. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., KEITH, R., and WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 583595, 2004.

AL-ESSAWE, E. M., JOHANNISSON, A., WULF, M., AURICH, C., and MORRELL, J. M. Addition of seminal plasma to thawed stallion spermatozoa did not repair cryoinjuries. *Animal Reproduction Science*, v. 196, p. 48-58, 2018.

ALGHAMDI, S.; ATEF-SHEBL, N.; ASLANPOUR, Z.; and BERROU, I. Barriers to implementing antimicrobial stewardship programmes in three Saudi hospitals: Evidence from a qualitative study. *J. Global Antimicrobial Resistance*, v. 18, p. 284-290, 2019.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; and NETO, C. R. Técnicas para o incremento da qualidade do sêmen de garantões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 81-85, 2017.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 1989.

ALVES, N. D. C., DINIZ, S. D. A., VIEGAS, R. N., CORTES, S. F., COSTA, E. D., FREITAS, M. M., ... and LAGARES, M. D. A. Addition of caffeine to equine thawed sperm increases motility and decreases nitrite concentration. *Andrologia*, v. 53, n. 2, p. e13918, 2021.

AMANN RP, and GRAHAM JK. Spermatozoa function. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*, p.715-45, 1993.

AMANN, R. P.; and PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Prac.*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P.; and GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011: 1053-1084.

ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O.; and MARTINS, S.M.M.K. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability? *Reprod Domest Anim*, v.46, p. 682–686, 2011.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; and ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 79-85, 2010.

ANDRADE, G. M., BOMFIM, M. M., DEL COLLADO, M., MEIRELLES, F. V., PERECIN, F., and DA SILVEIRA, J. C. Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture medium. *Molecular Reproduction and Development*, v. 86, n. 8, p. 1067-1080, 2019.

ARAÚJO, E.A.B.; SILVA, L.F.M.C.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; ANDRADE JUNIOR, L.R.P.; and SOUZA, F.F. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. *Veterinária e Zootecnia*, v.24, n.1, p.70-83, 2017.

ARIENTI, G.; CARLINI, E.; POLCI, A.; COSMI, E.V.; and PALMERINI, C.A. Fatty acid pattern of human prostatesome lipid. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 358, n. 2, p. 391-395, 1998

AUGER J. Spermatozoa and sperm structure. In: *Encyclopedia of Reproduction* (2nd ed.), vol. 1, p. 62–67, 2018.

ÁVILA, A. C. F. C. M. D., BRIDI, A., MEIRELLES, F. V., PERECIN, F., and SILVEIRA, J. C. D. Small extracellular vesicles from bovine follicular fluid exposed to low progesterone levels increase PTEN levels in cumulus cells. Abstracts: "Beyond Possible: Remarkable Transformation of Reproductive Biology", 2019.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, v. 10, p. 49-62, 2009.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; and SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BARRANCO, I., SÁNCHEZ-LÓPEZ, C. M., MARCILLA, A., AND ROCA, J. Comparative proteomics of extracellular vesicles subsets isolated from pig seminal plasma. *JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES*, v. 10, n. 1, p. 261-261, 2021

BAUMBER, J. V. O. A., VO, A., SABEUR, K., and BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.

BAUMBER, J., BALL, B. A., GRAVANCE, C. G., MEDINA, V., and DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J., BALL, B. A., LINFOR, J. J., and MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of andrology*, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

BAUMBER, JULIE; BALL, and BARRY A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *American journal of veterinary research*, v. 66, n. 8, p. 1415-1419, 2005.

BELL, M.; WANG, R.; HELLSTROM, W.J.G.; and SIKKA, S.C. Effect of Cryoprotective Additives and Cryopreservation Protocol on Sperm Membrane Lipid Peroxidation and Recovery of Motile Human Sperm. *J. Androl.* 1993.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO SP, CROCKETT EC, and SQUIRES EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, n.1, p.129–136, 2000.

BURANAAMNUAY, K., TUMMARUK, P., SINGLOR, J., RODRIGUEZMARTINEZ, H. and TECHAKUMPHU, M. Effects of straw volume and Equex-STM® on boar sperm quality after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 1, p. 69-73, 2009.

CARLINI, E., PALMERINI, C. A., COSMI, E. V., and ARIENTI, G. Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 343, n. 1, p. 6-12, 1997.

CATALÁN, J.; YÁNEZ-ORTIZ, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; GONZÁLEZ-AROSTEGUI, L.G.; RUBIO, C.P.; YESTE, M.; MIRÓ, J.; and BARRANCO, I. Impact of seminal plasma antioxidants on donkey sperm cryotolerance. *Antioxidants*, v. 11, n. 2, p. 417, 2022.

CHLOPIK, A.; WYSOKINSKA, A. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 55, p. 113-126, 2020

COELHO, R. W. de A.; and DIAS, J. C. O. Freezing equine semen after 24 hours of cooling. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e1831019939, 2021.

COLOMBO, MARINA; RAPOSO, GRAÇA; and THÉRY, CLOTILDE. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 30, n. 1, p. 255-289, 2014.

CONTRERAS, M. J., ARIAS, M. E., FUENTES, F., MUÑOZ, E., BERNECIC, N., FAIR, S., and FELMER, R. Cellular and molecular consequences of stallion sperm cryopreservation: Recent approaches to improve sperm survival. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 126, p. 104499, 2023.

CUNHA, I. C. N. Criopreservação do sêmen de cães. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 144 f, 2002.

DA SILVEIRA, J. C., ANDRADE, G. M., DEL COLLADO, M., SAMPAIO, R. V., SANGALLI, J. R., SILVA, L. A., ... and MEIRELLES, F. V. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PloS one*, v. 12, n. 6, p. e0179451, 2017.

DA SILVEIRA, J. C., DE ÁVILA, A. C. F., GARRETT, H. L., BRUEMMER, J. E., WINGER, Q. A., and BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. *Journal of Endocrinology*, v. 236, n. 1, p. R15-R27, 2018.

DE VITA, B. Biotecnologia e inseminação artificial com sêmen congelado equino. Thesis for degree of master of Science. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

DU, J., SHEN, J., WANG, Y., PAN, C., PANG, W., DIAO, H., and DONG, W. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, v. 7, n. 37, p. 58832, 2016.

EZZATI M, SHANEHBANDI D, HAMDI K, RAHBAR S, and PASHAIASL M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2020.

FABIANI, R., JOHANSSON, L., LUNDKVIST, Ö., and RONQUIST, G. Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *European Journal of Obstetrics 2 Gynecology and Reproductive Biology*, v. 58, n. 2, p. 191-198, 1995.

FERRAZ, M.D.A.M.M.; NAGASHIMA, J.B.; NOONAN, M.J.; CROSIER, A.E.; and SONGSASEN, N. Oviductal Extracellular Vesicles Improve Post-Thaw Sperm Function in Red Wolves and Cheetahs. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 3733

FLORMAN HM, FISSORE RA. Fertilization in mammals. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (4th ed.), vol. 1, p. 149–196, 2015.

FOOTE, R. H.; LEONARD, E. P. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. 1964.

FRENETTE, GILLES; GIROUARD, JULIE; and SULLIVAN, ROBERT. Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biology of reproduction*, v. 75, n. 6, p. 885-890, 2006.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; and BROUWERS, J.F.H.M. Capacitation and acrossomereaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

GERTON GL, VADNAIS ML. Structure of the spermatozoon. In: *Encyclopedia of Reproduction* (2nd ed.), vol. 3, p. 123–128.11, 2018.

GIBB, ZAMIRA; AITKEN, ROBERT J. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. *BioMed research international*, v. 2016, n. 1, p. 9380609, 2016.

GINTHER, O.J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed. Cross Plains: Equiservices, 1992.

GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; and SULLIVAN, R. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International journal of andrology*, v. 34, n. 5pt2, p. e475-e486, 2011.

GRAHAM, JAMES K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 119-130, 1996.

GRANIER, Shelby K. Extracellular vesicles from the equine uterus: uptake by stallion spermatozoa and effect on capacitation parameters. Thesis for degree of master of Science. Colorado State University, 2023.

HERMO, LOUIS; JACKS, DUNCAN. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 63, n. 3, p. 394-410, 2002.

HEZAVEHEI, M., SHARAFI, M., KOUCHESFAHANI, H. M., HENKEL, R., AGARWAL, A., ESMAEILI, V., and SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.

HIDALGO, M., ORTIZ, I., DORADO, J., MORRELL, J. M., GOSÁLVEZ, J., CONSUEGRA, C., ... and CRESPO, F. Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal reproduction science*, v. 185, p. 83-88, 2017.

HÖFNER, L., LUTHER, A. M., and WABERSKI, D. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.220, p.106290, 2020.

KEERTHIKUMAR, S., CHISANGA, D., ARIYARATNE, D., AL SAFFAR, H., ANAND, S., ZHAO, K., ... and MATHIVANAN, S. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of molecular biology*, v. 428, n. 4, p. 688-692, 2016.

KOWALCZYK, ALICJA; KORDAN, WŁADYSŁAW. Evaluation of the effectiveness of the use of exosomes in the regulation of the mitochondrial membrane potential of frozen/thawed spermatozoa. *Plos one*, v. 19, n. 7, p. e0303479, 2024.

LANÇONI, R., CELEGHINI, E. C. C., GONELLA-DIAZA, A. M., JÚNIOR, V. D. G., DE CARVALHO, C. P. T., ZOCCA, G. B., ... and DE ARRUDA, R. P. Relationship between sperm ubiquitination and equine semen freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 57, n. 5, p. 465-472, 2022.

LANGE-CONSIGLIO, A., CAPRA, E., GIULIANI, D., CANESI, S., FUNGHI, F., BOSI, G., ... and CREMONESI, F. Endometrial and oviduct extra-cellular vesicles for in vitro equine sperm hyperactivation and oocyte fertilization. *Theriogenology*, v. 194, p. 35-45, 2022a.

LANGE-CONSIGLIO, A., CAPRA, E., MONFERINI, N., CANESI, S., BOSI, G., CRETICH, M., ... AND GASPARRINI, B. Extracellular vesicles from seminal plasma to improve fertilizing capacity of bulls. *Reproduction and Fertility*, v. 3, n. 4, p. 313-327, 2022b.

LEAHY, T., RICKARD, J. P., PINI, T., GADELLA, B. M., and DE GRAAF, S. P. Quantitative proteomic analysis of seminal plasma, sperm membrane proteins, and seminal extracellular vesicles suggests vesicular mechanisms aid in the removal and addition of proteins to the ram sperm membrane. *Proteomics*, v. 20, n. 12, p. 1900289, 2020.

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; and MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.147-153, 2010.

LEBEDEVA, L. F.; ATROSHCHENKO, M. M.; and BURMISTROVA, S. A. Main factors affecting mare insemination with cryopreserved domestic and foreign sperm. *Сельскохозяйственная биология*, n. 4 (eng), p. 476-485, 2015.

LIMA, R. A. S., OLIVEIRA, R. A., MENDES, C. Q., and JÚNIOR, P. G. Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira. *Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. A produção animal no mundo em transformação*. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012.

LÖTVALL, J., HILL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DI VIZIO, D., GARDINER, C., ... and THÉRY, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, v. 3, n. 1, p. 26913, 2014.

MAHDAVINEZHAD, F., GILANI, M. A. S., GHARAEI, R., ASHRAFNEZHAD, Z., VALIPOUR, J., NASHTAEI, M. S., and AMIDI, F. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 45, n. 2, p. 341-353, 2022.

MALIK, A., JAELANI, A., WIDANINGSIH, N., NI'MAH, G.K. and SASONGKO, N. Effect of different concentration of fish oil in skim milk-egg yolk extenders on post-thawed semen qualities of Kalang swamp buffalo bull. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v. 7, n. 3, p. 139-142, 2018.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C., *Male reproduction and semen*. New York: Springer Verlag, p. 2328, 1981.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. In: *Proceedings of the Theriogenology*, 1999.

MAZIERO, R. R. D., DE FREITAS GUAITOLINI, C. R., GUASTI, P. N., MONTEIRO, G. A., MARTIN, I., DA SILVA, J. P. M., ... and PAPA, F. O. Effect of using two cryopreservation methods on viability and fertility of frozen stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 72, p. 37-40, 2019.

MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Vet*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.

MENEZES TA, BUSTAMANTE-FILHO IC, PASCHOAL AFL, DALBERTO PF, BIZARRO CV, BERNARDI ML, ULGUIM RDR, BORTOLOZZO FP, and MELLAGI APG. Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5 C. *Andrology*, v. 8, n. 6, p. 1907-1922, 2020.

MERKT, H. Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão. Esquema para o exame andrológico. In: *ENCONTRO NACIONAL DE EQÜIDOCULTURA*, 4, 1986, São Paulo, SP. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hipologia, p.33-34, 1986.

MEYERS, S.A. Sperm Physiology. In: SAMPER, J.C. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2.ed. St. Louis: Saunders. Cap 5, p. 45-57, 2009.

MIGUEL-JIMENEZ, S., DEL ALAMO, M. M. R., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., HIDALGO, C. O., PEÑA, A. I., MUÑO, R., ... and MOGAS, T. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*, v. 215, p. 106315, 2020.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, p.403-439, 1997.

NASCIMENTO, J. N., BLUME, H., OLIVEIRA, F. J. G., and OLIVEIRA, R. A. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões mangalarga marchador. *Ciência Animal Brasileira*, v. 16, p. 324-330, 2015.

NIXON, B., DE IULIIS, G. N., HART, H. M., ZHOU, W., MATHE, A., BERNSTEIN, I. R., ... and DUN, M. D. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular 2 Cellular Proteomics*, v. 18, p. S91-S108, 2019.

ODDI, S., CARLUCCIO, A., CIARAMELLANO, F., MASCINI, M., BUCCI, R., MACCARRONE, M., ... and DAINESE, E. Cryotolerance of equine spermatozoa correlates with specific fatty acid pattern: A pilot study. *Theriogenology*, v. 172, p. 88-94, 2021.

OLDENHOF, H., BIGALK, J., HETTEL, C., DE OLIVEIRA BARROS, L., SYDYKOV, B., BAJCSY, Á. C., ... and WOLKERS, W. F. Stallion sperm cryopreservation using various permeating agents: interplay between concentration and cooling rate. *Biopreservation and biobanking*, v. 15, n. 5, p. 422-431, 2017.

OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; MARTINS-FILHO, A.O.; SILVA, M.X.; VARAGO, F.C.; and LAGARES, M.A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.194-200, 2013.

PAPAS, M.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; CATALÁN, J.; BONILLA-CORREAL, S.; GACEM, S.; YESTE, and M.; 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.

PAPAS, M.; CATALAN, J.; BARRANCO, I.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; YESTE, M.; and MIRÓ, J. Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa. *Cryobiology*, v. 92, p. 109-116, 2020.

PAPAS, M.; CATALÁN, J.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; MIRÓ, J.; and YESTE, M. Specific activity of superoxide dismutase in stallion seminal plasma is related to sperm cryotolerance. *Antioxidants*, v. 8, n. 11, p. 539, 2019.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PEDROSA AC, TORRES MA, ALKMIN DV, PINZON JEP, MARTINS SMMK, SILVEIRA JC, and ANDRADE AFC. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. *Theriogenology*, v.174, p.60–72, 2021.

RAHEJA, N., CHOUDHARY, S., GREWAL, S., SHARMA, N. and KUMAR, N. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 6, n. 3, p. 239-245, 2018.

RICKER, J. V.; LINFO, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSTAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; and MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, v. 74, p. 359-365, 2006.

ROCA, J., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., PADILLA, L., LUCAS, X., and BARRANCO, I. Extracellular vesicles in seminal fluid and effects on male reproduction. An overview in farm animals and pets. *Animal Reproduction Science*, v. 246, p. 106853, 2022.

SANTOS, M., SOARES, F., MOREIRA, M. and BEIRÃO, J. Evaluation of different extenders for the cold storage of meagre (*Argyrosomus regius*) semen. *Aquaculture Research*, v. 49, n. 8, p. 2723-2731, 2018.

SAWICKI, S., GURGUL, A., GABRYŚ, J., KIJ-MITKA, B., BOCHENEK, M., KARNAS, E., ... and BUGNO-PONIEWIERSKA, M. Extracellular vesicles obtained from equine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue improve selected parameters of stallion semen after cryopreservation. *Annals of Animal Science*, v. 25, n. 1, p. 189-200, 2025.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, p. 20-26, 2015.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; and BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.

SULLIVAN, ROBERT; SAEZ, FABRICE. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, v. 146, n. 1, p. R21-R35, 2013.

THÉRY, CLOTILDE; OSTROWSKI, MATIAS; SEGURA, ELODIE. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews immunology*, v. 9, n. 8, p. 581-593, 2009.

THÉRY, CLOTILDE; ZITVOGEL, LAURENCE; AMIGORENA, SEBASTIAN. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, v. 2, n. 8, p. 569-579, 2002.

THIMON, V., FRENETTE, G., SAEZ, F., THABET, M., and SULLIVAN, R. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Human reproduction*, v. 23, n. 8, p. 1698-1707, 2008.

TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, n. 27, p. 53-59, 1979.

TORRES MA, PEDROSA AC, NOVAIS FJ, ALKMIN DV, COOPER BR, YASUI GS, FUKUMASU H, MACHATY Z, and ANDRADE AFC. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. *Biol Reprod*, v.106, p.213–226, 2022.

TOSHIMORI, KIYOTAKA; EDDY, EDWARD M. The spermatozoon. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, p. 99-148, 2015.

VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L., LOVE, C. L., GARCIA, M. C., and KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 28, n. 5, p. 709-723, 1987.

VIDAMENT, M., DUPERE, A. M., JULIENNE, P., EVAÏN, A., NOUE, P., and PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; and PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 907-919, 2000.

WARNER, F.D. Crossbridge mechanisms in ciliary motility. In: BOOK, C., GOLDMAN, R.D., POLLARD, T.D., ROSENBAUM, J.L. *Cell Motility*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 891-914, 1976.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WILLMS, E., CABAÑAS, C., MÄGER, I., WOOD, M. J., and VADER, P. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 738, 2018.

WOLKERS, W. F., BALASUBRAMANIAN, S. K., ONGSTAD, E. L., ZEC, H. C., and BISCHOF, J. C. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1768, n. 3, p. 728-736, 2007.

WOODS, E. J., BENSON, J. D., AGCA, Y., and CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, v. 48, n. 2, p. 146-156, 2004.

CAPÍTULO 2

Artigo 1 – para submissão *Andrologia Journal*

***In vitro* evaluation of post-thaw equine semen quality cryopreserved with different concentrations of extracellular vesicles.**

Giovanna Sinigalia Leme Nogueira¹, Ighor Henrique Oliveira Santos¹, Auana Chaves e Resende¹, Cesar Lopes Horta¹, Sophia Dreger Oliveira¹, Larissa Marra Bouzan¹, Natália de Castro Alves¹, Márcio Sobreira Silva Araújo³, Guilherme Mattos Jardim Costa¹, Camila Azzolin de Souza³, Juliano Coelho da Silveira³, Raphael Rocha Wenceslau¹, Monique de Albuquerque Lagares¹

¹ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil ² Centro de pesquisa René Rachou – Fiocruz, Laboratório de diagnóstico e monitoramento de biomarcadores, Belo Horizonte, Brasil

³ Department of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil

Autor correspondente: Giovanna Sinigalia Leme Nogueira, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil.

Email: giovannalemenogueira@gmail.com

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are lipid-bilayer-enclosed particles that carry proteins, lipids, carbohydrates, and miRNAs. In the male reproductive tract, they are present in seminal plasma (SP) and influence sperm capacitation, acrosome reaction, and sperm-oocyte interaction. The aim of this study was to improve the quality of frozen equine semen of six stallions with the addition of SP-derived EVs from a stallion with high progressive motility ($\geq 50\%$). The SP EVs were isolated and preserved in two different vehicles Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) and BotuCrio® equine semen freezing extender. Stallions' semen was frozen with 100×10^6 sperm/ml using BotuCrio® (control), BotuCrio® with 400 and 800×10^6 /ml EVs, and D-PBS without EVs (vehicle control), as well as D-PBS containing 400 and 800×10^6 /ml EVs. After thawing, the samples were analyzed for motility and

kinematic parameters with a computer-assisted sperm analysis system, morphology with a phase-contrast microscope, plasma membrane functionality with a hyposmotic swelling test, plasma membrane integrity, spontaneous acrosome reaction, and mitochondrial membrane potential with a flow cytometer. Data were analyzed using Analysis of variance (ANOVA) and assumption tests (Shapiro-Wilk for normality and Bartlett for homoscedasticity). When appropriate, means were compared using Tukey's test. In cases where assumptions were not met, the Skillings-Mack test was applied, followed by Durbin's test for group comparisons. A probability of $P < 0.05$ was considered significant. As results, the addition of PBS without EVs resulted in a significant reduction of the kinematic parameter beat cross frequency (BCF) ($8,7 \pm 0,3$) in comparison to the control group ($9,5 \pm 0,5$). This may be related to the lack of an energy substrate for sperm in this medium. On the other hand, the addition of EVs did not affect the other sperm motility and kinematic variables and the other evaluated parameters. In conclusion, the tested concentrations of SP-derived EVs did not influence post-thaw sperm quality in equine sperm.

Introduction

Semen cryopreservation is an important biotechnology for preserving genetic material of stallions with high zootechnical value [1]. However, this practice faces challenges related to variability in sperm cryotolerance, which can differ between animals and even between ejaculates from the same individual [2]. In equine, only 25% of stallions produce semen with high freezing capacity (motility $> 40\%$), while 80% fall into the moderate motility range (20 to 40%) or low freezing capacity ($< 20\%$ post-thaw) [3, 4]. The addition of substances, as antioxidants, to the freezing medium to enhance sperm resistance to cryopreservation has been reported in several studies [5-11].

Bioactive particles known as extracellular vesicles (EVs) have been reported for their antioxidant function [12 -14]. EVs have emerged as a potential tool to improve sperm function during and after cryopreservation [15-19]. EVs are particles composed of a lipid bilayer, produced by living cells, lacking a nucleus and replication capacity [20]. They consist of proteins, carbohydrates, lipids, and miRNAs [21], and are present in seminal plasma after ejaculation [22]. In human, EVs play a crucial role in sperm capacitation, acrosome reaction, and sperm-oocyte binding [23]. Their interaction with sperm occurs in both the male and female reproductive tracts, with local factors such as pH influencing this process [13, 24]. EVs from SP increased fresh sperm motility in humans [12], bulls [17], and swine [23]. Moreover, the addition of SP EVs increases the percentage of sperm with normal morphology and reduces apoptosis rate post-thaw in humans [12]. In horses, the incubation of oviduct and uterus EVs combined (400×10^6 EVs/ml) with fresh semen during 4-hour increased acrosomal reaction rate and sperm hyperactivation [25].

Seminal plasma EVs from humans and cattle have been added to frozen semen, increasing the *in vitro* fertilization rate [12, 17], whereas those from stallions have only been characterized, with smaller EVs observed in semen with good freezability [26].

To the best of our knowledge, this study tested for the first time the addition of seminal plasma-derived EVs to freeze stallion semen. Thus, the aim of the present study was to improve the quality of cryopreserved equine semen by adding two concentrations of SP-derived EVs from a stallion with high progressive motility to freeze the semen of other stallions.

Material and Methods

All experimental procedures were performed according to the Brazilian ethical and animal welfare principles for the utilization and care of animals used in research and were approved by the Ethical Committee "Comissão de Ética no Uso de Animais" (CEUA, protocol number 316/2023) at the Federal University of Minas Gerais (UFMG).

Two experiments were conducted 1) Isolation of EVs from the seminal plasma of a stallion with high sperm motility, and 2) *In vitro* evaluation of post-thaw equine semen quality after the addition of different concentrations of EVs. The experiments were performed at the Laboratory of biotechnology and assisted reproduction techniques (BioArtLab), Biomarkers Laboratory at the René Rachou Institute-Fiocruz in Belo Horizonte, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP and private stud farms.

Experiment 1: Isolation of EVs from the seminal plasma of a stallion with high sperm motility.

1. Semen collection and evaluation

To the PS EVs isolation a clinically healthy Mangalarga Marchador stallion, presenting sperm with 50% progressive motility in fresh semen ($\geq 50\%$) and 60% normal morphology ($\geq 60\%$) according to fresh semen characteristics described for stallions in the Manual of Andrology Analysis of the Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Semen was collected using an artificial vagina, and total and progressive motility were evaluated with a bright-field microscopy (100 \times), and the sperm morphology was assessed using phase-contrast microscopy (1000 \times).

2. Plasma seminal extracellular vesicles isolation

Extracellular vesicles (EVs) were isolated by semen ultracentrifugation [27]. After collection, the ejaculate was diluted 1:1 (v:v) with Kenney extender [27] and centrifuged (600 \times g, 10 min). The supernatant was centrifuged twice (4,000 \times g, 20 min) at 4°C. The resulting supernatant was subjected to a final centrifugation (16,000 \times g, 30 min) at 4°C. Finally, the supernatant, containing the EVs of interest, was transferred to Eppendorf-type tubes and frozen until use at -20°C.

For further processing, the supernatant was filtered through a sterile 0.22 μ m syringe filter to remove any remaining large EVs. Subsequently, this fluid was centrifuged twice at 120,000 \times g for 70 minutes (Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter, Brea, California, USA) to isolate small EVs. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the resulting pellets were resuspended in 50 μ l of phosphate-buffered saline (PBS, Gibco BRL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 1 \times ; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , and 2 mM KH_2PO_4) for subsequent use.

3. Characterization and quantification of EVs

The isolated EVs were characterized based on particle size and concentration determined by nanoparticle tracking analysis (NTA), their morphology was analyzed by transmission electron microscopy (TEM), and proteins of vesicles membrane were identified by nano-flow cytometry, as described below.

3.1 Nanoparticle tracking analysis

The isolated EVs were resuspended in 50 μ l of 1 \times PBS free of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Particle size and concentration were measured using a Nanosight instrument (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45, Malvern, United Kingdom). A dilution factor of 1:500 in 1 \times PBS was used. The analysis was performed by capturing five 30-second videos using an sCMOS camera at camera level 15, under a controlled temperature of 37°C. A threshold of five was applied during the analysis.

3.2 Transmission electron microscopy

The isolated extracellular vesicles were diluted in 50 μ L of fixation solution (0.1 M cacodylate; 2.5% glutaraldehyde; 4% paraformaldehyde, pH 7.2–7.4) for 2 hours at room temperature. They were then further diluted in 2 mL of PBS, and the solution was ultracentrifuged again to obtain a pellet enriched with small EVs (120,000 \times g, 70 minutes, 4°C). This pellet was diluted in 20 μ L of PBS and stored at 4°C until further analysis. Sample preparation for TEM analysis was performed by placing it on a pioloform-coated copper grid, which was kept for 5 minutes to allow excess PBS to evaporate. A drop of 2% uranyl acetate was added and left for 3 minutes. The excess was removed using moist filter paper before imaging the samples with a transmission electron microscope (Tecnai G2-20 SuperTwin 200kV - Thermo Fisher / FEI).

3.3 Nano-flow cytometry

For the characterization of EVs by nano-flow cytometry, 10 μ L of the previously isolated sample were incubated with antibodies (Abs) to detect the presence of membrane proteins or proteins related to EV biogenesis. Fluorescently conjugated Abs were used: CD81-FITC (1:10 v/v), CD9-FITC (1:10 v/v), CD63-FITC (1:10 v/v), and a primary antibody, Alix-FITC (1:10 v/v), followed by

incubation with a secondary antibody (Alexa Fluor 448-goat anti-mouse, 1:2000 v/v). As a negative control, an endoplasmic reticulum marker, Calnexin (1:10 v/v), was used to detect possible contamination in the isolate. For the detection of intracellular proteins, such as Alix and Calnexin, permeabilization of the EV phospholipid bilayer was performed prior to antibody incubation, using 0.001% Triton (1:1 v/v) for 15 min at room temperature.

The antibodies were centrifuged at $20,000\times g$ for 30 min at 4 °C to sediment any particles that could interfere with the analysis, and subsequently incubated with the samples for 2 h at room temperature on a shaker. The samples were diluted in 500 μ L of filtered PBS (three times) and analyzed using the Cytoflex instrument (Beckman Coulter, USA). The cytometer was configured to detect nanoparticles according to the wavelength of the fluorophore conjugated to the antibody. Gain values (FSC: 87; SSC: 98; Violet SSC: 100; FITC: 450; PE: 600; ECD: 600; Hoechst: 600; KO525: 600) and threshold values (Violet SSC-H: 500; FITC-H: 600) were adjusted according to the recommendations for size beads (100–300 nm) and the fluorescence of interest (FITC: 525/40; Violet SSC: 405/10). Gating was determined based on the negative control for each antibody (PBS + antibody). For reading standardization, 50 μ L of each sample were acquired in slow flow mode (10 μ L/min).

Experiment 2: *In vitro* evaluation of post-thaw equine semen quality after the addition of different concentrations of plasma seminal EVs.

1. Semen collection and evaluation

Stallion semen was collected using an artificial vagina, and sperm total and progressive motility, vigor, concentration and morphology were microscopically evaluated. Only ejaculates with progressive sperm motility $\geq 50\%$ and normal morphology $\geq 70\%$ were selected. Six Mangalarga Marchador and Quarter Horse breeds stallions (age between 5 and 19 years old) were used. Sperm concentration/ml was determined using a hemocytometer and assessed with bright field microscopy (400 \times). Sperm morphology was evaluated by the wet preparation technique [28], counting 100 sperm per sample using phase-contrast microscopy (1000 \times).

2. Equine semen freezing

Ejaculates were diluted 1:1 (v:v) with BotuSêmen® extender (Biotech Botucatu, Botucatu-SP, Brazil) and centrifuged ($600 \times g$, 10 min). After centrifugation, 90% supernatant was discarded and the pellet sperm concentration per milliliter was calculated. The pellet was resuspended with BotuCrio® freezing extender (Biotech Botucatu, Botucatu-SP, Brazil) to 100×10^6 sperm/ml. To ensure sample uniformity, the treatment volume added to the semen samples was standardized with 50 μ L of treatment to every 2.5 ml semen. To verify the influence of EVs preservation media, SP EVs were isolated and preserved in two different vehicles Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) and BotuCrio® equine semen freezing extender. The stallions' semen was frozen with BotuCrio® extender (control) and with 400 and 800×10^6 /ml EVs. The semen was then distributed into seven groups according to the vehicle and the concentration of EVs 1) Control, 2) PBS without EVs, 3) PBS + 400×10^6 /ml EVs, 4) PBS + 800×10^6 /ml EVs, 5) BotuCrio® without EVs, 6) BotuCrio® + 400×10^6 /ml EVs, and 7) BotuCrio® + 800×10^6 /ml EVs. Semen samples of each treatment were packaged in 0.5 ml straws, sealed, and cooled to 4°C in a refrigerator (1°C/min, 20 min). The straws were laid over the liquid nitrogen vapor for 20 minutes, plunged into it, and stored in a liquid nitrogen tank for subsequent analyses. The semen straws were thawed at 37°C for 30 seconds and the sperm characteristics were evaluated as following.

3. Sperm Motility and Kinematic Analysis

Sperm motility and kinematics were evaluated using a computer-assisted sperm analysis system (CASA, Sperm Class Analyzer, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Spain). An aliquot of 10 μ L from each treatment was diluted in BotuCrio® to 50×10^6 sperm/ml and assessed for total motility (TM %), progressive motility (PM %), curvilinear velocity (VCL, μ m/s), average path velocity (VAP, μ m/s), straight-line velocity (VSL, μ m/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, μ m), beat-cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), linearity (LIN, %), and wobble (WOB, %). Five fields were analyzed in triplicate for each sample. CASA settings were capture rate of 25 images per second;

optics: Ph-; chamber: Makler; scale: obj10x, particle area (in μm^2) $4 < \text{area} < 75$; curvilinear velocity (VCL): $10 < \text{slow} < \text{medium} < 90 < \text{fast} \mu\text{m/s}$; progressive motility $> 75\%$ straightness (STR), circular $< 50\%$ linearity (LIN).

4. Assessment of Plasma Membrane Integrity and Spontaneous Acrosome Reaction

Plasma membrane and acrosome integrity parameters were evaluated with a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using the fluorescent probes Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and Fluorescein Isothiocyanate–Peanut Agglutinin (FITC–PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). Post-thaw semen samples were diluted 20:1 in PBS (250 μl semen: 5 ml PBS). An aliquot of 200 μl of this suspension was stained with FITC–PNA (1.125 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 10 minutes at 37°C . Subsequently, 1 ml of PBS was added, and the sample was stained with PI (1.5 mM) and incubated for an additional 10 minutes at 37°C . Samples were then analyzed using a flow cytometer (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events were recorded per sample, with an acquisition rate of 500 cells per second.

The following sperm categories were observed: PI+/PNA+: non-intact plasma and acrosomal membranes, PI+/PNA–: non-intact plasma membrane and intact acrosome, PI–/PNA–: intact plasma and acrosomal membranes, and PI–/PNA+: intact plasma membrane and non-intact acrosome. Spermatozoa exhibiting spontaneous acrosome reaction were considered PI–/PNA+, while viable spermatozoa without spontaneous acrosome reaction were considered PI–/PNA–.

5. Assessment of Plasma Membrane Functionality

Sperm plasma membrane functionality was evaluated using the hypoosmotic swelling test (HOST) with distilled water, as described by Lomeo and Giambersio [29] and modified by Lagares et al. [30]. A 20 μl semen aliquot was added to 40 μl of distilled water at 37°C (1:2 dilution) and incubated in a water bath (37°C , 5 min). Samples were then analyzed by phase-contrast microscopy (400x), and 200 sperm were evaluated per sample. The percentage of sperm reacting positively to HOST was calculated by determining the proportion of sperm with coiled tails (HOST+) and subtracting the baseline incidence observed in morphological evaluation.

6. Sperm Lipid Peroxidation

Sperm lipid peroxidation was assessed using the fluorescent lipid probe C11-BODIPY581/591 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, USA; Partyka et al., 2011). For analysis, 1 μl of 2 mM C11-BODIPY581/591 in ethanol was added to the diluted samples, followed by incubation at 37°C for 30 minutes in the dark. Subsequently, samples were centrifuged ($500 \times g$, 3 minutes), and the pellet was resuspended in 500 μl of freezing medium. Before flow cytometry reading, the samples were stained with PI and incubated for 5 minutes to assess sperm viability.

7. Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was evaluated by flow cytometry using the fluorescent probes Propidium Iodide (PI, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) and MitoTracker Green FM (Invitrogen M7514, Massachusetts, USA).

An aliquot containing 10×10^6 spermatozoa was diluted in 2 ml of PBS and centrifuged ($500 \times g$, 12 minutes). The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μl of PBS. A pre-warmed (37°C) stock solution of MitoTracker Green FM (final concentration of 20 nM) was added (0.5 μl), and samples were incubated at 37°C for 15 minutes protected from light.

After incubation, samples were diluted with 1 ml PBS, stained with PI (1.5 mM), and incubated for 5 minutes at 37°C . Following staining, sperm were washed twice with 2 ml of PBS and centrifuged ($500 \times g$, 12 minutes). The pellet was resuspended in 1 ml of PBS and analyzed with a flow cytometry (FACScalibur6: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ten thousand events were recorded per sample at a flow rate of 500 cells per second. The analysis of mitochondrial membrane potential was performed based on the fluorescence intensity emitted by the MitoTracker probe. To quantify this parameter, the geometric mean of fluorescence intensity was used.

8. Statistical Analysis

The experimental design was a randomized complete block design, considering each stallion as a block. Each block provided one result for each response variable (motility, morphology, lipid peroxidation level, etc.), resulting in eight data points per variable at the end of the experiment. Statistical analyses were conducted by comparing responses between treatments to draw conclusions regarding improvements in parameters based on treatment.

Analysis of variance (ANOVA) and assumption tests (Shapiro-Wilk for normality and Bartlett for homoscedasticity) were performed. When appropriate, means were compared using Tukey's test. In cases where assumptions were not met, the Skillings-Mack test was applied, followed by Durbin's test for group comparisons when a significant effect was detected. Statistical analyses were conducted using R software v.4.2.3 (R Core Team, 2023), and results were expressed as means \pm standard error. A probability value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The nanoparticle tracking analysis (NTA) revealed a mean particle size of 173 nm, with a mode of 118 nm. The concentration of the isolated sample was 1.7×10^{12} particles/mL, in a final volume of 1.3 mL after isolation.

The morphology of the isolated EVs was evaluated using transmission electron microscopy (TEM). The samples showed a membrane-bound vesicular structures with an approximate diameter of 100 nm, consistent with the typical morphology of EVs (Figure 1).

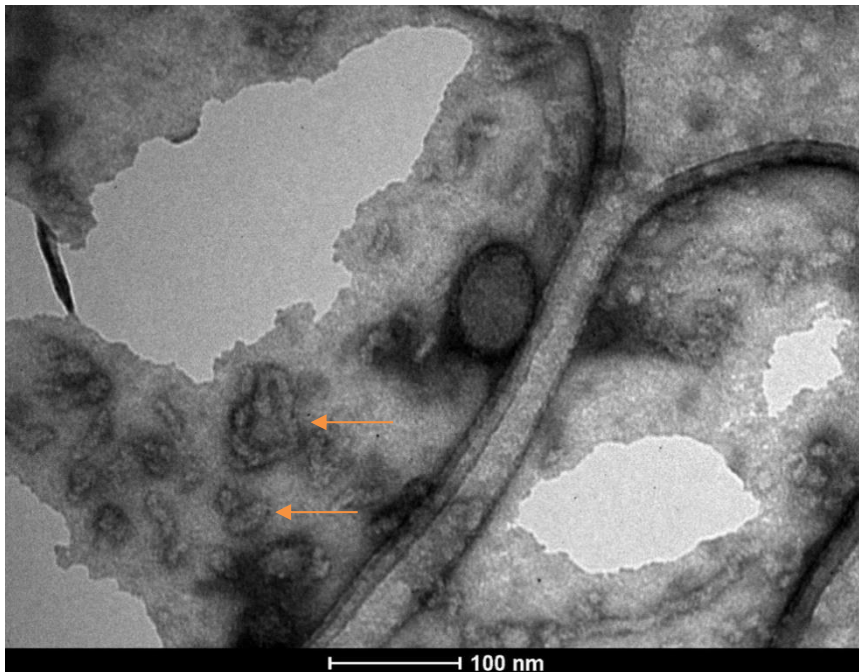


Figure 1. Representative TEM image of isolated EVs (arrow).

As shown in Table 1, a higher number of events per μL was observed in the samples containing EVs compared with the control (PBS + Abs), indicating that the isolation method was effective in obtaining EV-enriched fractions.

Table 1. Number of positive events/ μ L in the different experimental groups for the distinct extracellular vesicle (EV) markers.

Sample	CD9	CD63	CD81	Alix	Calnexin
PBS + Abs	4,28	2,09	3,09	8,37	1,32
EVs + Abs	64,79	86,41	28,75	297,55	5,50

The average sperm characteristics of fresh semen from six stallions were shown in table 2. The ejaculates exhibited 60 to 80% total motility (TM), 50 to 60% progressive motility (PM) and 2 to 3 sperm vigor between (Table 2).

Table 2. Equine sperm characteristics of fresh semen (n=6)

Stallion	% TM	% PM	Vigor (0-5)	Volume (ml)
1	75	50	3	62,5
2	70	50	3	23
3	60	50	2	37
4	80	50	3	12
5	70	50	3	40
6	80	60	3	9

TM = Total motility, PM = Progressive motility

It was observed that the kinematic CASA characteristic beat-cross frequency (BCF) decreased in the PBS without EVs treatment compared to the control group (Table 3, $P < 0.05$). On the other hand, no significant differences were observed among treatments for the other sperm motility and kinematic variables (Table 3, $P > 0.05$).

Table 3. Post-thawed sperm motility and kinematic parameters evaluated by CASA system in different treatments with different concentrations of EVs ($X \pm SE$).

Treat.	TM (%)	PM (%)	RAP (%)	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	ALH (μ m)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	BCF (Hz)
CONT	53,6 $\pm 8,1$	33,1 ± 5	10,9 $\pm 3,9$	60,3 $\pm 2,5$	45,2 $\pm 1,6$	50,8 $\pm 1,8$	2,1 $\pm 0,2$	75,2 $\pm 3,2$	89,0 $\pm 1,4$	84,4 $\pm 2,4$	9,5 $\pm 0,5^a$
PBS	46,7 $\pm 8,1$	26,0 $\pm 5,2$	6,6 $\pm 3,5$	51,1 $\pm 3,9$	38,5 $\pm 2,6$	43,3 $\pm 3,1$	1,9 $\pm 0,2$	75,7 $\pm 3,3$	89,2 $\pm 1,7$	84,7 $\pm 2,2$	8,7 $\pm 0,3^b$
P400	43,5 $\pm 7,5$	24,1 ± 6	8,4 ± 4	52,5 $\pm 4,5$	38,9 ± 3	43,9 $\pm 3,6$	2,0 $\pm 0,2$	74,4 $\pm 2,7$	88,8 $\pm 1,3$	83,7 $\pm 1,9$	9,1 $\pm 0,3^{ab}$
P800	42,1 $\pm 12,3$	26,5 $\pm 9,1$	9,4 $\pm 4,3$	55,4 $\pm 4,3$	41,4 $\pm 2,7$	46,9 $\pm 3,3$	1,9 $\pm 0,2$	75,3 $\pm 2,3$	88,4 $\pm 1,3$	85,1 $\pm 1,4$	8,8 $\pm 0,3^{ab}$
BOTU	44,6 $\pm 9,4$	26,5 $\pm 6,3$	6,9 $\pm 3,4$	55,7 $\pm 4,4$	42,2 $\pm 3,1$	47,4 $\pm 3,5$	2,0 $\pm 0,2$	75,9 $\pm 2,8$	89,0 $\pm 1,6$	85,2 $\pm 1,8$	9,1 $\pm 0,5^{ab}$
B400	46,6 ± 6	26,2 $\pm 4,2$	6,9 $\pm 2,8$	53,1 ± 3	40,2 $\pm 1,9$	45,2 $\pm 2,2$	1,9 $\pm 0,2$	75,9 $\pm 2,3$	88,9 $\pm 1,3$	85,3 $\pm 1,6$	8,7 $\pm 0,4^{ab}$
B800	45,5 $\pm 9,3$	30,8 ± 9	6,2 $\pm 2,6$	53,3 $\pm 4,1$	39,6 $\pm 3,9$	44,8 ± 4	2,0 $\pm 0,2$	73,8 $\pm 4,2$	87,9 ± 2	83,7 $\pm 2,9$	8,8 $\pm 0,4^{ab}$

ab Values with different superscripts between lines differ statistically ($P < 0.05$), Treat.: treatments, CONT = control, P400 = PBS + 400×10^6 /ml EVs, P800 = PBS + 800×10^6 /ml EVs, BOTU = BotuCrio®, B400 = BotuCrio® + 400×10^6 /ml EVs, B800 = BotuCrio® + 800×10^6 /ml EVs, TM: % total motility; PM: % progressive motility; VAP: average path velocity; VSL: straight-line velocity; VCL: curvilinear velocity; BCF: beat-cross frequency; STR: straightness; LIN: linearity; WOB: wobble index.

The percentage of morphologically normal sperm and with defects did not differ among treatments (Table 4, $P > 0.05$).

Table 4. Percentage of sperm morphology with EVs addition ($X \pm SE$).

Treat.	Normal	Bent tail	Proximal CD	Distal CD	Head	Acr	Midpiece	Detached head	Others
CONT	67 ± 5,9	15 ± 2,9	5 ± 1	1 ± 0,4	2 ± 0,6	3 ± 3	6 ± 1,7	2 ± 1	1 ± 0,2
PBS	66 ± 7,1	16 ± 4,2	4 ± 0,8	1 ± 0,2	3 ± 0,8	2 ± 1	8 ± 2	1 ± 0,3	0 ± 0,2
P400	60 ± 6,6	16 ± 3,9	3 ± 1,2	2 ± 0,7	3 ± 1,2	3 ± 3	10 ± 2,2	2 ± 0,5	0 ± 0,2
P800	67 ± 6,6	14 ± 3,5	4 ± 1,1	1 ± 0,5	2 ± 1	2 ± 2	8 ± 2,1	1 ± 0,6	0 ± 0,2
BOTU	65 ± 7,3	18 ± 3,9	5 ± 1,7	1 ± 0,7	2 ± 0,8	2 ± 1	7 ± 1,5	1 ± 0,3	0 ± 0,2
B400	65 ± 8,2	17 ± 4,1	4 ± 1,2	2 ± 0,7	3 ± 0,4	3 ± 2	7 ± 2,3	1 ± 0,3	0 ± 0
B800	67 ± 7,0	16 ± 3,1	2 ± 1	1 ± 0,3	3 ± 1	3 ± 2	8 ± 2,8	1 ± 0,4	1 ± 0,3

Treat.: treatments, CONT = control, P400 = PBS + 400 x 10⁶/ml EVs, P800 = PBS + 800 x 10⁶/ml EVs, BOTU = BotuCrio®, B400 = BotuCrio® + 400 x 10⁶/ml EVs, B800 = BotuCrio® + 800 x 10⁶/ml EVs; Proximal CD = Proximal cytoplasmic droplets, Distal CD = Distal cytoplasmic droplets, Head = Head defects, Acr = acrosome defects, Midpiece = Midpiece defects, Others = teratological defects. There was no statistical difference between the values within rows and columns ($P > 0.05$).

No differences were observed among treatments with or without EVs regarding the percentage of sperm with functional and intact plasma membrane, and with spontaneous acrosomal reaction (Table 5, $P > 0.05$).

Table 5. Sperm percentage with functional (HOST+) and intact plasma membrane, and with spontaneous acrosome reaction (AR) with EVs addition ($X \pm SE$).

Treat.	% HOST +	% intact PM	% AR
CONT	27,0 ± 3	33,9 ± 4,8	2,6 ± 2
PBS	20,2 ± 4,5	31,6 ± 9,1	4,5 ± 3,5
P400	26,2 ± 3,5	34,5 ± 7	1,7 ± 0,7
P800	25,0 ± 3,9	32,8 ± 6	1,0 ± 0,2
BOTU	22,7 ± 3,8	45,9 ± 10,4	3,0 ± 1,8
B400	27,0 ± 3,1	41,7 ± 4,5	1,1 ± 0,2
B800	26,7 ± 5,4	36,0 ± 7,8	1,1 ± 0,4

Treat.: treatments, CONT = control, P400 = PBS + 400 x 10⁶/ml EVs, P800 = PBS + 800 x 10⁶/ml EVs, BOTU = BotuCrio®, B400 = BotuCrio® + 400 x 10⁶/ml EVs, B800 = BotuCrio® + 800 x 10⁶/ml EVs. There was no statistical difference between the values within rows and columns ($P > 0.05$).

The addition of different concentrations of EVs did not affect the percentage of sperm with lipid peroxidation (BODIPY+) and the mitochondrial membrane potential observed with the MitoTracker probe fluorescence intensity (Table 6, $P > 0.05$).

Table 6. Sperm percentage with lipid peroxidation (BODIPY+) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker) ($X \pm SE$).

Treat.	BODIPY +	Mitochondrial membrane potential
CONT	7,1 \pm 3,4	1,7 \pm 0,1
PBS	15,9 \pm 4,2	1,4 \pm 0,1
P400	16,0 \pm 4,6	1,6 \pm 0,1
P800	12,9 \pm 4,1	2,0 \pm 0,2
BOTU	16,8 \pm 4,4	2,1 \pm 0,3
B400	17,5 \pm 6,7	2,0 \pm 0,1
B800	9,0 \pm 2,7	1,9 \pm 0,1

Treat.: treatments, CONT = control, P400 = PBS + 400 x 10⁶/ml EVs, P800 = PBS + 800 x 10⁶/ml EVs, BOTU = BotuCrio®, B400 = BotuCrio® + 400 x 10⁶/ml EVs, B800 = BotuCrio® + 800 x 10⁶/ml EVs; There was no statistical difference between the values within rows and columns ($P > 0.05$).

Discussion

In the present study, the addition of EVs to equine semen during cryopreservation did not influence the sperm quality parameters evaluated, except for the kinematic parameter BCF. This parameter decreased in the PBS group compared to the control (8.7 vs. 9.5 Hz). An increase in BCF was associated with high sperm motility in fresh bull semen [31]. However, in the same study, no significant difference in this variable was observed in frozen semen. Although BCF itself is not considered a direct fertility marker, it can serve as an indicator of sperm hyperactivation, which is characterized by increased ALH and BCF, and decreased STR and LIN. [31, 32, 33]. Since these kinematics parameters were not altered in the present work, the reduction of the BCF in the PBS group suggests a deficiency of energy substrates in this medium [34].

EVs could have a beneficial effect on frozen sperm, as they carry calcium, antioxidants, miRNAs, enzymes, and proteins [35]; however, in the present study, this effect was not observed. One hypothesis is the lack of incubation of EVs with sperm before cooling/freezing. Incubation periods prior to cryopreservation have shown positive outcomes in other studies [12,17,19,36]. When human semen was incubated with SP EVs for one hour at 37 °C before freezing, increased sperm motility, a higher percentage of morphologically normal sperm, and reduced sperm apoptosis were observed [12]. In cattle, incubation of sperm with SP EVs for 45 min before cryopreservation resulted in higher mitochondrial membrane potential and lower malondialdehyde (MDA) levels, indicating an antioxidant effect of EVs [19]. Similarly, cryopreservation of bovine sperm after a 1 h incubation with SP EVs improved sperm motility, as well as in vitro fertilization rates and blastocyst production [17].

Incubation of human fresh semen with SP EVs for two hours improved progressive motility and reduced the spontaneous acrosome reaction rate [14]. On the other hand, in boars, a two-hour incubation did not influence sperm motility, membrane integrity, or viability [13].

To date, only one study has evaluated the cryopreservation of equine semen in the presence of EVs, reporting increased total and progressive motility and higher sperm membrane integrity [36]. Although no incubation time was applied, as in the present study, the EVs were derived from adipose tissue–derived mesenchymal stem cells, differently than our study with SP EVs. Thus, it is possible that the source of EVs influences equine sperm parameters during cryopreservation [36].

Oviduct-derived EVs have also been shown to positively modulate fresh epididymal cat sperm, improving motility and preventing acrosomal exocytosis [15]. Equine fresh semen incubated with oviductal EVs collected during estrus induced higher acrosomal reaction rates and sperm hyperactivation compared with diestrus-derived EVs and the control group [18,25]. When oviductal EVs obtained from peri- and post-ovulatory red wolf females were incubated with post-thaw sperm, enhanced motility and acrosomal integrity were observed [16]. Furthermore, incubation of equine fresh semen with uterine EVs collected during late estrus increased the acrosomal reaction, sperm hyperactivation, and in vitro fertilization rates compared with the control (44% vs. 0%) [25].

In addition, EV concentration may differentially affect sperm function in a dose-dependent manner. Equine sperm cryopreserved with 25–50 $\mu\text{g/mL}$ of adipose tissue–derived mesenchymal stem

cell EVs showed increased total and progressive motility and higher membrane integrity [36]. In humans, supplementation with SP exosomes (0.5–2 mg/mL) and microvesicles (0.25–1 mg/mL) prior to cryopreservation improved post-thaw sperm motility and morphology and reduced apoptosis rates [12]. In cattle, the addition of SP-derived EVs (1.5–2.25 mg/mL) before freezing increased mitochondrial membrane potential and reduced oxidative damage [19]. Thawed red wolf sperm incubated with oviductal EVs from peri- and post-ovulatory bitches (30×10^6 particles/mL) showed increased motility and acrosomal integrity [16]. In the present study, equine semen was supplemented with EV concentrations of 400×10^6 or 800×10^6 EVs/mL; however, direct comparisons with previous studies are challenging due to the use of different units to quantify EV supplementation (particle number versus protein concentration).

Conclusion

In conclusion, the tested concentrations of SP-derived EVs did not influence post-thaw sperm quality in equine sperm

Funding statement

This work was supported by the Laboratory of biotechnology and assisted reproduction techniques (BioArtLab), Biomarkers Laboratory at the René Rachou Institute- Fiocruz in Belo Horizonte, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, University of Minas Gerais (UFMG) and private stud farms.

Acknowledgements

To CAPES for the financial support, [grant-number:88887.847170/2023-00].

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

G.S.L.N., I.H.O.S., A.C.R., C.L.H., S.D.O., L.M.B., N.C.A executed the experiment. M.S.S.A. analysed the samples with a flow cytometer, R.R.W. e C.S.F.O. analysed the data. C.A.S. and J.C.S. performed the TEM and nano-flow cytometry analyses. M.A.L. designed the study.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Giovanna Sinigalia Leme Nogueira <https://orcid.org/0009-0007-9276-1630>

Ighor Henrique Oliveira Santos <https://orcid.org/0009-0002-6859-8654>

Auana Chaves e Resende <https://orcid.org/0009-0001-2837-3285>

Cesar Lopes Horta <https://orcid.org/0009-0004-5466-2277>

Sophia Dreger Oliveira <https://orcid.org/0009-0000-1345-1036>

Larissa Marra Bouzan <https://orcid.org/0009-0006-2169-4330>

Natália de Castro Alves <https://orcid.org/0000-0002-6460-5856>

Márcio Sobreira Silva Araújo <https://orcid.org/0000-0002-7532-3360>

Raphael Rocha Wenceslau <https://orcid.org/0000-0002-0034-1484>

Monique de Albuquerque Lagares <https://orcid.org/0000-0003-1795-6984>

Camila Azzolin de Souza <https://orcid.org/0000-0001-6212-0313>

Juliano Coelho da Silveira <https://orcid.org/0000-0002-4796-6393>


References

- [1] BRANDÃO, ALESSANDRA CUNHA. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondial de espermatozoides criopreservados de equinos. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [2] TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, n. 27, p. 53-59, 1979.
- [3] SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal reproduction science*, v. 107, n. 3-4, p. 276-292, 2008.
- [4] NEUHAUSER, STEFANIE; GÖSELE, PATRICIA; HANDLER, JOHANNES. Postthaw addition of autologous seminal plasma improves sperm motion characteristics in fair and poor freezer stallions. *Journal of equine veterinary science*, v. 72, p. 117-123, 2019.
- [5] OLIVEIRA, C. H. D., VASCONCELOS, A. B. D., SOUZA, F. A., MARTINS-FILHO, O. A., SILVA, M. X., VARAGO, F. C., and LAGARES, M. D. A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal reproduction science*, v. 118, n. 2-4, p. 194-200, 2010.
- [6] FAGUNDES, B., VAN TILBURG, M. F., SOUZA, G. V., CAIADO, J. R. C., BARRETO, M. A. P., and SILVA, J. F. S. Effect of addition of concentrated proteins and seminal plasma low molecular weight proteins in freezing and thawing of equine semen. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 2, n. 1, p. 1, 2011.
- [7] LAGARES, M. A., MARTINS, H. S., CARVALHO, I. A., JUNIOR, C. A., SOUZA, M. R., PENNA, C. F. A. M., ... and HENRY, M. R. J. M. Caseinate protects stallion sperm during semen cooling and freezing. *CryoLetters*, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2012.
- [8] MARTINS, H. S., DA SILVA, G. C., CORTES, S. F., PAES, F. O., MARTINS FILHO, O. A., ARAUJO, M. S. S., ... and LAGARES, M. D. A. Lactoferrin increases sperm membrane functionality of frozen equine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, n. 3, p. 617-623, 2018.
- [9] ALVES, N. D. C., DINIZ, S. D. A., VIEGAS, R. N., CORTES, S. F., COSTA, E. D., FREITAS, M. M., ... and LAGARES, M. D. A. Addition of caffeine to equine thawed sperm increases motility and decreases nitrite concentration. *Andrologia*, v. 53, n. 2, p. e13918, 2021.
- [10] DE ALBUQUERQUE LAGARES, M., DA SILVA, G. C., CORTES, S. F., LUZ, S. B., DE RESENDE, A. C., DE CASTRO ALVES, N., ... and STAHLBERG, R. Does coenzyme Q10 exert antioxidant effect on frozen equine sperm? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 88, p. 102964, 2020.
- [11] LAGARES, M. D. A., DA SILVA, G. C., CORTES, S. F., MOREIRA, F. H. M., NEVES, F. C. D., ALVES, N. D. C., ... and NICOLINO, R. R. L-carnitine added to post-thawed semen acts as an antioxidant and a stimulator of equine sperm metabolism. *Andrologia*, v. 54, n. 3, p. e14338, 2022.
- [12] MAHDAVINEZHAD, F., GILANI, M. A. S., GHARAEI, R., ASHRAFNEZHAD, Z., VALIPOUR, J., NASHTAEI, M. S., and AMIDI, F. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 45, n. 2, p. 341-353, 2022.
- [13] DU, J., SHEN, J., WANG, Y., PAN, C., PANG, W., DIAO, H., and DONG, W. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, v. 7, n. 37, p. 58832, 2016.
- [14] WANG, H., ZHU, Y., TANG, C., ZHOU, Z., WANG, Z., LI, Z., ... and SUN, F. Reassessment of the proteomic composition and function of extracellular vesicles in the seminal plasma. *Endocrinology*, v. 163, n. 1, p. bqab214, 2022.
- [15] FERRAZ, M. D. A., CAROTHERS, A., DAHAL, R., NOONAN, M. J., and SONGSASEN, N. Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 9484, 2019.

- [16] FERRAZ, M.D.A.M.M.; NAGASHIMA, J.B.; NOONAN, M.J.; CROSIER, A.E.; SONGSASEN, N. Oviductal Extracellular Vesicles Improve Post-Thaw Sperm Function in Red Wolves and Cheetahs. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 10, p. 3733, 2020.
- [17] LANGE-CONSIGLIO, A., CAPRA, E., MONFERINI, N., CANESI, S., BOSI, G., CRETICH, M., ... and GASPARRINI, B. Extracellular vesicles from seminal plasma to improve fertilizing capacity of bulls. *Reproduction and Fertility*, v. 3, n. 4, p. 313-327, 2022.
- [18] GRANIER, SHELBY K. Extracellular vesicles from the equine uterus: uptake by stallion spermatozoa and effect on capacitation parameters. 2023. Thesis for degree of master of Science. Colorado State University.
- [19] KOWALCZYK, ALICJA; KORDAN, WŁADYSŁAW. Evaluation of the effectiveness of the use of exosomes in the regulation of the mitochondrial membrane potential of frozen/thawed spermatozoa. *Plos one*, v. 19, n. 7, p. e0303479, 2024.
- [20] LÖTVALL, J., HILL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DI VIZIO, D., GARDINER, C., ... and THÉRY, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, v. 3, n. 1, p. 26913, 2014.
- [21] KEERTHIKUMAR, S., CHISANGA, D., ARIYARATNE, D., AL SAFFAR, H., ANAND, S., ZHAO, K., ... and MATHIVANAN, S. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of molecular biology*, v. 428, n. 4, p. 688-692, 2016.
- [22] BARRANCO, I., SÁNCHEZ-LÓPEZ, C. M., MARCILLA, A., and ROCA, J. Comparative proteomics of extracellular vesicles subsets isolated from pig seminal plasma. *Journal of extracellular vesicles*, v. 10, n. 1, p. 261-261, 2021.
- [23] LEAHY, T., RICKARD, J. P., PINI, T., GADELLA, B. M., and DE GRAAF, S. P. Quantitative proteomic analysis of seminal plasma, sperm membrane proteins, and seminal extracellular vesicles suggests vesicular mechanisms aid in the removal and addition of proteins to the ram sperm membrane. *Proteomics*, v. 20, n. 12, p. 1900289, 2020.
- [24] AALBERTS, M., SOSTARIC, E., WUBBOLTS, R., WAUBEN, M. W., NOLTE, E. N., GADELLA, B. M., ... and STOORVOGEL, W. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1834, n. 11, p. 2326-2335, 2013.
- [25] LANGE-CONSIGLIO, A., CAPRA, E., GIULIANI, D., CANESI, S., FUNGHI, F., BOSI, G., ... and CREMONESI, F. Endometrial and oviduct extra-cellular vesicles for in vitro equine sperm hyperactivation and oocyte fertilization. *Theriogenology*, v. 194, p. 35-45, 2022.
- [26] BARRANCO, I., CATALÁN, J., PARRA, A., MARTÍNEZ-DÍAZ, P., YESTE, M., ROCA, J., and MIRÓ, J. Phenotypic characteristics of seminal extracellular vesicles are related to sperm cryotolerance in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 145, p. 105265, 2025.
- [27] SILVEIRA, CAMILA OLIVEIRA. Formas de CRISP-3, HSP-1 e HSP-2 como candidatas a marcadores de congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. 2017.
- [28] MIES FILHO, A. Tecnologia do sêmen I—Exame e classificação. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. Porto Alegre: Sulina, v. 3, p. 423-458, 1975.
- [29] LOMEIO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm membrane integrity. *Int J Androl*, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.
- [30] LAGARES, M. A., PETZOLDT, R., SIEME, H., and KLUG, E. Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.
- [31] VIGOLO, V., GIARETTA, E., DA DALI, L., DAMIANI, J., GABAI, G., BERTUZZO, F., and FALOMO, M. E. Relationships between biomarkers of oxidative stress in seminal plasma and sperm motility in bulls before and after cryopreservation. *Animals*, v. 12, n. 19, p. 2534, 2022.
- [32] KATZ, DAVID F.; DROBNIS, ERMA Z.; OVERSTREET, JAMES W. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete research*, v. 22, n. 4, p. 443-469, 1989.
- [33] RODRIGUEZ-MARTINEZ, HERIBERTO. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, v. 68, p. S138-S146, 2007.

- [34] PIOMBONI, P., FOCARELLI, R., STENDARDI, A., FERRAMOSCA, A., and ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International journal of andrology*, v. 35, n. 2, p. 109-124, 2012.
- [35] CAMUSSI, G., DEREGIBUS, M. C., BRUNO, S., CANTALUPPI, V., and BIANCONE, L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international*, v. 78, n. 9, p. 838-848, 2010.
- [36] SAWICKI, S., GURGUL, A., GABRYŚ, J., KIJ-MITKA, B., BOCHENEK, M., KARNAS, E., ... and BUGNO-PONIEWIERSKA, M. Extracellular vesicles obtained from equine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue improve selected parameters of stallion semen after cryopreservation. *Annals of Animal Science*, v. 25, n. 1, p. 189-200, 2025.

ANEXO I – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 316/2023
Título do projeto: Avaliação in vitro e in vivo da qualidade do sêmen equino criopreservado
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Monique de Albuquerque Lagares
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado no dia 12/02/2024. Validade: 12/02/2024 à 11/02/2029. Aprovação será homologada na reunião de 19/02/2024.

Belo Horizonte, 15/02/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br