

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

EMERSON LEANDRO FONSECA

FABIANE CRISTINA COSTA DOS ANJOS

ROBERTO RODRIGUES DE NOVAES

## **CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO**

RECIFE - PE

JUNHO/2023

EMERSON LEANDRO FONSECA

FABIANE CRISTINA COSTA DOS ANJOS

ROBERTO RODRIGUES DE NOVAES

## **CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO**

Monografia apresentado ao Centro  
Universitário Brasileiro – UNIBRA, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Medicina Veterinária.

Professor Orientador: José Carlos Ferreira  
da Silva

RECIFE/2023

Ficha catalográfica elaborada pela  
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

F676c Fonseca, Emerson Leandro.  
Criopreservação do sêmen equino / Emerson Leandro Fonseca;  
Fabiane Cristina Costa dos Anjos; Roberto Rodrigues de Novaes. - Recife:  
O Autor, 2023.  
26 p.  
  
Orientador(a): José Carlos Ferreira da Silva.  
  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário  
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.  
  
Inclui Referências.  
  
1. Criopreservação do sêmen. 2. Garanhão. 3. Congelamento. I.  
Dos Anjos, Fabiane Cristina Costa. II. Novaes, Roberto Rodrigues de. III.  
Centro Universitário Brasileiro. - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 619

*Dedicamos esse trabalho a Deus, nossos familiares, aos professores e médicos veterinários amigos que nos apoiaram e incentivaram durante todo o percurso.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de agradecer primeiramente a Deus, por todas as bênçãos e por ter nos concedido força, saúde e coragem para enfrentar todos os obstáculos e dificuldades para finalizar o trabalho.

Agradecer também a todos os familiares, em especial nossos pais, irmãos e companheiros, por ter nos encorajado a não desistir durante toda a nossa caminhada, principalmente nesse processo da monografia, sem eles nada disso seria possível.

A cada profissional que participou do nosso desenvolvimento, seja através de estágios, de amizade, e principalmente por acreditar em nós como futuros colegas de profissão, nossa eterna gratidão, com certeza esse apoio foi essencial durante nossa caminhada até aqui.

Aos professores, agradecer principalmente pelo apoio e por terem dividido todo o conhecimento conosco, tenham certeza que fez muita diferença durante a graduação e será de extrema importância no nosso caminho profissional.

E um agradecimento especial a duas peças importantes na construção do TCC, ao nosso orientador, José Carlos, por toda paciência e trabalho em equipe na construção da nossa Monografia. E a médica veterinária Daniela de Mello, por todo suporte, conhecimento e auxílio durante a realização do trabalho, tenha certeza que sua ajuda foi de grande relevância para nossa conclusão.

*“O segredo de um grande sucesso está no  
trabalho de uma grande equipe.”  
(Murillo Cintra de Oliveira Margarida)*

## CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Emerson Leandro Fonseca

Fabiane Cristina Costa dos Anjos

Roberto Rodrigues de Novaes

José Carlos Ferreira da Silva<sup>1</sup>

**Resumo:** A Indústria equina vem despertando cada vez mais interesse na população e movimentando bilhões de reais por ano, e a necessidade de facilitar a disseminação do material genético de garanhões superiores vem se destacando entre os criadores, por esse motivo a criopreservação do sêmen vem se mostrando cada vez mais importante no manejo reprodutivo, principalmente pela facilidade de ter sêmen de diversos animais sempre disponíveis dentro da propriedade. Pensando no assunto, este trabalho tem como objetivo apresentar a criopreservação do sêmen equino, destacando todo o processo realizado, os principais pontos de atenção no protocolo e a importância desse passo para a equideocultura. O trabalho foi desenvolvido no modelo de revisão bibliográfica, com buscas no SciELO, Google Acadêmico, Periódicos Capes e BDTD. Foi observado a importância de um acompanhamento do manejo reprodutivo e qualidade espermática do garanhão para resultados positivos na criopreservação, além da necessidade de seguir adequadamente todas as etapas de resfriamento e congelamento para obter um sêmen de qualidade e que traga os resultados esperados na inseminação artificial. Sendo assim, a criopreservação, mesmo ainda sendo considerada uma biotecnologia nova, vem demonstrando ser grande aliada na reprodução equina, devido aos grandes benefícios que vem trazendo para a espécie, principalmente pela fácil disseminação do material genético de cavalos importantes, sem desgastar os mesmos.

**Palavras-chave:** Criopreservação do sêmen. Garanhão. Congelamento.

---

<sup>1</sup> Professor da UNIBRA. Doutor em Medicina Veterinária. E-mail: jose.ferreira@grupounibra.com

## CRYOPRESERVATION OF EQUINE SEMEN

Emerson Leandro Fonseca

Fabiane Cristina Costa dos Anjos

Roberto Rodrigues de Novaes

José Carlos Ferreira da Silva<sup>1</sup>

**Abstract:** The equine industry has been arousing more and more interest in the population and moving billions of reais per year, and the need to facilitate the dissemination of genetic material from superior stallions has been standing out among breeders, for this reason semen cryopreservation has been proving to be increasingly important in reproductive management, mainly due to the ease of having semen from different animals always available within the property. Thinking about the subject, this work aims to present the cryopreservation of equine semen, highlighting the entire process performed, the main points of attention in the protocol and the importance of this step for equideoculture. The work was developed in the bibliographic review model, with searches in SciELO, Google Scholar, Periódicos Capes and BDTD. It was observed the importance of monitoring the reproductive management and sperm quality of the stallion for positive results in cryopreservation, in addition to the need to properly follow all the cooling and freezing steps to obtain quality semen that brings the expected results in artificial insemination. Therefore, cryopreservation, even though it is still considered a new biotechnology, has been proving to be a great ally in equine reproduction, due to the great benefits it has brought to the species, mainly due to the easy dissemination of the genetic material of important horses, without wearing them down.

**Palavras-chave:** Semen cryopreservation. Stallion. Freezing.

---

<sup>1</sup> Professor da UNIBRA. Doutor em Medicina Veterinária. E-mail: jose.ferreira@grupounibra.com

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Sistema reprodutor masculino do garanhão.....	14
<b>Figura 2</b> - Equino em manequim artificial (A) e natural (B) para a coleta de sêmen	14
<b>Figura 3</b> - Vagina artificial, modelo Botupharma.....	17
<b>Figura 4</b> - Kit manual para congelamento, modelo Botupharma.....	29
<b>Figura 5</b> - Criopreservação em máquina de congelamento.....	29
<b>Figura 6</b> - Inseminação artificial .....	31
<b>Figura 7</b> - Inseminação artificial utilizando pipeta flexível.....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação do vigor da motilidade espermática .....	18
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	13
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	14
<b>3.1 Anatomia e fisiologia do garanhão</b> .....	14
<b>3.2 Exame Andrológico</b> .....	15
3.2.1 Coleta e análise de sêmen.....	16
<b>3.3 Criopreservação do sêmen equino</b> .....	19
3.3.1 Plasma seminal e centrifugação .....	20
3.3.2 Diluidores de Sêmen .....	20
3.3.3 Crioprotetores.....	20
3.3.3.1 <i>Crioprotetores penetrantes</i> .....	23
3.3.3.2 <i>Glicerol (GLI)</i> .....	24
3.3.3.3 <i>Etilenoglicol (EG)</i> .....	24
3.3.3.4 <i>Dimetilsulfóxido (DMSO)</i> .....	25
3.3.3.5 <i>Amidas</i> .....	25
3.3.3.6 <i>Crioprotetores não penetrantes</i> .....	26
3.3.4 Refrigeração e estabilização do sêmen.....	27
3.3.5 Congelamento .....	28
3.3.6 Descongelamento e análise do sêmen.....	30
<b>3.4 Inseminação artificial com sêmen congelado</b> .....	30
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35
<b>APÊNDICE A – Ficha de avaliação do material completo (3ª AV)</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

Os equinos, desde o início de sua domesticação, estão entre as espécies que mais contribuíram para o desenvolvimento do ser humano (FRANTZ *et al.*, 2020). Os cavalos são vitais para as economias internacional e brasileira, com presença significativa contribuindo para diversos setores, um papel crucial nos esportes equestres, atividades de lazer, corridas, criação e trabalho agrícola (HERRERA *et al.*, 2018; LORD, 2019). Nas áreas rurais, os cavalos auxiliam na agricultura, transporte e criação de gado, aumentando a produtividade e os meios de subsistência rurais. Além disso, os equinos alimentam o crescimento econômico, criam empregos e estimulam indústrias auxiliares (RIOJA-LANG *et al.*, 2020; TOMLJENOVIC *et al.*, 2018).

Diante de toda importância que os equinos apresentam, o melhoramento genético continua sendo um aspecto fundamental para maximizar a eficiência produtiva e reprodutiva desses animais. Além disso, a seleção de animais mais especializados para buscar melhores resultados nos cruzamentos está em alta no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A eficiência reprodutiva dos cavalos melhorou nas últimas três décadas, principalmente devido aos avanços obtidos com a pesquisa científica (ZHAO *et al.*, 2021). No entanto, apesar dos avanços a eficiência reprodutiva bem como a utilização de tecnologias de reprodução assistida mais avançadas, continuam abaixo do potencial que a espécie apresenta (GOMES *et al.*, 2019; KOWALCZYK; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA; KUCZAJ, 2019; MEDICA; LAMBOURNE; AITKEN, 2023).

Diante desse cenário, a inseminação artificial, biotécnica de primeira geração, surge com uma ferramenta eficiente para maximizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos. A inseminação artificial é uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético em cavalos, pois um único ejaculado pode ser usado para inseminar várias éguas. A técnica permite aproveitar ao máximo o potencial genético dos garanhões, facilitando o progresso genético e mantendo a diversidade genética. Além disso, quando associada a criopreservação do sêmen o potencial de utilização é aumentado substancialmente (AURICH *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2018; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab; SALES *et al.*, 2018).

A criopreservação do sêmen equino é uma técnica crucial no campo da ciência reprodutiva equina. Envolve o congelamento do sêmen do garanhão para preservá-lo para uso futuro, permitindo o armazenamento, transporte e inseminação artificial de

éguas mesmo muito tempo após a morte do garanhão ou em situações em que a reprodução imediata não é possível (JHAMB *et al.*, 2023; KADIVAR *et al.*, 2020). De um modo geral, a criopreservação do sêmen envolve a adição de agentes crioprotetores ao sêmen do garanhão, que protegem as células espermáticas de danos durante os processos de congelamento e descongelamento (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2018ab).

Apesar da importância do tema para o progresso da criação de equinos alguns aspectos sobre a criopreservação de sêmen ainda não foram totalmente elucidados e outros merecem ser discutidos novamente. Por esse motivo, uma revisão abrangente sobre a criopreservação de sêmen equino é de grande importância para o avanço do campo da ciência reprodutiva equina. Diante do abordado, objetivou-se apresentar uma revisão bibliográfica a respeito da criopreservação do sêmen equino, destacando todo o processo realizado e sua importância para a equideocultura.

## **2 METODOLOGIA**

Este trabalho foi desenvolvido baseado em uma revisão bibliográfica, utilizando uma abordagem descritiva e qualitativa, com finalidade de compreender todo o processo necessário para a criopreservação do sêmen equino. A técnica utilizada na busca de informações, onde foi feito o levantamento de aproximadamente 95 anais, trabalhos e livros com temas relacionados, entre eles foram selecionados 41 após leitura e triagem para o desenvolvimento do trabalho, durante os meses de março a junho de 2023.

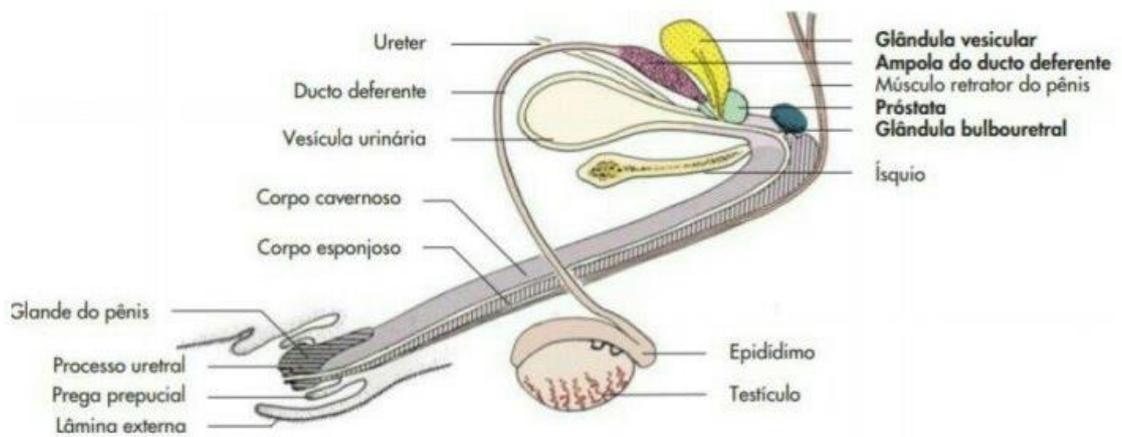
As buscas foram realizadas na Scientific Electronic Library Online (SciELO), Google Acadêmico e na Bases de Dados de Teses e Dissertações (BDTD), no período de 2018 a 2023, em casos de trabalhos fora desse período, foi considerado a importância do tema e dos autores considerados referência no assunto. Para um melhor direcionamento das buscas, foram utilizados os seguintes descritores: "Criopreservação do sêmen", "Garanhão" e "Congelamento". Foram considerados trabalhos em português e em inglês que abordassem o tema proposto, e foram excluídos trabalhos que fugiam da temática escolhida.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Anatomia e fisiologia do garanhão

O sistema reprodutor masculino é composto pelos testículos: local onde os espermatozoides são produzidos; epidídimos: responsáveis pela maturação e capacitação espermática; ductos deferentes: encarregados de conduzir os espermatozoides até a uretra; glândulas acessórias: ampola do ducto deferente, vesícula, próstata e glândula bulbouretral: incumbidos de secretarem o plasma seminal; pênis e glande: são compostos por músculo cavernoso e ainda o prepúcio responsável por envolver a parte exposta do pênis (Figura 1) (OLIVEIRA; MORELLI; COUTINHO, 2019).

**Figura 1** - Sistema reprodutor masculino do garanhão



Fonte: KÖNIG; LIEBICH, 2016.

Como característica própria, os equinos possuem o eixo longitudinal dos testículos praticamente no plano horizontal. Seu desenvolvimento, ainda na vida fetal, ocorre na região sublombar e logo após o nascimento o testículo desce para o escroto. O ejaculado varia tanto no que concerne ao volume quanto em relação a concentração, sendo composto dos espermatozóides e do plasma seminal que propicia um ambiente favorável para os espermatozoides, além de atuar como tampão contra a acidez natural do trato genital feminino (SILVA *et al.*, 2017).

A atividade reprodutiva dos equinos está diretamente relacionada com a durabilidade dos dias e do fotoperíodo, razão pela qual são considerados animais sazonais. No caso dos garanhões, eles entram em inatividade sexual nos dias curtos, quando ocorrem mudanças das características seminais, hormonais e comportamentais. Nos dias mais longos do ano, a produção de melatonina diminui, estimulando a produção e liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, que atua diretamente na glândula pineal e estimula a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), que são responsáveis pela espermatogênese. O FSH atua nas células de Sertoli nutrindo as células germinativas e o LH nas células de Leydig estimulando a produção da testosterona, sendo responsável pelo início da maturação espermática, além do desenvolvimento dos órgãos genitais e das características sexuais masculinas (BETTENCOURT *et al.*, 2018).

### **3.2 Exame Andrológico**

O exame andrológico tem como objetivo avaliar a competência e a saúde reprodutiva do animal analisando a qualidade espermática e as características reprodutivas. O ideal é que esse exame seja anualmente realizado em todos os machos que serão utilizados na reprodução e não apenas quando houver indicações de falha reprodutiva (CRUZ, 2021).

O exame andrológico é constituído da avaliação semiológica geral e específica dos órgãos da reprodução. Esse exame tem início com a anamnese que se baseia na observação do histórico do animal, considerando as condições de nutrição, sanidade e de higiene geral e reprodutiva atual e pregressa. Além disso, é também investigado a existência de alterações genéticas, deficiências e dificuldades durante a cópula e ainda alterações no sistema genital e na qualidade do sêmen (PAPA *et al.*, 2014).

Ressalta-se também que durante a anamnese é importante considerar fatores externos que podem comprometer o desempenho reprodutivo do garanhão. Dentre esses fatores podem ser mencionados alimentação inadequada, deficiência de vitaminas e minerais, manejo inadequado, estresse térmico e ambiental em excesso,

medicações utilizadas de forma exacerbada, rotina de treinamentos intensos, além de lesões e doenças pré-existentes (BARROS, 2021).

No exame físico geral são avaliados os parâmetros dos sistemas respiratório, cardíaco, digestivo e músculo-esquelético, especialmente a coluna e os membros, como os aprumos e sensibilidades no sistema músculo-esquelético. A etapa final do exame é o exame clínico específica do sistema reprodutivo e a avaliação do sêmen (BARROS, 2021).

### 3.2.1 Coleta e análise de sêmen

Existem diversas formas de coletar o sêmen do garanhão que foram sendo aperfeiçoadas com o passar dos anos. Dentre elas podem ser mencionadas a coleta direta da cavidade vaginal ou uterina, coleta em estação com ou sem uso de farmacológicos nos de animais portadores de lesões ou descoordenação motora, vagina artificial e até a coleta direta no epidídimo (OLIVEIRA; MORELLI; COUTINHO, 2019). A Figura 2 ilustra a coleta de sêmen em manequim artificial e natural.

**Figura 2** – Equino em manequim artificial (A) e natural (B) para a coleta de sêmen



Fonte: Própria autoria (2023)

A área onde será realizada a coleta deve ser ampla, limpa e silenciosa com piso antiderrapante e de preferência sem pessoas e animais que comprometam a concentração do animal. A coleta pode ser feita com manequim natural, preferencialmente utilizado uma égua no estro para facilitar a aproximação do garanhão. É importante frisar ser necessário o uso de contenção dos membros posteriores da égua pela segurança dos animais e do profissional durante a coleta. É possível também utilizar manequim artificial, que é um cilindro oco com as extremidades fechadas, envolvido com material acolchoado para proporcionar uma superfície não abrasiva e sem dobras, geralmente com regulagens de altura e angulação para possibilitar possíveis adaptações para diferentes animais. O uso do manequim é mais seguro tanto para o garanhão quanto para o profissional e a equipe de apoio (SILVA et al., 2017).

Atualmente, o método mais utilizado é através da vagina artificial (VA) pela facilidade de manuseio. Existem vários modelos, entre eles os mais conhecidos são os de Hannover, Nishikawa, Missouri, Colorado e Botucatu, que é o modelo brasileiro. A temperatura da VA varia de acordo com o modelo e a preferência do profissional e do garanhão, mas a normalmente utilizada varia entre 45° e 55°C para que no momento da coleta do sêmen a temperatura interna esteja entre 40° e 45°C (Figura 3) (AIDAR, 2013).

**Figura 3** - Vagina artificial, modelo Botupharma



Fonte: BOTUPHARMA, 2023.

O sêmen é analisado em duas etapas, sendo a primeira realizada imediatamente a análise imediata, quando são observadas as características macroscópicas e microscópicas do sêmen. No caso das características macroscópicas afere-se o volume, que varia de acordo com a raça, idade, método de coleta e o tempo de excitação do cavalo; a cor, que em padrões normais varia de branco a acinzentado; o odor deve ser característico e considerado “*Sui-generis*” e o aspecto, que deve ser leitoso. No caso das características microscópicas são avaliadas, entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C com objetiva de 10x. A motilidade consiste na observação do número de espermatozoides móveis e deve ser expressa em porcentagem. Já o vigor é a intensidade do movimento espermático (Tabela 1) classificado numa escala variando de 1 a 5 (OLIVEIRA; MORELLI; COUTINHO, 2019).

**Tabela 1** - Classificação do vigor da motilidade espermática

<b>Escala</b>	<b>Definição</b>
5	Progressivo retilíneo e muito rápido
4	Progressivo retilíneo rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

**Fonte:** OLIVEIRA; MORELLI; COUTINHO, 2019.

A concentração espermática é avaliada pelo número de espermatozoides por mm<sup>3</sup>, sendo realizada com o auxílio da câmara de Neubauer utilizando geralmente a diluição de 1:20, sendo uma gota de sêmen para dezenove gotas de água destilada ou formol salina. O resultado em mm<sup>3</sup> é multiplicado por 1000 para obter o resultado em ml. A morfologia espermática pode ser analisada através do esfregaço corado ou pela preparação úmida e as patologias são classificadas em defeitos menores e maiores. Os defeitos menores não interferem diretamente na fertilidade e os maiores

são relacionados com infertilidade, independentemente da localização. As patologias podem ser encontradas no acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (MACHADO *et al.*, 2023).

### 3.3 Criopreservação do sêmen equino

A criopreservação do sêmen foi realizada pela primeira vez no ano de 1776 com sêmen canino. Essa técnica foi considerada um sucesso a temperatura de  $-79^{\circ}\text{C}$ , todavia, apenas anos depois é que foi registrado o primeiro nascimento proveniente da inseminação com sêmen criopreservado na espécie bovina. A partir desse momento comprovou-se a possibilidade da criopreservação do sêmen de mamíferos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A utilização de sêmen criopreservado apresenta diversas vantagens em relação à monta natural. Dentre as vantagens tem-se a redução do custo na compra de animais com mérito genético importante, o armazenamento do sêmen por longos períodos mantendo a viabilidade espermática, a utilização do sêmen mesmo após a morte do animal ou não conseguir mais realizar suas atividades reprodutivas, além de racionalizar a utilização do reprodutor e minimizar a contaminação de patógenos pela monta natural (DE VITA *et al.*, 2011).

Ainda é interessante comentar sobre os benefícios da adoção da inseminação artificial com sêmen criopreservado. O primeiro deles é relativo ao número de garanhões que pode ser reduzido e proporcionar economia com a manutenção de garanhões no rebanho, bem como com a aquisição de animais, risco da perda dos animais por acidentes e também evitar o transporte da égua e do garanhão. Além disso, facilita o transporte do sêmen para qualquer região do país e proporciona uma melhor utilização dos animais com genética superior (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A criopreservação de células espermáticas conserva o sêmen a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  buscando interromper de modo o metabolismo espermático para prolongar a longevidade das células. A criopreservação é uma biotécnica que permite a longevidade do material genético superior, diminui o risco de raças em perigo de extinção, além de permitir e acelerar a disseminação da genética de reprodutores

qualificados (SANCLER-SILVA; MONTEIRO, 2019) com descendentes de importância em atividades equestres (COELHO; DIAS, 2021).

Apesar de ser uma técnica bastante presente na rotina da reprodução equina, considera-se que cerca de 40 a 50% dos espermatozoides não resistem ao processo de congelação e descongelação. Por essa razão a criopreservação ainda acarreta prejuízos às células espermáticas, como alterações estruturais e funcionais dos espermatozoides, perda da motilidade com consequente diminuição da capacidade de fecundação. Durante o processo de congelação, os crioprotetores podem exercer alguma toxicidade às células espermáticas, pode ocorrer desidratação celular excessiva e ainda formação de cristais de gelo extracelulares e intracelulares (STRAIOTO *et al.*, 2020).

A criopreservação é constituída das etapas de diluição do sêmen, eliminação do plasma seminal, resfriamento, congelamento e descongelamento (FARIA; ATAIDES; OLIVEIRA, 2021). A primeira delas é a refrigeração, na qual as células espermáticas que estão a temperatura ambiente (37°C) são resfriadas até 5°C. Nessa fase podem ocorrer modificações estruturais da membrana espermática, quando deixam o estado líquido cristalino para a forma de gel, conhecida como a transição de membrana (FARIA; ATAIDES; OLIVEIRA, 2021).

### 3.3.1 Plasma seminal e centrifugação

Segundo Faria, Ataídes e Oliveira (2021), o sêmen é constituído pelas células espermáticas e pelo plasma seminal. Os espermatozoides são resultantes da espermatogênese e divididos em três regiões. A cabeça é o local onde se encontra o material genético. A porção intermediária contém as mitocôndrias, onde é gerada a energia e por fim o flagelo, que está associado com a motilidade espermática).

O plasma seminal, também conhecido como líquido seminal, é produzido pelo epidídimo em conjunto com a rede testicular e as glândulas acessórias. É liberado durante a ejaculação em frações através das contrações uretrais e tem como função principal a viabilidade iônica e energética dos espermatozoides (SILVA, 2018).

No líquido seminal são encontradas substâncias que protegem e estimulam os espermatozoides e na sua maioria são proteínas originadas no epidídimo que estão relacionadas com a reestruturação da membrana celular. Além das proteínas são encontradas substâncias que auxiliam na limpeza uterina da égua após a cobertura com auxílio da ocitocina e da prostaglandina que atuam na contração uterina auxiliando também no transporte dos espermatozoides até o local da fecundação (SILVA, 2018).

O plasma seminal é considerado prejudicial para as células espermáticas quando resfriadas ou criopreservadas, por esse motivo é importante que o sêmen seja submetido a centrifugação para minimizar os efeitos negativos do plasma seminal e ainda aumentar a concentração espermática. Para melhorar criosobrevivência dos espermatozoides, o sêmen deve ser centrifugado de 400 a 600 g durante 10 minutos (SIEME *et al.*, 2015).

Após a centrifugação, o sobrenadante é desprezado para ser recuperado apenas o “pellet” de espermatozoides que será ressuspensionado e diluído na proporção de 1:1 para calcular a concentração espermática e definir o volume de final do diluidor para obter a concentração espermática desejada. Concentrações finais entre 25 e  $400 \times 10^9$  de espermatozoides/mL são utilizadas, no entanto, as concentrações de 100 a  $200 \times 10^9$  de espermatozoides/mL tem demonstrado resultados significativos. Logo em seguida é realizado o envase do sêmen em palhetas de 0,25 a 0,50 mL, sendo ideal que cada palheta possua 100 milhões de espermatozoides viáveis (AIDAR, 2013).

### 3.3.2 Diluidores de sêmen

Os diluidores utilizados no sêmen dos garanhões são, na maioria das vezes, a base de leite ou gema de ovo e têm como objetivo principal manter a viabilidade dos espermatozoides por mais tempo. Para tal é necessário que o diluidor proteja as células espermáticas contra o choque térmico e o crescimento bacteriano, mantenha a nutrição dessas células, estabilize a osmolaridade e o pH seminal que são indispensáveis para o equilíbrio cinético dos espermatozoides. Quando o pH e a

osmolaridade não estão de acordo com os valores padrões (pH: 7,7; osmolaridade: 315 mOsm) a motilidade espermática é reduzida. (CAMPOS, 2018).

Segundo Novello (2020), os diluidores são constituídos por açúcares, eletrólitos, tampões, antibióticos, gema de ovo, leite e produtos lácteos. Os açúcares são responsáveis pela produção de ATP, os eletrólitos e os tampões controlam o pH e a osmolaridade e os antibióticos previnem o crescimento bacteriano durante o armazenamento. Já a gema de ovo, o leite e os produtos lácteos atuam principalmente protegendo os espermatozoides contra o choque térmico.

Os diluidores a base de gema de ovo e a base de leite e produtos lácteos protegem os espermatozoides de forma diferente, apesar de fornecer proteção considerada parecidas as células espermáticas. Os diluidores a base da gema de ovo protege através das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), formando uma película protetora na superfície da membrana dos espermatozoides. Já os diluidores a base de leite, além de atuarem na proteção da membrana, também estabilizam elementos proteicos presentes na membrana dos espermatozoides, considerado fundamental nos processos de congelação e descongelação do sêmen equino (NOVELLO, 2020).

Alguns autores descrevem protocolos de como deve ser realizada a preparação e utilização do diluidor para a criopreservação. Desta forma, é importante que a amostra de sêmen a ser congelada seja diluída logo após a colheita e o diluidor deve estar bem homogeneizado e com temperatura próxima aos 37°C, considerado similar a temperatura corporal para fornecer maior conforto térmico para as células espermáticas. Após a diluição na proporção de 1:1, correspondendo as partes iguais do sêmen e do diluidor, o sêmen assim diluído é centrifugado na velocidade de 400 a 600 g durante 10 minutos, em seguida o sobrenadante é desprezado e o "pellet" é ressuspenso com crioprotetor para iniciar a criopreservação do sêmen (CAMPOS, 2018; SIEME *et al.*, 2015).

### 3.3.3 Crioprotetores

Os crioprotetores possuem um papel essencial no processo de congelação do sêmen por exercer proteção das células espermáticas nas temperaturas que impactam a capacidade de fecundação. Suas principais funções são equilibrar o pH e

a osmolaridade do meio, neutralizar toxinas e bloquear o surgimento de bactérias. São fundamentais por impedir o surgimento de cristais de gelo intra e extracelular, mas quando utilizado em excesso se tornam tóxicos e comprometem as taxas de fertilidade (SANCLER-SILVA; MONTEIRO, 2019).

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos, os crioprotetores penetrantes, também conhecidos como intracelulares e os crioprotetores não penetrantes, denominados de extracelulares. Apesar dos mecanismos de ação dos crioprotetores ainda não serem totalmente esclarecidos. Acredita-se que os intracelulares agem através das ligações com a água ou por propriedades coligativas, enquanto os extracelulares preservam através dos efeitos osmóticos. O meio hiperosmótico ao retirar a água das células favorece que o espermatozoide desidrate e reduza as chances de formação de grandes cristais de gelo no interior da célula espermática (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

De um modo geral, o crioprotetor mais utilizado nos protocolos de criopreservação do sêmen equino é o glicerol, entretanto, sua utilização vem sendo relacionada com a baixa motilidade e a redução da fertilidade após o descongelamento (MOREIRA, 2016). Nos equinos estão sendo também utilizadas outras opções de crioprotetores com desempenho superior ao glicerol. A metilformamida, a dimetilformamida e a dimetilacetamida proporcionou maior velocidade na penetração na membrana espermática e reduziu os danos das toxinas crioprotetores, bem como o tempo de equilíbrio (SANCLER-SILVA; MONTEIRO, 2019).

Estudos recentes mostram que o uso associado de crioprotetores garante maior proteção aos espermatozoides quando comparado com a utilização isolada tendo em vista os resultados mais expressivos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

### 3.3.3.1 Crioprotetores penetrantes

As características físico-químicas ideais de um agente crioprotetor intracelular ou penetrante são o baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e, principalmente, uma baixa toxicidade celular (SILVA *et al.*, 2017).

### 3.3.3.2 Glicerol (GLI)

O Glicerol continua sendo o crioprotetor mais difundido e sua descoberta foi de extrema importância para o desenvolvimento da técnica de congelação de sêmen. É formado por íons de hidrogênio na molécula de água e evidencia sua eficácia ao proporcionar a desidratação osmótica e retardar a formação de cristais de gelo (FERREIRA, 2017; NÚÑES, 2023).

Embora que o mecanismo de ação ainda não seja totalmente elucidado, já é conhecido que o glicerol penetra na membrana celular por meio da difusão passiva, mantendo-se na membrana e no citoplasma da célula. Porém, o glicerol pode causar danos e perdas na motilidade e fertilidade por continuar não havendo um consenso sobre a quantidade a ser utilizada em decorrência desse crioprotetor ocasionar efeito tóxico e determinar alterações no citoplasma e perda de proteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

### 3.3.3.3 Etilenoglicol (EG)

O EG possui propriedades bem parecidas com o glicerol, mas com peso menor molecular e maior capacidade penetrante, ocasionando menores danos à membrana plasmática e diminuindo o estresse osmótico da célula. Nos testes com o sêmen equino mostrou grande semelhança com o glicerol, todavia, com melhores resultados quanto a morfologia e a integridade da membrana plasmática e ainda por não interferir na fertilidade (MOREIRA, 2016).

A ação do etilenoglicol não resulta em consequências tóxicas expressivas para a membrana celular, caracterizando-se por ter quatro pares de elétrons isolados e potencial de junção com átomos de hidrogênio em quatro sítios e doação de dois

hidrogênios. Como consequência promove uniões de hidrogênio na membrana espermática (BOHN; VIEIRA; MANDADORI, 2020; FERREIRA, 2017).

#### 3.3.3.4 Dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO é um crioprotetor com características coligativas e ligantes com a água, reduzindo o ponto crioscópico no interior da célula. É bastante utilizado devido a rápida penetração na membrana plasmática, todavia, também é considerado tóxico em virtude de poder danificar e inviabilizar as células espermáticas (BOHN; VIEIRA; MANDADORI, 2020).

Nos equinos, os melhores resultados obtidos ocorreram quando foram utilizados em concentrações de 1 a 9% em conjunto com diluidores a base de lactose, gema de ovo e citrato. A adoção do DMSO associado ao glicerol pode ser também recomendada tendo em vista ter apresentado maior viabilidade espermática após a descongelação (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

#### 3.3.3.5 Amidas

As amidas metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida, possuem três sítios de ligação de hidrogênio ligando-se com a molécula da água, ou seja, a metade em comparação ao glicerol. Por possuírem menor viscosidade e maior solubilidade na água em relação ao glicerol permitem maior permeabilidade da membrana diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (OLIVEIRA, 2020; FERREIRA, 2017).

As adições do grupo metil nas moléculas de acetamida e formamida foram mais efetivas quanto à capacidade crioprotetora de sêmen equino comparadas a moléculas sem o grupo metil. Esse fato sugere que a estrutura da molécula das amidas determina parcialmente sua habilidade crioprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2020). As amidas vêm demonstrando grande sucesso na criopreservação do sêmen equino quando comparadas ao glicerol. Elas garantem uma maior proteção estrutural aos espermatozoides, além de demonstrarem melhores resultados quando utilizado no

sêmen de animais com baixa capacidade de congelação/pós-congelação (MOREIRA, 2016).

### 3.3.3.6 Crioprotetores não penetrantes

Durante o processo de congelação, os espermatozoides são expostos a várias situações adversas de homeostase, podendo ocasionar muitas injúrias celulares. A presença dos açúcares glicose, frutose, lactose, sacarose, rafinose, trealose, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e determinados aminoácidos no meio diluidor alteram as propriedades físicas do processo de congelação da solução (FARIA; ATAIDES, 2021; QUEIROS, 2018; SOUZA; ARAÚJO; TONIOLLI, 2021). Essas substâncias atuam como uma barreira protetora dos espermatozoides no processo de criopreservação impedindo à formação de cristais de gelo intracelular, desidratação excessiva da célula, bem como quanto aos danos osmótico e oxidativo (NÚÑES, 2023; OLIVEIRA, 2020; QUEIROS, 2018).

Os açúcares mais utilizados são a glicose e a frutose que têm a função de gerar energia, manter a pressão osmótica e expandir o volume de água para não atingir o ponto de congelamento e diminuir o acúmulo de sais. Ou seja, desidratar os espermatozoides e impedir a formação de cristais de gelo no interior celular (FERREIRA, 2017; OLIVEIRA, 2020; NÚÑEZ, 2023).

As lipoproteínas são crioprotetores de baixa densidade que proporcionam a manutenção da pressão coloidal no espermatozoide, estabilizando a membrana nos processos de congelamento e descongelamento. Sua ação crioprotetora se localiza na região lipoproteica, evitando os danos do choque térmico decorrente da mudança dos lipídios e das degenerações na membrana em decorrência de temperaturas abaixo do ponto de congelamento. Comumente se utiliza a gema do ovo de galinha, mas também é possível utilizar até ovos de patos. Existe uma alternativa sendo utilizada em outras espécies, como em bovinos e ovinos, que é a lecitina vegetal proveniente da soja (FERREIRA, 2017; NÚÑEZ, 2023).

As proteínas têm a função semelhante às lipoproteínas, como a do ovo. A proteína do leite é a mais utilizada, sendo adicionada aos diluentes para que

desempenhem a função de tampão de bloquear os danos sofridos pela diminuição da temperatura durante a refrigeração (CASTRO *et al.*, 2017; OLIVEIRA 2020).

### 3.3.4 Refrigeração e estabilização do sêmen

Antes do congelamento propriamente dito, o sêmen passa pelo processo de refrigeração para recuperar os espermatozoides dos efeitos danosos da centrifugação e ainda reduzir aqueles que podem ser causados pelo choque frio. A refrigeração é considerada a primeira fase crítica porque os espermatozoides que estavam na temperatura corporal são submetidos a uma queda de temperatura para 5°C. nesse momento a membrana celular sofre modificações estruturais devido passar do estado líquido cristalino para o estado que lembra um gel, fase conhecida como transição da membrana (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Esse resfriamento pode ser ativo ou passivo, sendo que o sistema passivo possui um custo mais baixo, porém, tem como principal desvantagem a inconsistência da curva de refrigeração. Contudo, no caso do sistema ativo esse fato não acontece, uma vez que é realizado de forma automática, em máquinas de congelamento de sêmen. Na refrigeração, a temperatura deve alcançar 5°C para reduzir o metabolismo dos espermatozoides para 10% do original buscando manter a viabilidade do sêmen por mais tempo. Vale lembrar que existem três tipos de curva de resfriamento, como lenta (<0,25°C/min), média (1,0°C/min) e rápida (4,0°C/min) (CASTRO *et al.*, 2017; CARVALHO, 2022).

É importante observar, com muita atenção, à faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração para evitar danos severos às células e no caso dos equinos essa faixa é considerada entre 19°C e 8°C. Se a etapa de resfriamento for realizada de maneira inadequada, os espermatozoides sofrem choque frio que proporciona danos irreversíveis a membrana plasmática e ao acrossoma (CASTRO *et al.*, 2017; CARVALHO, 2022; OLIVEIRA 2020).

É importante lembrar que, ao alcançar a temperatura de 5°C, a água intracelular e extracelular está super-refrigerada, mas ainda não corre risco de cristalização. Ao atingirem as temperaturas de -10°C e -15°C, os cristais de gelo começam a se formar,

razão pela qual a curva de congelamento deve ser lenta para evitar a formação de cristais intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperósmótico (COELHO; DIAS, 2021).

### 3.3.5 Congelamento

O congelamento é considerado a segunda fase crítica do processo de criopreservação do sêmen porque estando numa temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ , tanto o meio extracelular quanto o meio intracelular ainda não estão congelados e as células estão isosmóticas com relação ao meio. Ao continuar diminuindo a temperatura e ao alcançar o intervalo de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$  tem início a formação de cristais de gelo no meio extracelular. Entretanto, o interior da célula ainda não atingiu temperatura suficiente para congelar, conhecida como temperatura super-refrigerada, evitando a formação de cristais de gelo no meio intracelular. Nesse momento tem início o processo de desidratação dos espermatozoides com congelamento do interior da célula espermática. Ao alcançar o ponto eutético de temperatura ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), a fração ainda não congelada vitrifica e os espermatozoides se tornam inertes (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A congelação deve ser lenta o suficiente para garantir que as células espermáticas desidratem o bastante para evitar a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular. Por outro lado, deve ser rápida o suficiente para impedir que os espermatozoides sejam expostos as soluções hiperosmóticas no meio extracelular durante a formação dos cristais (MACHADO *et al.*, 2023).

As curvas de refrigeração e congelação a serem escolhidas variam de acordo com o diluente e o crioprotetor utilizado, além do sistema escolhido para a realização do processo (manual ou automatizado) (Figuras 4 e 5). Como já anteriormente mencionado, a curva de resfriamento do sêmen inicia com a temperatura ambiente ( $37^{\circ}\text{C}$ ) até chegar a  $5^{\circ}\text{C}$ . Ela pode ser lenta ( $<0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), média ( $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) e rápida ( $4,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), mas o tempo deve ser suficiente para que os crioprotetores protejam as células reduzindo os episódios de *cold shock* e danos osmóticos. Já a curva de congelamento mais indicada e utilizada na rotina com aparelhos automatizados é aquela com redução de temperatura em duas etapas. Na primeira a temperatura é aproximadamente reduzida em  $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , entre  $5^{\circ}\text{C}$  e  $-90^{\circ}\text{C}$  e na segunda etapa, um

pouco mais lenta, diminui aproximadamente 12°C/min até atingir -196°C (OLIVEIRA *et al.*, 2020; DE VITA *et al.*, 2019).

**Figura 4** – Kit manual para congelação, modelo Botupharma



Fonte: BOTUPHARMA, 2023.

**Figura 5** - Criopreservação em máquina de congelamento



Fonte: MONTEIRO, 2022.

### 3.3.6 Descongelamento e análise do sêmen

A técnica para a descongelação deve ser compatível com a curva utilizada no protocolo de congelação para garantir maior segurança as células espermáticas e evitar danos irreversíveis aos espermatozoides. A palheta deve ser descongelada em banho-maria de duas formas, sendo a primeira em temperatura de 46°C por 20 segundos e em seguida ser submersa a 37°C por 1 a 2 minutos. Na segunda forma, a descongelação da palheta de ser também realizada em banho-maria a 37°C, mas por 30 segundos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Após retirada do banho-maria, a palheta deve ser limpa e seca para evitar contato de qualquer gota de água com o sêmen envasado. A bolha deve ser direcionada para a lateral lacrada e em seguida o lacre é retirado e o sêmen recolhido para análise da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Para uma dose congelada ser considerada apta para uso deve apresentar motilidade total maior ou igual a 50%, vigor maior ou igual a 3 e a morfologia espermática deve apresentar defeitos menores e defeitos maiores inferior ou igual a 20% e defeitos totais menor ou igual a 40% (AIDAR, 2013; MACHADO *et al.*, 2023).

## 3.4 Inseminação artificial com sêmen congelado

O uso do sêmen congelado é bastante recomendado pela facilidade de ter o sêmen de animais importantes sempre disponível no botijão de nitrogênio na propriedade. Como a fertilidade do sêmen congelado pode ser facilmente comprometida, faz-se necessário acompanhar minuciosamente do ciclo estral da égua (CAMARGO, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Para a inseminação artificial com sêmen congelado é indicado que a égua seja acompanhada durante o crescimento folicular e ao atingir 35mm e edema 3 a ovulação seja induzida. Estudos mostram que após esse procedimento a ovulação ocorre no intervalo de 36 a 48 horas, razão pela qual é recomendado que a égua seja acompanhada a partir de 30 horas e examinada a cada 6 horas com a finalidade de

realizar a inseminação próximo ou ainda até 6 horas após a ovulação (MACHADO *et al.*, 2023).

A concentração de espermatozoides para inseminação mais utilizada com sêmen congelado é de  $800 \times 10^6$  e por esse motivo é indicado o uso de 8 palhetas por inseminação. Todavia, a quantidade de palhetas pode variar de acordo com a motilidade, vigor e a morfologia espermática do sêmen após descongelamento, podendo ser necessário utilizar mais ou menos palhetas por procedimento (MOREIRA, 2010).

Com a rotina do campo nem sempre é possível controlar o ciclo estral da égua, razão pela qual foram desenvolvidas outras metodologias de inseminação artificial (Figura 6). É comprovado que o oócito tem vida útil de 6 horas após sua liberação do folículo e que o sêmen congelado possui viabilidade de 12 horas no trato reprodutor da égua. Por essa razão existe um protocolo para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que oferece a possibilidade de ser realizada duas inseminações com metade da dose indicada para a inseminação. Assim, o no protocolo seriam utilizados intervalos de 36 e 40 horas após a indução do estro e num segundo protocolo as inseminações seriam realizadas em intervalos de 24 e 40 horas após as éguas serem induzidas (MACHADO *et al.*, 2023).

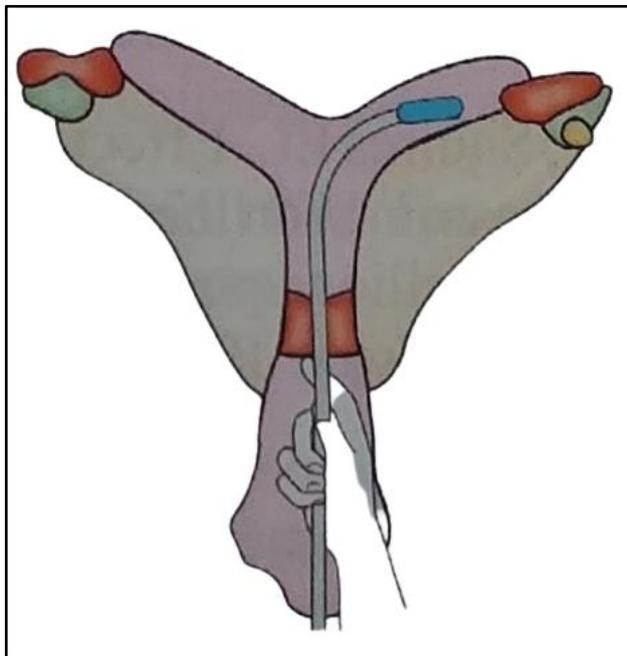
**Figura 6** – Inseminação artificial



Fonte: VETPROFISSIONAL, 2023.

É de grande importância que a inseminação artificial seja realizada com pipeta flexível e que o sêmen seja depositado no corno uterino ipsilateral a ovulação (Figura 7). Nos casos de ovulação bilateral, o indicado é que o sêmen seja preferencialmente depositado no corno uterino de maior dificuldade, geralmente o lado esquerdo, e em seguida direcionar a pipeta para o corno uterino direito com a finalidade de depositar o sêmen em ambos os cornos uterinos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

**Figura 7** – Inseminação artificial utilizando pipeta flexível



Fonte: OLIVEIRA, 2020.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação do sêmen equino é uma técnica valiosa com implicações de longo alcance para a criação de cavalos e manejo reprodutivo. A capacidade de congelar e armazenar o sêmen do garanhão permite a preservação a longo prazo do material genético, permitindo a troca de linhagens valiosas além-fronteiras e facilitando as técnicas de reprodução assistida. No entanto, o sucesso da criopreservação depende de enfrentar os desafios únicos associados ao congelamento e descongelamento do sêmen de cavalo devido à sua sensibilidade.

Pesquisas contínuas e avanços em protocolos de congelamento, crioprotetores e avaliação da qualidade do sêmen são essenciais para melhorar a viabilidade pós-descongelamento e as taxas de fertilidade.

Além disso, revisões abrangentes sobre criopreservação de sêmen equino fornecem informações valiosas sobre o estado atual do campo, destacando áreas para melhoria, e orientando futuros esforços de pesquisa. Com os avanços contínuos e uma melhor compreensão desta técnica, a criopreservação de sêmen equino continuará a desempenhar um papel crucial na preservação e aumento da diversidade genética equina e no apoio a programas de melhoramento bem-sucedidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, N. B. **Criopreservação de sêmen equino**. 2013. x, 42 f., il. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/4774>. Acesso em: 01 mar. 2023.

BARROS, H. A. **Importância do exame andrológico associado a morfologia espermática**: revisão de literatura. Orientador: Mariane Leão Freitas. 2021. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Faculdade de Medicina Veterinária, Distrito Federal, 2021. Disponível em: <https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/1816>. Acesso em: 01 mar. 2023.

BETTENCOURT, E. M. *et al.* **Reprodução em equinos: Manual Prático** - Edição universidade de Évora, 2018. Disponível em: <https://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/26399>. Acesso em: 25 abr. 2023.

BOTUPHARMA. **Kit para congelamento**. 2023. Disponível em: <https://botupharma.com/produto/kit-congelacao/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

BOTUPHARMA. **Vagina artificial equinos**. 2023. Disponível em: <https://botupharma.com/produto/vagina-artificial-equina/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

CAMARGO, C. E. A arte de inseminar éguas com sêmen congelado. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 226-230, 2023. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v47/n2/RB%201070%20Camargo%20p.226-230.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2023

CAMPOS, G. A. **Comparação entre diluentes a base de leite desnatado e caseinato de sódio na refrigeração do sêmen equino**. Orientador: José Antônio Dell'Aqua Junior. 2018. Dissertação (Mestrado no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153081>. Acesso em: 27 mar. 2023.

CASTRO, C. da S. *et al.* **Aplicação da criopreservação em sêmen equino**. *Revista Espacios*, V. 38, n. 48, p. 18 – 30, 2017. Disponível em: <https://www.revistaespacios.com/a17v38n42/a17v38n42p18.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2023

COELHO, R. W. de A.; 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. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9939>. Acesso em: 01 jun. 2023.

CRUZ, T. P. **Revisão de literatura**: Andrológico em equinos e criopreservação de sêmen equino. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Centro Universitário UniFG (BA), Guanambi, 2021. Disponível em:

<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/13582>. Acesso em: 22 mar. 2023.

DE VITA, B. *et al.* Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 770-776, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/YJzGPDCZn6fbZ3DTCzy3tjR/?lang=pt>. Acesso em: 01 jun. 2023.

DE VITA, B. *et al.* Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação. **Ciência Animal Brasileira**, p. 120-125, 2011. Disponível em <http://hdl.handle.net/11449/137117>. Acesso em: 15 abr. 2023.

FARIA, L. C. de; ATAIDES, J. L. de S.; OLIVEIRA, F. J. G. de. Avaliação da longevidade de espermatozoides equinos congelados e descongelados submetidos a centrifugação e filtração / Evaluation of the longevity of freezed and thawed equine spermatozoa subject to centrifugation and filtration. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 62699–62709, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n6-580. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/31862>. Acesso em: 01 jun. 2023.

FERREIRA, H. N. *et al.* Variable inter-assay estimation of sperm DNA fragmentation in stallions classified as good and bad semen freezers. **CryoLetters**, v. 39, n. 1, p. 67-71, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/175800>. Acesso em: 01 jun. 2023.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Freezing of stallion semen: I-In vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved under different glycerol concentrations. **Pferdeheilkunde**, v. 34, n. 1, p. 51-56, 2018b. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/bio.2018.0022> Acesso em: 01 jun. 2023.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Freezing of stallion semen: In vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved using different semen extenders. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 6, p. 439-443, 2018a. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/bio.2018.0022> Acesso em: 01 jun. 2023.

FRANTZ, L. A. F. *et al.* Animal domestication in the era of ancient genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 8, p. 449-460, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265525/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GOMES, G. M. *et al.* Can sperm selection, inseminating dose, and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares?. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 43-47, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080618305677>. Acesso em: 01 jun. 2023.

HERRERA, C. *et al.* Assisted reproduction techniques in horses—clinical applications by different programs around the world. **Pferdeheilkunde**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2018.

Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183029187>. Acesso em: 01 jun. 2023.

JHAMB, D. *et al.* Freezability and Fertility Rates of Stallion Semen Supplemented With Trehalose in Lactose Extender. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 126, p. 104293, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36958410>. Acesso em: 15 abr. 2023.

KADIVAR, A. *et al.* Effects of cryopreservation on stallion sperm protamine messenger RNAs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 3, p. 274-282, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31885108>. Acesso em: 27 abr. 2023.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos Animais Domésticos-: Texto e Atlas Colorido**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

KOWALCZYK, A.; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E.; KUCZAJ, M. Factors influencing the popularity of artificial insemination of mares in Europe. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 460, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/7/460>. Acesso em: 01 jun. 2023.

LORD, R. The equine industry: Competing beliefs, change and conflict. **Muma Business Review**, v. 3, p. 099-120, 2019. Disponível em: <http://pubs.mumabusinesreview.org/2019/MBR-2019-03-09-099-120-Lord-EquineIndustry.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2023.

MACHADO, W. M.; BRITO, T. M.; SANTANA, L. R.; KERSUL, M. G.; SNOECK, P. P. das neves. Sêmen equino refrigerado com diluidor quimicamente definido contendo lecitina de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 2743–2754, 2023.

MEDICA, A. J.; LAMBOURNE, S.; AITKEN, R. J. Predicting the Outcome of Equine Artificial Inseminations Using Chilled Semen. **Animals**, v. 13, n. 7, p. 1203, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/7/1203>. Acesso em: 01 jun. 2023.

MONTEIRO, V. de A. **Manejo reprodutivo em equinos**. 2022. 46 f. Relatório (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2022. Disponível em: <http://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/4938>. Acesso em: 01 jun. 2023.

MOREIRA, A. R. N. **Criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador em diluidores com diferentes meios crioprotetores associados ou não à antocianina**. 2016. 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9285>. Acesso em: 01 jun. 2023.

MOREIRA, J. C. da G. de A. **Inseminação artificial em éguas: estudo da utilização de uma dose reduzida de sêmen congelado em diferentes locais de deposição**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/2623> Acesso em: 01 jun. 2023.

OLIVEIRA, G. C. de *et al.* Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 37, n. 1, p. 23-28, 2013. Acesso em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-8194>. Disponível em: 05 maio de 2023.

OLIVEIRA, S. N. de. **Efeito do glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado equino**. Orientador: Frederico Ozanam Papa. 2020. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/192458>. Acesso em: 10 maio de 2023.

OLIVEIRA, S. N. de. *et al.* **Biotecnologia da congelação do sêmen equino. Reprodução de Garanhões**. Organizador: Frederico Ozanan Papa. Editora MedVet, 1ª edição, São Paulo, SP, 2020.

OLIVEIRA, V. de S.; MORELLI, K. G.; COUTINHO, G. T. R. M. Princípios básicos da manipulação, análise, e envio do sêmen equino. **Pubvet**, [S. l.], v. 13, n. 10, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n10a430.1-9. Disponível em: <http://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/753>. Acesso em: 01 jun. 2023. PAPA, F. O. *et al.* **Manual de Andrologia e manipulação de sêmen equino**. 2014. Disponível em: <https://botupharma.com/download/Andrologia.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2023.

QUEIROS, A. F. de. **Avaliação do efeito das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFPB, Areia, Paraíba, 2018. Acesso em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/15424>. Disponível em: 01 jun. 2023.

RIOJA-LANG, F. C. *et al.* Determining a welfare prioritization for horses using a Delphi method. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 647, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/647>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SALES, F. A. B. M. *et al.* Freezing of Stallion Semen: In Vitro and In Vivo Evaluation of Sperm Motility and Acrosin Activity in Frozen-Thawed Semen with Addition of Post-Diluent Extenders. **CryoLetters**, v. 39, n. 6, p. 401-407, 2018. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2018/00000039/00000006/art00009>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SIEME, H. *et al.* Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 11-14, 2015. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153219770>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SILVA, L. T. da *et al.* Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: **Encontro Anual da Biofísica**, Recife-PE, Brasil, 2017. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/168226/1/Marciane-2017.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SOUZA, W. L. de; ARAÚJO, L. R. S.; TONIOLLI, R. CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOPROTETORES NA PROTEÇÃO DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 76–92, 2022. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9359>. Acesso em: 27 mar. 2023.

TOMLJENOVIĆ, R. *et al.* Horse Riding Tourism–Definitional Conundrum. In: **4th International Rural Tourism Congress, Congress Proceedings**. 2018. p. 278-287. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193386753>. Acesso em: 01 jun. 2023.

VET PROFISSIONAL. **Reprodução equina**. Disponível em: <https://www.vetprofissional.com.br>. Acesso em 01 jun. 2023.

ZHAO, Q. *et al.* Equine chorionic gonadotropin pretreatment 15 days before fixed-time artificial insemination improves the reproductive performance of replacement gilts. **Animal**, v. 15, n. 12, p. 100406, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731121002494>. Acesso em: 01 jun. 2023.

## APÊNDICE A – Ficha de avaliação do material completo (3ª AV)

		<b>TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – MONOGRAFIA</b> <b>FICHA DE AVALIAÇÃO – DEFESA (TCC   3AV)</b>		
Nome do orientador: <b>IBGM IBS</b>		Curso:		
Nome do(s) discente(s):				
Título do trabalho:				
Conceito atribuído pelo orientador:		<b>Conceito do grupo - Construção por etapas da monografia</b>		
		sim	não	
Conceito 1 – do orientador (desenvolvimento das etapas até a 1ªAV): Levantamento bibliográfico e esboço do manuscrito				
Conceito 2 – do orientador (desenvolvimento das etapas até a 2ªAV): Produção de 75% do manuscrito				
Conceito 3 – do orientador (desenvolvimento das etapas até a 3ªAV): Produção de 100% do manuscrito, com no mínimo de 15 dias corridos, antes da apresentação				
<b>DIMENSÃO 1 (versão final da Monografia): PRODUÇÃO DO MANUSCRITO</b>		<b>Nota máxima</b>	<b>NOTA (GRUPO)</b>	
Relevância da temática		1,0		
Introdução		1,5		
Objetivo		0,5		
Metodologia		0,5		
Desenvolvimento		1,5		
Considerações finais		1,0		
Referências		1,0		
Linguagem clara, objetiva, imparcial, coerente e adequação ortográfica		1,5		
Normatização do trabalho (formatação e normas técnicas)		0,5		
Cumprimento dos prazos na entrega do manuscrito		1,0		
<b>Total (Dimensão 1)</b>		<b>10,0</b>		
<b>DIMENSÃO 2 (versão final da Monografia): COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA</b>		<b>Nota máxima</b>	<b>ALUNO1</b>	<b>ALUNO2</b>
Qualidade e conhecimento do manuseio dos recursos audiovisuais		1,5		
Postura adequada		1,5		
Tempo de exposição (20 a 30 minutos)		1,5		
Correlação da temática com o conteúdo exposto		1,5		
Desempenho na arguição		2,0		
Domínio do conteúdo na apresentação		2,0		
<b>Total (Dimensão 2)</b>		<b>10,0</b>		
<b>NOTA FINAL</b>				

**Considerações sobre a monografia:**

**Data:**

Assinatura do Orientador e de cada avaliador (versão final uma ficha para cada membro):