UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DE JEQUITINHONHA E MUCURI
Instituto de Ciências Agrárias
Medicina Veterinária

Deise Ane Oliveira Silva

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE EQUINOS: uma revisão sistemática

Unaí
2023

Deise Ane Oliveira Silva

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE EQUINOS: uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profª. Drª. Jeanne Broch Siqueira

Unaí
2023

Deise Ane Oliveira Silva

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE EQUINOS: uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profª. Drª. Jeanne Broch Siqueira

Data de aprovação: 13/07/2023

Documento assinado digitalmente
JEANNE BROCH SIQUEIRA
Data: 16/07/2023 19:19:45-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Dra. Jeanne Broch Siqueira
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Documento assinado digitalmente
JENEVALDO BARBOSA DA SILVA
Data: 17/07/2023 19:06:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Documento assinado digitalmente
GETULIO NEVES ALMEIDA
Data: 18/07/2023 16:51:45-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

MSc Getúlio Neves Almeida
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Documento assinado digitalmente
FERNANDO SILVA RAMOS
Data: 17/07/2023 19:23:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

M. V. Fernando Silva Ramos

Unaí
2023

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Evangelista, que me
ensinou a amar os animais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me permitir amar e cuidar dos animais.

Aos meus pais e minha base, Mª dos Anjos e Carlito, obrigada por todo apoio e confiança. Sei que isso lhes custou muitos momentos de saudade. Essa conquista é de vocês!

Às minhas irmãs Ana Carla e Laura Ester, por dividirem os momentos de angústia e saudade e por sempre me incentivarem a conquistar os meus sonhos. Ao meu sobrinho Rafael, pela alegria em suas conquistas.

À Rômulo, meu companheiro de todos os dias, obrigada por dividir todas as alegrias e tristezas ao longo desta caminhada. É uma alegria dividir mais esta conquista com você.

Aos amigos e amigas que conquistei. Ao meu amigo Tiago, por dividir tristezas e alegrias da vida durante todos esses anos, conta comigo sempre. À Tales, Akuita e Lauany, por todos os momentos que dividimos, vocês me acolheram como família. À Jéssica, a aluna que se tornou grande amiga, obrigada por ser sempre tão gentil. À Alessandra, pela amizade e companheiro neste último ano. À Igor, Danilo, Mayara, Matheus, Kauê e Léo, pela amizade e por dividir conquistas e angústias. Ao meu amigo e Médico Veterinário Ivan, por sempre apoiar e contribuir para minha carreira profissional. À minha amiga Andreia, por dividir conquistas e dificuldades para chegar aqui.

À minha orientadora, Profª. Dra. Jeanne Broch Siqueira, por todos os ensinamentos na profissão e na vida, por sempre ter solução para os problemas e pela elegância nas palavras que precisam ser ditas.

Aos componentes desta banca, Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa, Msc. Getúlio Neves e Médico Veterinário Fernando Silva, por contribuírem e engrandecerem este trabalho.

Aos Professores e ao Instituto de Ciências Agrárias – ICA por todo o aprendizado e crescimento profissional.

Muito obrigada.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia no processo de criopreservação do sêmen equino, a partir do uso, combinação e concentração do crioprotetor e diluente escolhido, por meio de uma revisão sistemática. Esta revisão baseou-se no método PRISMA e para a seleção dos artigos foram utilizadas as bases de dados PubMED, Scielo, Scopus e *Web of Science.* Buscou-se por artigos publicados nos últimos cinco anos, por meio da combinação de termos relacionados à espécie, sêmen congelado, método de coleta, diluente e crioprotetor, associados a boleadores OR e AND. Após a triagem, foram escolhidos os artigos que abordavam o processo de criopreservação em garanhões, que discutiam o uso de diluentes e/ou crioprotetores, publicados em inglês ou português, que apresentavam texto completo disponível e não eram revisão de literatura. A partir da leitura dos artigos encontrados, dezoito foram selecionados para esta revisão, dos quais onze artigos discutiam o uso de diluentes e sete artigos o uso de crioprotetores. Após a leitura completa destes artigos, foram extraídos dados referentes ao número de garanhões usados como amostra, número de ejaculados ou epidídimos avaliados, idade, raça, método de coleta, diluente e/ou crioprotetor e parâmetros seminais de motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal. A escolha, a concentração e combinação do diluente e/ou do crioprotetor influenciaram nas variáveis espermáticas analisadas pós-descongelamento. Os diluentes mais utilizados e com melhores resultados de parâmetros seminais, foram o INRA 96 e o BotuCrio. O BotuCrio registrou melhores resultados quando comparado ao BotuSêmen, Merk, INRA 82 modificado e sacarose [25mM]. O BotuCrio suplementado com gema de ovo, também registrou melhores resultados que o suplementado com LDL. Os diluentes a base de gema de ovo, glicerol e amidas, apresentaram melhores resultados que os diluentes a base de leite, glicerol e amidas. Com relação aos crioprotetores, observou-se melhores resultados ao utilizar sacarose em concentrações de [0,15M, 0,30M, 20mM, 50mM e 100mM] e trealose na concentração de [0,15M]. O uso da trealose e lactose em amostras epididimárias resultou em melhores parâmetros que para o sêmen ejaculado. O contrário, se observou ao utilizar a lactose. A utilização de glicerol em concentrações de 2%, 3% e 5% registrou melhores parâmetros, assim como a combinação de glicerol 2,5% e dimetilformamida 2,5% ou dimetilformamida 5% de forma isolada. O contrário, ocorreu ao se associar glicerol e EDTA. Nesse sentido, faz-se necessário pesquisas que avaliem o uso do INRA 96 em comparação ao BotuCrio e que avaliem o uso do BotuCrio suplementado com gema de ovo. Assim como, deve-se avaliar o uso de sacarose ou trealose, nas concentrações descritas, em combinação com dimetilformamida 2% e

5% e/ou em associação com glicerol 2%, 3% e 5%. Além disso, faz-se necessários estudos que avaliem a influência de fatores como o método de coleta do sêmen, qualidade seminal, idade e raça no sucesso da criopreservação.

Palavras-chave: garanhão, diluente, crioprotetor.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effectiveness of the cryopreservation process of equine semen, based on the use, combination and concentration of the chosen cryoprotectant and diluent, through a systematic review. This review was based on the PRISMA method and the PubMED, Scielo, Scopus and Web of Science databases were used to select the articles. Articles published in the last five years were searched by combining terms related to the species, frozen semen, collection method, diluent and cryoprotectant, associated with OR and AND booleans. After screening, articles were chosen that addressed the cryopreservation process in stallions, that discussed the use of diluents and/or cryoprotectants, published in English or Portuguese, that had full text available and were not literature reviews. From the reading of the articles found, eighteen were selected for this review, of which eleven articles discussed the use of diluents and seven articles the use of cryoprotectants. After thoroughly reading these articles, data were extracted regarding the number of stallions used as sample, number of ejaculates or epididymides evaluated, age, breed, collection method, diluent and/or cryoprotectant, and seminal parameters of total and progressive motility, plasma membrane integrity and acrosomal membrane integrity. The choice, concentration and combination of diluent and/or cryoprotectant influenced the sperm variables analyzed post-thawing. The most commonly used diluents with the best results for seminal parameters were INRA 96 and BotuCrio. BotuCrio recorded better results when compared to BotuSêmen, Merk, modified INRA 82 and sucrose [25mM]. BotuCrio supplemented with egg yolk also recorded better results than that supplemented with LDL. The diluents based on egg yolk, glycerol and amides showed better results than the diluents based on milk, glycerol and amides. Regarding cryoprotectants, better results were observed when using sucrose at concentrations of [0.15M, 0.30M, 20mM, 50mM and 100mM] and trehalose at the concentration of [0.15M]. The use of trehalose and lactose in epididymal samples resulted in better parameters than for ejaculated semen. The opposite was observed when using lactose. The use of glycerol at concentrations of 2%, 3% and 5% recorded better parameters, as did the combination of glycerol 2.5% and dimethylformamide 2.5% or dimethylformamide 5% alone. The opposite occurred when glycerol and EDTA were combined. In this sense, there is a need for research evaluating the use of INRA 96 compared to BotuCrio and evaluating the use of BotuCrio supplemented with egg yolk. Also, the use of sucrose or trehalose, at the concentrations described, in combination with dimethylformamide 2% and 5% and/or in association with glycerol 2%, 3% and 5% should be evaluated. In addition,

studies are needed to evaluate the influence of factors such as semen collection method, seminal quality, age and breed on cryopreservation success.

Keywords: stallion, diluent, cryoprotectant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---------- **10**
2 OBJETIVOS ---------- **12**
2.1 Objetivo Geral ---------- 12
2.2 Objetivos específicos ---------- 12
3 REFERENCIAL TEÓRICO ---------- **13**
3.1 Importância do melhoramento genético na espécie equina ----------13
3.2 Criopreservação como melhoramento genético ----------14
3.3 Maturidade sexual ---------- 15
3.4 Influência da sazonalidade na qualidade e produção seminal ----------16
3.4 Estrutura do espermatozoide e o líquido seminal ---------- 16
3.6 Estrutura e composição de membrana do espermatozoide ----------17
3.7 Efeitos da criopreservação do sêmen equino ----------17
3.8 Diluentes ----------19
3.9 Crioprotetores ---------- 20
3.10 Descongelamento ----------20
3.11 Análise do sêmen após o descongelamento ----------21
4 METODOLOGIA ---------- **22**
4.1 Delimitação da literatura – revisão sistemática ----------22
4.2 Seleção e avaliação dos artigos ----------23
4.3 Extração de dados ----------23
5 RESULTADOS ----------**25**
5.1 Resultados da revisão sistemática ---------- 25
5.2 Resultados dos artigos selecionados ---------- 28
6 DISCUSSÃO ---------- **37**
6.1 Relevância da amostra, idade, raça e método de coleta na criopreservação ----------37
6.2 Influência do diluente e/ou crioprotetor nas variáveis espermáticas avaliadas ----------40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS ---------- **44**
8 REFERÊNCIAS ---------- **45**

1 INTRODUÇÃO

O cavalo é um animal versátil, que evoluiu constantemente ao longo dos anos. Para promover o melhoramento genético dessa espécie é necessário entender a importância da seleção e do cruzamento, para o estabelecimento das características numa progênie. O cruzamento dirigido e criterioso, associados ao emprego de biotecnologias, aperfeiçoará a criação de equinos melhorados e geneticamente superiores (MIRANDA *et al*., 2020).

Para atender a demanda dos sistemas de produção desta espécie foram necessárias a criação de técnicas que permitissem melhor aproveitamento do potencial reprodutivo. A criopreservação de sêmen equino é um processo desenvolvido para otimizar e facilitar essa produção (FARIA; ATAIDES, 2020).

A criopreservação vem crescendo por proporcionar um melhor aproveitamento genético de animais de altos valores econômicos e zootécnicos, devido à facilidade de transporte e armazenamento do material genético de garanhões por longo período de tempo. Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa, o que dificulta a sua utilização em grande escala, pois o uso do sêmen equino encontra particularidades individuais de congelabilidade espermática existente entre garanhões, entre ejaculados do mesmo indivíduo e na capacidade reduzida dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento e descongelamento (CASTRO *et al*., 2017).

Uma das biotecnologias de reprodução que mais promovem vantagens para a equideocultura mundial é a inseminação artificial (IA) (OLIVEIRA, R. *et al*., 2019). Na IA, temos a oportunidade de utilizar o sêmen congelado (ALVARENGA; CARMO, 2021). A técnica de transferência de embrião (TE) também pode ser utilizada em associação as técnicas de IA no melhoramento genético (SILVA, M. *et al*, 2019). A criopreservação e a fertilidade dos espermatozoides em um ejaculado também são importantes na aplicação de técnicas como à produção *in vitro* de embriões (PIV), na fertilização *in vitro* (FIV) e na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (ORSOLINI *et al*., 2021).

O processo de criopreservação induz alterações estruturais, bioquímicas e funcionais nos espermatozoides (SAADELDIN *et al*., 2020). Os processos de congelação e descongelação levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor e, consequentemente, influenciando sua morfologia (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013). Danos às membranas e a cromatina dos espermatozoides podem ocorrer alterando a permeabilidade da membrana do espermatozoide, afetando a capacidade de fertilização e o desenvolvimento embrionário (SAADELDIN *et al*., 2020).

Para que a criopreservação do sêmen equino seja bem-sucedida, é fundamental a interação do crioprotetor, do diluidor, da curva de resfriamento e do aquecimento no processo de criopreservação. Se a criopreservação for realizada de maneira correta, os efeitos deletérios, como o choque térmico, a formação de cristais de gelo e a desidratação celular, são minimizados. Para uma melhor resposta e proteção dos espermatozoides, são adicionados crioprotetores e diluentes de sêmen logo após sua coleta. Por isso, é importante compreender e analisar os diferentes tipos de crioprotetores, diluidores e curva de congelamento, de modo que o protocolo de criopreservação seja adequado para cada indivíduo (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da criopreservação do sêmen em equinos por meio de uma revisão sistemática.

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a eficácia do processo de criopreservação por meio da escolha do diluente e/ou crioprotetor utilizado.
b) Avaliar a combinação e concentração adequada do diluente e/ou crioprotetor para o processo de criopreservação do sêmen equino.
c) Avaliar os efeitos da escolha do diluente e/ou crioprotetor nos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana plasmática (IMS) e integridade de membrana do acrossoma (AIS).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância do melhoramento genético na espécie equina

A espécie equina, por sua grande versatilidade, é responsável pelo constante crescimento da equideocultura no Brasil e no mundo. Nenhum outro animal de interesse zootécnico desempenhou papel tão expressivo no desenvolvimento social e político da humanidade como o cavalo. Os equinos sofreram adaptação desde o seu uso como fonte de matéria prima e alimentos, nos primórdios da domesticação, bem como seu emprego como meio de transporte e atividade prática, até os dias de hoje, o qual é utilizado em práticas esportivas, atividades de terapia e recreação ou em processos de melhoramento genético (PEREIRA *et al*., 2015).

Há cerca de 60 milhões de cavalos no mundo, a maioria deles vivendo nas Américas, Ásia e alguns países da Europa. Os Estados Unidos é o país com maior contingente, seguido da China, México e Brasil. Estes quatro países, conjuntamente, possuem cerca de 50% da população global de cavalo (PEREIRA *et al*., 2015). Segundo dados do IBGE (2023), atualmente o Brasil conta com um rebanho de equinos de 5.777.046 animais, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor de equinos do Brasil no ano de 2021. A equideocultura brasileira é um setor crescente da economia e tem gerado empregos diretos e indiretos e movimentado bilhões por ano (VIEIRA *et al*., 2015).

Diante a importância e crescimento da equideocultura, da movimentação financeira que este setor propicia, assim como o objetivo de implementar o melhoramento genético de forma exponencial nesta espécie, faz-se necessário o uso e aperfeiçoamento de biotecnologias reprodutivas e de um manejo reprodutivo correto (RODRIGUES; BERTOLINI, 2019). De acordo com Zamai *et al*. (2019), à busca por tecnologias que resultem em melhores índices da produção devem se basear principalmente em nutrição, manejo geral e melhoramento genético. Alvarenga e Carmo (2021), afirmam que o Brasil é referência no estudo e na utilização de Biotécnicas aplicadas à Reprodução Equina. Já Pereira *et al*. (2015) relata que em comparação a outras espécies, os estudos na área de melhoramento genético são menores em equinos, no mundo todo.

Apesar de os criadores de cavalos para esportes almejarem animais geneticamente superiores, capazes de apresentarem alto desempenho nas provas, existe um impasse entre pesquisa e aplicação na prática que impede a implementação de programas de seleção consistentes e contínuos. O melhoramento genético de cavalos atletas é complexo, tornando

difícil a obtenção de um animal superior em provas equestres ou mesmo para o trabalho. A maior causa desta dificuldade é a baixa herdabilidade do desempenho atlético o que pode ser um argumento a mais para a utilização de ferramentas reprodutivas para a seleção e o melhoramento genético (PEREIRA *et al*., 2015).

3.2 Criopreservação como ferramenta para o melhoramento genético

A elevada demanda dos sistemas de criação de equinos, viabilizou a criação de técnicas que permitissem o maior e melhor aproveitamento do potencial reprodutivo da espécie. Um dos artifícios desenvolvidos para otimizar e facilitar a produção foi a criopreservação (FARIA; ATAIDES, 2020).

O sucesso da criopreservação de espermatozóides é altamente variável entre garanhões, uma vez que uma grande parcela dos animais apresenta características do sêmen inadequadas para o uso, após o descongelamento (ALVARENGA; CARMO, 2021). Apesar de inúmeras vantagens e avanços, a criopreservação do sêmen equino ainda se depara com resultados inferiores aos encontrados com o sêmen fresco e refrigerado (SILVA; MONTEIRO, 2019).

O congelamento de sêmen possui inúmeras vantagens, uma vez que otimiza o uso do garanhão, até mesmo fora da estação de monta, levando a um maior número de descendentes com alto valor genético, possibilita a preservação do material genético do animal por tempo ilimitado, elimina barreiras geográficas, diminui os custos e riscos envolvidos com o transporte de animais, minimiza a propagação de doenças e permite a utilização de garanhões com *impotencia coeundi* ou que já morreram (SILVA; MONTEIRO, 2019).

A inseminação artificial (IA), é uma biotécnica muito importante para o melhoramento genético animal, sendo uma técnica de grande aplicação por necessitar de poucos machos selecionados para a produção de espermatozoides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano, por diminuir a transmissão de patógenos via coito, por exigir menos do garanhão e por facilitar a reprodução pela facilidade de transporte do sêmen equino para diferentes regiões do país, sem a necessidade de transportar a égua, possibilitando melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores (OLIVEIRA, G. *et al*, 2013).

Por muito tempo, o desenvolvimento e a utilização da IA na espécie equina estiveram restritos, devido a imposições por muitas associações de criadores que não permitiam o uso dessa técnica. Recentemente, houve alteração das legislações em diversos países do mundo, permitindo o registro de potros oriundos dessa biotecnologia, acarretando num grande

impacto na indústria do cavalo em todo o mundo, especialmente no Brasil (CANISSO *et al*., 2008). A TE pode ser utilizada em associação as técnicas de IA no melhoramento genético (SILVA, M. *et al*, 2019)

Embora taxas de prenhez comercialmente aceitáveis possam ser alcançadas após a inseminação com sêmen resfriado e criopreservado de garanhões, essas taxas são comprometidas por uma redução na viabilidade do esperma em comparação com a sêmen fresco (CLULOW; GIBB, 2022).

Essa diversidade significativa na fertilidade dos espermatozoides em um ejaculado torna-se mais pertinente quando aplicada à produção in vitro de embriões (PIV), durante a qual um número menor de espermatozoides é selecionado para fertilização in vitro (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Assim, torna-se necessário entender quais parâmetros fisiológicos e funcionais são os que mais contribuem para a fertilidade do esperma. Isso nos permite selecionar os espermatozoides da mais alta qualidade em uma ejaculação para PIV (ORSOLINI *et al*., 2021).

Cada etapa do processo de criopreservação constitui um ponto crítico para a obtenção de bons resultados, uma vez que o sucesso na criopreservação está condicionado à qualidade do sêmen fresco e suas interações com o diluidor, com os crioprotetores e com as curvas de congelamento-descongelamento, variáveis essas com grande influência racial e individual entre garanhões (SILVA; MONTEIRO, 2019). O conhecimento acerca das peculiaridades comportamentais reprodutivas em equinos contribui, de forma positiva, para o estabelecimento de mudanças no manejo e visam melhoria da eficiência reprodutiva nos atuais sistemas de criação desses animais (LIMA *et al*., 2019).

3.3 Maturidade sexual do macho

Puberdade é a idade em que os animais, machos e fêmeas, adquirem a capacidade de liberar gametas (espermatozoides ou óvulos, respectivamente) e manifestar uma sequência completa de comportamento sexual. A idade em que ocorre a puberdade varia entre espécies e entre raças da mesma espécie. Nos equinos, a idade à puberdade é atingida em média com 14 meses, entre o 10° e 24° mês de vida (HENRY; ECHEVERRI, 2013).

A descida testicular em um potro acontece entre 1 e 3 semanas de idade. O crescimento pós-natal dos testículos começa durante o 11º mês (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em cavalos, um aumento significativo no peso testicular, na produção diária de espermatozóides e na reserva de esperma epididimal ocorre até 15 anos de idade. A produção de esperma aumenta

com a idade no período pós-puberdade. O sêmen pode ser satisfatoriamente coletado em garanhões com 24 meses de idade, sujeito a sofrer variações sazonais (HAFEZ, 2004 e CASTRO *et al*., 2017).

3.4 Influência da sazonalidade na qualidade e produção seminal

A estação reprodutiva dos garanhões não é bem delimitada e é possível coletar sêmen durante todo o ano. No entanto, variações sazonais são notadas no número de ejaculados por monta, no volume da fração do sêmen sem gel, no número total de espermatozóides por ejaculado e na motilidade, tanto no sêmen fresco quanto no diluído. Os espermatozóides do primeiro ejaculado são menos afetados pela estação que os do segundo ejaculado (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A estação do ano influencia nas características físicas e bioquímicas do sêmen, nos níveis hormonais, no comportamento sexual e na fertilidade de garanhão e da égua. A produção de espermatozóides e a libido dos garanhões são maiores durante a primavera e o verão e são menores durante o outono e o inverno. Essas variações na capacidade reprodutiva coincidem com a estação de monta natural das éguas. A concentração de testosterona plasmática dos garanhões também sofre influência da estação e pode estar envolvida nas modificações das características seminais e comportamentais (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A maior produção de espermatozóides pelos garanhões ocorre durante o mês de julho, dois meses após o pico estacional dos níveis plasmáticos de testosterona (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004).

3.5 Estrutura do espermatozoide e o líquido seminal

Os espermatozóides completamente desenvolvidos são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo o núcleo e de uma cauda com o aparelho necessário para a motilidade celular. O espermatozóide é todo recoberto pelo plasmalema, ou membrana plasmática. O acrossoma, ou capa acrossomal, é uma estrutura de parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça. O colo conecta a cabeça do espermatozóide com a cauda (flagelo), que é subdividida em peças intermediária, principal e terminal (GARNER; HAFEZ, 2004).

O plasma seminal tem papel essencial no transporte e na fisiologia do espermatozoide. Contudo, o esperma removido do vaso deferente e do epidídimo pode ser utilizado com sucesso para a inseminação artificial. Certos componentes do plasma seminal estimulam a motilidade espermática, enquanto outros a inibem (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A

maturação dos espermatozóides ocorre durante a passagem pelo epidídimo e a sua motilidade aumenta quando eles entram no corpo do epidídimo. Os espermatozóides da cauda do epidídimo são capazes de fertilização quando inseminados sem a adição de secreções das glândulas acessórias (HAFEZ, 2004).

3.6 Estrutura e composição de membrana do espermatozoide

A membrana mitocondrial dos espermatozóides, rica em fosfolipídeos, varia bastante entre as espécies quanto ao número de mitocôndrias e à sua configuração química (GARNER; HAFEZ, 2004). Os espermatozoides equinos possuem uma menor proporção de colesterol para fosfolipídeos entre as espécies domésticas, o que o torna mais suscetível a mudanças em seu estado fluido e na sua conformação durante o resfriamento, resultando em danos mecânicos e funcionais. Há também uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática do esperma, que são mais suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem acelerar o processo de peroxidação lipídica, levando o espermatozoide à morte (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018).

A membrana plasmática do espermatozoide é formada por uma bicamada lipídica, composta de fosfolipídeos, colesterol, glicolipídeos e diferentes tipos de proteínas. Os fosfolipídeos formam uma camada mais externa hidrofílica, e outra camada interna hidrofóbica. As proteínas se dividem em periféricas e integrais. As periféricas são facilmente removidas, solúveis no sêmen e na água. As integrais não são removidas com facilidade da membrana plasmática, precisando de solventes ou detergentes para serem removidas (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

3.7 Efeitos da criopreservação do sêmen equino

O processo de criopreservação das células espermáticas consiste em armazenar o sêmen à uma temperatura de -196º C de forma a estagnar o metabolismo espermático, aumentando assim a longevidade da célula (SILVA; MONTEIRO, 2019). Esse processo, induz alterações estruturais, bioquímicas e funcionais nos espermatozoides. As membranas e a cromatina dos espermatozoides podem ser danificadas, a permeabilidade da membrana do espermatozoide é aumentada, ocorre a hiperoxidação e a formação de ROS, afetando a capacidade de fertilização e o desenvolvimento embrionário (SAADELDIN *et al*., 2020).

O sucesso da criopreservação do sêmen em equinos, depende de diversas etapas e eventos bioquímicos complexos, que determinarão se a célula será viável ao final de todas as

etapas. Esse sucesso está condicionado à qualidade do sêmen fresco e suas interações com o diluidor e com os crioprotetores, com as curvas de congelamento utilizadas, variáveis essas com grande influência racial e individual entre garanhões (SILVA; MONTEIRO, 2019). Os processos de congelamento e descongelamento levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor e, consequentemente, influenciando sua morfologia (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

O transporte de moléculas através da membrana plasmática ocorre por meio de poros ou canais formados pelas proteínas. Contudo, em regiões da membrana que não há poros ou canais, o transporte de moléculas é reduzido ou ausente. Na fase de resfriamento, pode ocorrer um desarranjo na conformação da membrana plasmática, levando a uma desorganização nas cadeias de fosfolipídeos e proteínas, resultando assim, numa passagem rápida de moléculas pela membrana, que passariam de uma forma lenta, provocando um choque osmótico nessa membrana. A membrana plasmática é fluida à temperatura corporal e alguns fatores como o resfriamento, podem alterar a fluidez e flexibilidade de membrana (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

O choque térmico são mudanças que ocorrem nos espermatozoides, quando estes são resfriados para a temperatura de zero grau. Este evento, provoca danos irreversíveis aos espermatozoides, como movimentos anormais, rápida perda de motilidade, danos ao acrossoma e a membrana plasmática, que acarretam num aumento da permeabilidade, perda de componentes intracelulares e diminuição da atividade metabólica. O choque térmico é sentido de forma individual em cada espermatozoide, dependendo do grau de maturação do espermatozoide, da espécie do animal, da variação individual, da quantidade de plasma seminal, dentre outros fatores (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

Para que ocorra um menor dano possível no espermatozoide, recomenda-se realizar o resfriamento lento do sêmen diluído até 5°C, com queda de 0,5ºC por minuto (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013). A taxa de resfriamento ideal deve ser lenta o suficiente para permitir a desidratação da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, mas suficientemente rápida para evitar a exposição prolongada de espermatozoides a soluções hipersaturadas do ambiente extracelular. O resfriamento é o intervalo de temperatura em que a membrana plasmática celular passa do estado liquido cristalino para o estado gel e, portanto, se torna mais susceptível aos danos causados pelo estresse térmico, perdendo motilidade e potencial fertilizante. No entanto, este efeito pode ser minimizado por meio do controle da taxa de resfriamento e da adição de crioprotetores ao meio diluente (SILVA; MONTEIRO, 2019).

O metabolismo do espermatozoide equino pode torná-lo mais suscetível a danos oxidativos, devido à sua dependência a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Durante o congelamento, qualquer interrupção da integridade e da função mitocondrial poderá induzir um desequilíbrio na produção de ROS, exacerbando um estado oxidativo que é deletério para o espermatozoide. Esses motivos, podem explicar porque, após o congelamento, o sêmen congelado de garanhões, pode apresentar altas proporções de espermatozoides com baixa motilidade, membrana plasmática danificada e mitocôndrias disfuncionais (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018).

3.8 Diluentes

Para haver uma melhor resposta e proteção dos espermatozoides, são adicionados alguns tipos de extensores e diluidores de sêmen logo após sua coleta, que são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013). Os diluidores de sêmen são soluções que protegem os espermatozoides de condições desfavoráveis e prolonga sua sobrevivência durante a refrigeração e o transporte, além da vantagem de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na análise do sêmen (COELHO; DIAS, 2021).

O ajuste do sêmen ao diluidor e a forma de processamento permitem minimizar os danos provocados pelo choque térmico, pela desidratação excessiva, pelo estresse tóxico e pela formação e dissolução de cristais de gelo que o crioprocessamento oferece aos espermatozoides (SILVA; MONTEIRO, 2019). Os meios utilizados para a diluição do sêmen para a criopreservação são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura. Em geral, utilizam-se gema de ovo, leite desnatado, açúcares, eletrólitos e glicerol em diferentes concentrações (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013). Dentre os diluentes para sêmen equino comercializados no Brasil existem o EZ – Mixin, MaxSêmen; Botu-Sêmen, Botu-Turbo, e Equimix, a base de leite e ou derivados em sua composição (CANISSO *et al*., 2008). Existem também os extensores a base de leite desnatado, INRA 82, e a base de fosfocaseinato do leite, o INRA 96 (PAPIN *et al*., 2021).

A diluição é feita em proporção 1:1, quando uma parte de sêmen corresponde a uma parte de diluidor ou extensor. Para que o extensor seja ideal, deve respeitar a osmolaridade e o pH ideal do espermatozoide. Também é fundamental equilibrar os elementos minerais e substâncias que neutralizam produtos tóxicos, como antibióticos, e conferir uma proteção ao

choque térmico. Outros componentes do diluidor podem incluir EDTA, detergentes e tampões (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

3.9 Crioprotetores

Para melhor proteção do espermatozoide, são adicionados aos diluidores alguns tipos de crioprotetores que diminuem os efeitos agressivos do congelamento e descongelamento (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013). Os crioprotetores são essenciais para o sucesso da criopreservação, uma vez que evitam a formação de cristais de gelo, dentro e fora da célula. Além disso, exercem um efeito osmótico, induzindo a desidratação dos espermatozoides, essencial a sua sobrevivência, além de proteger a membrana plasmática. Apesar de essenciais, os crioprotetores, podem exercer efeitos tóxicos e reduzir os índices de fertilidade quando presentes em concentrações elevadas (SILVA; MONTEIRO, 2019).

Os crioprotetores são classificados como penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes conseguem atravessar a membrana plasmática do espermatozoide devido a seu pequeno tamanho molecular, atuando, assim, nos meios intracelular e extracelular. Estes crioprotetores são essenciais para minimizar ou prevenir a formação de cristais de gelo intracelular. São eles o glicerol, o propilenoglicol, o etilenoglicol, a acetamida e outras amidas como a metilformamida e a dimetilformamida, além do dimetilsulfóxido. Os não penetrantes, por sua vez, não têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática devido ao seu maior peso molecular. Entretanto, auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante o processo de congelamento e descongelamento. São eles: as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, os açúcares, como lactose, manose, frutose e trealose, e os polímeros sintéticos, como a metilcelulose (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013 e CASTRO *et al*., 2017).

3.10 Descongelamento

O resultado final da criopreservação é observado após o descongelamento, que deve manter uma curva condizente com a utilizada para o congelamento. Por exemplo, se a curva de congelamento for lenta, o descongelamento também deve ser lento para que os cristais de gelo extracelulares descongelem, provocando a diluição dos solutos e promovendo a reidratação celular lentamente. Se for utilizada uma curva de congelamento rápida, o descongelamento deverá ser rápido, evitando o fenômeno da recristalização (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

Quando a curva de congelamento é muito rápida, não há tempo suficiente para que a desidratação adequada ocorra, resultando na formação de grandes cristais de gelo que são

formados no meio intracelular. Desse modo, a velocidade de descongelamento também precisa ser rápida, para que não aconteça a recristalização (fusão de cristais de gelo) e, a ocorrência de lesão celular (COELHO; DIAS, 2021).

3.11 Análise do sêmen após o descongelamento

As avaliações básicas realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade do sêmen e que seguem os padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) para o sêmen *in natura* ou criopreservado, são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/ml); anormalidades espermáticas (%) e teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal (CASTRO *et al*., 2017).

O sêmen de um garanhão, ao ser selecionado para a criopreservação, deve apresentar 70% de motilidade progressiva, vigor igual a três, e no máximo 30% de anormalidades espermáticas (CASTRO *et al*., 2017 e AIDAR, 2013). Os processos de congelação e descongelação levam a efeitos deletérios sobre o espermatozoide, diminuindo sua taxa de motilidade e vigor e, consequentemente, influenciando sua morfologia (OLIVEIRA, G. *et al*., 2013).

O sistema CASA, *Computer Assisted Sperm Analysis*, é um sistema automatizado que processa, analisa e fornece informações precisas e significativas da cinética de cada célula espermática, assim como valores estatísticos médios da população total. Características de movimento espermático são calculadas, fornecendo parâmetros de motilidade como: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana plasmática (IMS), integridade de acrossoma (AIS), porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Estes valores são usados para diferenciação dos padrões do movimento espermático após o descongelamento do sêmen (BRANDÃO, 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delimitação da literatura – revisão sistemática

Para o desenvolvimento do trabalho, uma revisão sistemática de artigos científicos foi realizada para identificar os principais crioprotetores e diluentes utilizados no processo de criopreservação do sêmen equino.

O desenvolvimento desta revisão sistemática foi fundamentado nas etapas delineadas no Manual de Produção Científica (COSTA; ZOLTOWSKI, 2014) e nos itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas: PRISMA (MOHER *et al*., 2009).

A busca pelos artigos foi realizada de forma eletrônica, nas bases de dados PubMED, Scielo, *Scopus* e *Web of Science*, através do acesso CAFe do Portal de Periódicos Capes (https://www-periodicos-capes-gov-br.ezl.periodicos.capes.gov.br), entre os meses de Abril e Maio de 2023. A busca dos artigos consistiu na associação das palavras-chave, que sintetizam os conceitos e variáveis investigadas, com operadores booleanos, que combinam os termos de pesquisa no sistema utilizado. Os operadores booleanos utilizados foram OR e AND. A pesquisa dos artigos foi delimitada por meio do uso de filtros, como por exemplo: 2018 – 2023 em *Year*, *Veterinary* e *Agricultural and Biological Sciences* em *Subject área*, *Article* em *Document type*, *English* e *Portuguese* em *Language*. Os termos de pesquisa obedeceram aos seguintes critérios: a) termos relacionados à espécie ou grupo animal; b) termos relacionados à característica avaliada; c) termos relacionados ao componente avaliado (Tabela 1).

Tabela 1 – Palavras-chave utilizadas na busca sistemática de dados.

Termo relacionado à espécie ou grupo animal	Termo relacionado à característica avaliada	Termo relacionado ao componente avaliado
Equine	Cryopreservation	“Artificial vagina”
Horses	“Frozen semen”	“Artificial dummy”
Sire	“Semen collection”	“Epididymis collection”
Stallion	Diluent	“Egg yolk”
Stud-horse	Cryoprotectant	“Skimmed milk”
		Methylformamide
		Dimethylformamide
		Dimethylacetamide
		“Horse breeds”

Fonte: do autor.

Deste modo, a combinação entre as palavras-chave e os operadores booleanos utilizada foi: equine OR horses OR sire OR stallion OR stud horse AND cryopreservation OR “frozen semen” OR “semen collection” OR diluent OR cryoprotectant AND “artificial vagina” OR “artificial dummy” OR “epididymis collection” OR “egg yolk” OR “skimmed milk” OR methylformamide OR dimethylformamide OR dimethylacetamide OR “horse breeds”. Os termos foram adicionados ao campo de busca no idioma inglês ou português, com ou sem aspas, a depender da base de dados utilizada.

4.2 Seleção e avaliação dos artigos

A seleção foi, inicialmente, baseada na verificação da presença de pelo menos um termo de pesquisa no título, no resumo ou nas palavras-chave do artigo. Os artigos que apresentaram termos de pesquisa no plural também foram selecionados, por exemplo *stallions*. Os artigos que foram encontrados repetidos entre as bases de dados, foram selecionados apenas uma vez, e relacionados à primeira base a qual foi encontrado.

Em seguida, foi feita a escolha dos artigos selecionados, de acordo com os critérios a seguir: 1) o artigo aborda o processo de criopreservação em equinos; 2) o artigo foi realizado envolvendo cavalos e não burros e/ou pôneis; 3) o artigo discute o uso de diluentes e/ou crioprotetores usados no processo de criopreservação; 4) o artigo não aborda a adição de antioxidantes, antibióticos ou outras substâncias ao diluente escolhido; 5) o artigo não discute somente sobre a influência do plasma seminal ou da centrifugação na eficácia da criopreservação; 6) o artigo não avalia somente o fator raça e método de coleta para o congelamento do sêmen; 7) o texto completo do artigo está disponível em PDF; 8) os autores forneceram a metodologia e resultados encontrados; 9) o artigo foi publicado a partir de 2018; 10) o artigo foi escrito em português ou inglês; 11) o artigo não é uma revisão de literatura. Assim, os artigos que atenderam aos critérios estabelecidos foram selecionados para a etapa de revisão do texto completo.

4.3 Extração de dados

Após a leitura e análise do texto completo dos artigos selecionados, foram extraídos os seguintes dados: o número de garanhões utilizados como amostra, o número de ejaculados ou epidídimos usados para coleta do sêmen, a idade dos garanhões (anos), a raça, o método de coleta do ejaculado ou epidídimo, o(s) diluente(s) e/ou crioprotetor(es) utilizado(s) e os parâmetros seminais avaliados. Os estudos que apresentavam mais de um experimento

realizado foram incluídos mais de uma vez na análise. Estes dados foram tabulados em uma planilha do *Excel*. Posteriormente, para a análise dos artigos selecionados, foi realizada a análise da qualidade dos estudos com intuito de detecção das semelhanças e diferenças entre eles.

5 RESULTADOS

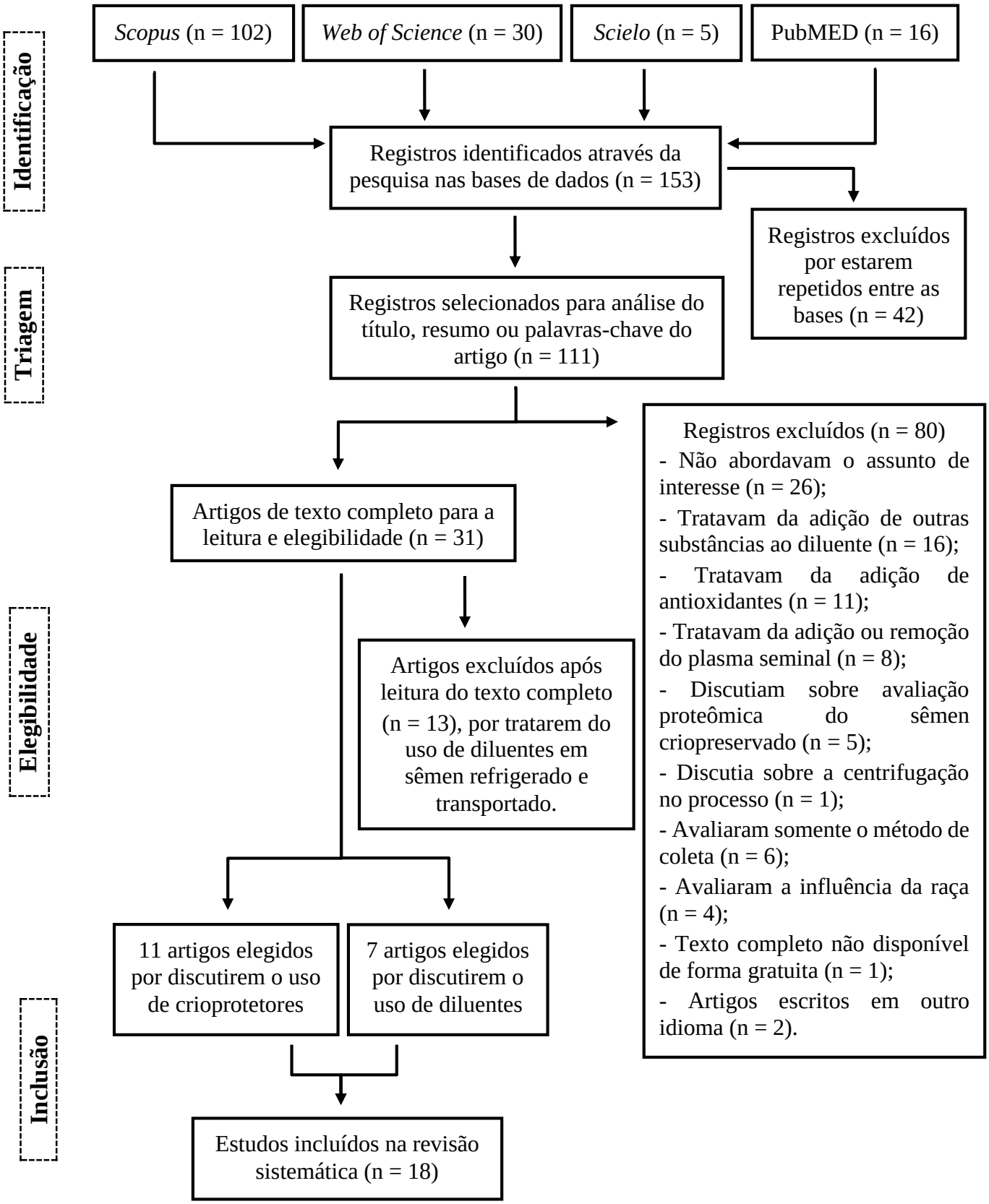
5.1 Resultados da revisão sistemática

A busca sistemática resultou em 153 artigos entre as bases de dados. A base *Scopus* foi a primeira a ser consultada, da qual resultou a escolha de 102 artigos. Em seguida, foi consultada a *Web of Science*, da qual foram selecionados 30 artigos. Logo após, foram selecionados cinco (05) artigos da *Scielo* e 16 artigos da PubMED. Após a seleção inicial, 42 artigos foram excluídos por estarem repetidos entre as bases de dados.

Os 111 artigos restantes foram triados pela leitura do título, resumo e palavras-chave e 26 artigos foram excluídos por não tratarem do assunto de interesse. Dos 85 artigos restantes, 16 foram excluídos por se tratarem da adição de outras substâncias ao diluente e 11 foram excluídos por discutirem a adição de antioxidantes ao processo de criopreservação. Dos 58 restantes, oito (08) foram excluídos por avaliarem a influência da adição ou remoção do plasma seminal na criopreservação. Dos 50 restantes, cinco (05) foram excluídos por tratarem da avaliação proteômica no sêmen criopreservado. Dos 45 restantes, um (01) foi excluído por discutir a importância da centrifugação do sêmen na criopreservação, seis (06) foram excluídos por avaliarem o método de coleta do sêmen a ser criopreservado e quatro (04) por avaliarem a influência da raça no processo de criopreservação. Dos 34 artigos restantes, um (01) foi excluído por não disponibilizar o texto completo de forma gratuita e dois (02) foram excluídos por serem escritos em outro idioma.

Os 31 artigos restantes, foram selecionados para a leitura completa, sendo 11 artigos sobre o tema crioprotetor e 20 artigos sobre o tema diluente. Dos 11 artigos lidos sobre a escolha do crioprotetor, os 11 foram selecionados para este trabalho. Dos 20 artigos sobre a escolha do diluente, sete (07) artigos foram selecionados para este trabalho, e 13 artigos foram excluídos por não discutirem o uso de diluentes no processo de criopreservação e sim, de resfriamento ou transporte do sêmen equino. Esta triagem e seleção dos artigos, é representada a seguir na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma das informações nas diferentes fases da revisão sistemática, com o respectivo número de registros identificados, selecionados e incluídos, adaptado a partir das diretrizes de PRISMA (MOHER *et al*., 2009).



Fonte: do autor.

Dos 18 artigos incluídos nesta revisão sistemática, 11 artigos discutiram sobre o uso, a combinação e concentração de crioprotetores, também chamados de extensores de congelamento, na eficácia do processo de criopreservação, e sete (07) artigos discutiram o uso, a combinação e concentração de diluentes, também chamados de extensores de resfriamento, associados ou não à crioprotetores, na eficácia do processo de criopreservação do sêmen equino. Deste modo, as publicações foram agrupadas de acordo com o fator analisado e discutido, como é mostrado na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 – Publicações referentes ao uso de crioprotetores no processo de criopreservação resultantes da revisão sistemática.

Crioprotetor	Autor(es)
Albumina de soro bovino	ÁLVAREZ, C. *et al*., 2019 HIDALGO, M. *et al*., 2018
Dimetilacetamida	VAFAEI, F. *et al*., 2019
Dimetilformamida	MOURA, T. C. M. *et al*., 2022 SONI, Y. *et al*., 2019 VAFAEI, F. *et al*., 2019
Gema de ovo	MOURA, T. C. M. *et al*., 2022 RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. *et al*., 2023
Glicerol	HIDALGO, M. *et al*., 2018 SONI, Y. *et al*., 2019 HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al*. 2023 RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. *et al*., 2023 VAFAEI, F. *et al*., 2019 SILVA, J. C. F. *et al*., 2018
LDL	CONSUEGRA, C. *et al*., 2019
Metilformamida	HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al*. 2023 RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. *et al*., 2023 FERRER, M. S. *et al*., 2020
Lactose/Lactose EDTA	ÁLVAREZ, C. *et al*., 2019 FERRER, M. S. *et al*., 2020
Sacarose	HIDALGO, M. *et al*., 2018 PÉREZ-MÁRIN, C. C. *et al*., 2018 MOURA, T. C. M. *et al*., 2022 VAFAEI, F. *et al*., 2019
Trealose	PÉREZ-MÁRIN, C. C. *et al*., 2018 VAFAEI, F. *et al*., 2019 ÁLVAREZ, C. *et al*., 2019

Fonte: do autor. Abreviações: LDL: lipoproteínas de baixa densidade; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

Tabela 3 – Publicações referentes ao uso de diluentes no processo de criopreservação resultantes da revisão sistemática.

Diluente	Autor(es)
BotuSêmen	NEUHAUSER, S. *et al*., 2019 SNOECK, P. P. N. *et al*., 2020
BotuCrio	SNOECK, P. P. N. *et al*., 2019 SNOECK, P. P. N. *et al*., 2020
EquiPlus	NEUHAUSER, S. *et al*., 2019 ALAMAARY, M. S. *et al*., 2019
Gent	NEUHAUSER, S. *et al*., 2019 SICHTAR, J. *et al*., 2019
HF-20	ALAMAARY, M. S. *et al*., 2019
INRA 82	SNOECK, P. P. N. *et al*., 2019
INRA 96	NEUHAUSER, S. *et al*., 2019 ALAMAARY, M. S. *et al*., 2019
Lact	SICHTAR, J. *et al*., 2019
Leite desnatado	HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al*., 2018
Merk	SNOECK, P. P. N. *et al*., 2019
Solução fisiológica	SNOECK, P. P. N. *et al*., 2020
TALP *sperm*	SNOECK, P. P. N. *et al*., 2020
Tris (Steridyl)	ALAMAARY, M. S. *et al*., 2019 NIKITKINA, E. *et al*., 2020

Fonte: do autor. Legenda: BotuSêmen: diluente a base de leite em pó desnatado, açúcares e antibióticos; BotuCrio: diluente baseado em gema de ovo, açúcares, antibiótico, metilformamida e glicerol; EquiPlus: diluente a base de leite em pós desnatado, açúcares, tampão e antibiótico; Gent: diluente a base de leite desnatado, gema de ovo, açúcares, tampão e antibiótico; HF-20: diluente a base de gema de ovo, glicerol e açúcares; INRA 82: diluente a base de leite desnatado; INRA 96: diluente baseado em fosfocaseinatos e açúcares; Lact: diluente baseado em lactose; Merk: diluente baseado em gema de ovo; TALP *sperm*: composição patenteada; Tris: baseado em gema de ovo, frutose e glicerol.

Para a construção das tabelas acima, foram desconsideradas as combinações de crioprotetores e diluentes usadas. Assim como, foi considerado apenas uma vez, o autor que realizou mais de um experimento com determinado crioprotetor/diluente, diferindo apenas nas concentrações escolhidas.

5.2 Resultados dos artigos selecionados

Os dados extraídos, dos artigos selecionados, delineando as características de cada estudo, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Delineamento dos experimentos analisados nesta revisão sistemática.

Autor(es)	Número de animais	Número de ejaculados	Número de epidídimos	Idade (anos)	Raça	Método de coleta	Crioprotetor(es)	Diluente(s)	Variáveis analisadas
HIDALGO *et al*., 2018	6	15	-	6 a 15	-	VA	Sacarose (C, 20, 50 e 100mM) à 5°C e 22°C	INRA 96	MT, MP, IMS, VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, STR, WOB e BCF
HIDALGO *et al*., 2018	6	15	-	6 a 15	-	VA	BSA (C, 1, 5 e 10%) à 5°C e 22°C	INRA 96	MT, MP, IMS, VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, STR, WOB e BCF
HIDALGO *et al*., 2018	6	18	-	6 a 15	-	VA	Gly, Sacarose 20 mM + BSA 1% à 5°C	INRA 96	MT, MP, IMS, AIS, ARS, ADS, VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, STR, WOB e BCF
PÉREZ-MARÍN *et al*., 2018	2	12	-	7 e 14	Espanhola	VA	Sacarose (0,15, 0,3 e 0,5 M), trealose (0,15, 0,3 e 0,5 M), M1 = 0,15M sacarose + 0,5M trealose e M2 = 0,5M sacarose + 0,15M trealose	INRA 96 + BSA 1%	MT, MP e AIS
SILVA, J. *et al*., 2018	2	20	-	6 e 10	Hanoveriana	VA	Gly 1%, 3% e 5%	Merk	MT, MP, atividade de acrosina e TRT
HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018	12	-	-	4 a 20	Paso Fino Colombiano	VA	Gly, DMF, MF	SKM, EDTA, MSKM	MT, IMS, HOST, AIS, HMMP, IPIAH
CONSUEGRA *et al*., 2019	4	8	-	5 a 23	-	VA	LDL (0,25, 0,5 e 1%)	Hippex + BSA 1% + trealose	MT, MP, IMS e AIS

CONSUEGRA *et al*., 2019	4	8	-	5 a 23	-	VA	Pronexcell (1, 5 e 10%)	Hippex + BSA 1% + trealose	MT, MP, IMS e AIS
ÁLVAREZ, *et al*., 2019	7	7	-	7 a 12	-	VA	Trealose (0,15M) e lactose (0,15M)	INRA 96 + Equex Pastee	MT, MP, VIAB e AIS
ÁLVAREZ, *et al*., 2019	5	-	10	7 a 12	-	LR	Trealose (0,15M) e lactose (0,15M)	INRA 96 + Equex Pastee	MT, MP, VIAB e AIS
SONI *et al*., 2019	9	-	-	4 A 6	Marwari, Manipuri e Zanskari	VA	Gly (2 e 5%), DMF (2 e 5%), 2,5% Gly + 2,5% DMF e 1% Gly + 1% DMF	EY + lactose-glicose-EDTA	MT, Habitabilidade, HOST, IMS, AIS, Integridade de DNA
VAFAEI *et al*., 2019	4	24	-	8 a 12	Turcomanos	VA	DMA, DMF, Gly, Trealose e Sacarose	HEPES, ác. cítrico, glicose, penicilina e EY	MT, MP, STR, LIN, VSL, VCL, VAP, ALH e BCF
NEUHAUSER *et al*., 2019	10	-	20	2 a 21	Variadas	LR	-	INRA 96, BotuSêmen, EquiPlus e EquiPlus Freeze, Gent e Gent Freeze	MT, MP, VCL, VAP, VSL, STR, ALH, BCF, VIAB, reação acrossômica
ALAMAARY *et al*., 2019	3	15	-	4 a 10	Árabe	-	-	HF-20, Tris, INRA Freeze, EquipPlus Freeze	MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, IMS, morfologia e anormalidades
SICHTAR *et al*., 2019	6	108	-	-	Kladruber	VA	-	Gent e Lact	MT, MP, IMS, STR, VAP, VCL, VSL, apoptose

SNOECK *et al*., 2019	4	8	-	-	Mangalarga Marchador	-	-	Botucrio, Merk e INRA 82 modificado	MT, MP, VCL, VSL, VAP, FAST, MED, SLOW, LIN, STR, ALH, BCF, Hiperatividade
SNOECK *et al*., 2019	14	14	-	-	Mangalarga Marchador	-	-	BotuCrio, EY e LDL	MT, MP, VCL, VSL, VAP, FAST, MED, SLOW, LIN, STR, ALH, BCF, Hiperatividade, CFDA e HOST
FERRER *et al*., 2020	25	25	-	6 a 17	Árabes, Standardbred e Quarto de Milha	VA	BotuCrio, EZ Mixin Cryomax LE e EZ Mixin Cryomax MFR	INRA 96	MT, MP, DCL, DAP, DSL, VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, BCF, ALH, IMS, capacidade de membrana intacta e acrossoma danificado
NIKITKINA, *et al*., 2020	9	31	-	7 a 12	-	VA	-	LCCY e Steridyl	MT, MP, morfologia e integridade de DNA
SNOECK *et al*., 2020	22	44*	-	-	Mangalarga Marchador	-	-	BotuCrio, BotuSêmen, TALP *sperm* e solução fisiológica	MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF e Hiperatividade
MOURA *et al*., 2022	6	24	-	4 a 8	-	VA	Botucrio e sacarose (C, 25, 50 e 100mM)	Leite desnatado e/ou EY	MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH e BCF
HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2023	9	27	-	7 a 29	Quarto de Milha e Árabe	VA	EY, SMEY, Gly e MF	INRA 96	MT, MP, VCL, IMS, AIS, peroxidação lipídica, apoptose

RAMÍREZ-AGÁMEZ *et al*., 2023	3	9	-	9 a 22	Quarto de Milha	VA	MFR5, CMMFR5, LE e CMLE	INRA 96	MT, MP, VIAB, $COMP_{\alpha\text{-}t}$ (%), VLPP

Fonte: do autor. *SNOECK et al., 2020, utilizou 44 palhetas ao invés de ejaculados. **Abreviações:** VA: vagina artificial; LR: lavagem retrógada do epidídimo; BSA: albumina de soro bovino; Gly: glicerol; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MF: metilformamida; DMF: dimetilformamida; DMA: dimetilacetamida; EY: gema de ovo; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético ; SMEY: proteínas do leite; MFR5: extensor comercial contendo gema de ovo [2%] + leite + glicerol [4%]; CMMFR5: extensor comercial contendo gema de ovo [2%] + leite + glicerol [2%] + metilformamida [3%]; LE: extensor comercial contendo gema de ovo [20%] + glicerol [4,75%]; CMLE: extensor comercial contendo gema de ovo [20%] + glicerol [2%] + metilformamida [3%]; SKM: extensor à base de leite desnatado; MSKM: extensor à base de leite desnatado modificado; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; IMS: integridade de membrana plasmática; AIS: integridade de acrossoma; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear progressiva; VAP: velocidade média do trajeto; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação; BCF: frequência do batimento flagelar cruzado; ARS: espermatozoides que reagiram ao acrossoma; ADS: espermatozoides desprovidos de acrossoma; TRT: teste de termorresistência; VIAB: viabilidade; HOST: teste hipoosmóstico; DCL: distância de trajetória curvilínea; DAP: distância média do percurso; DSL: distância linear; $COMP_{\alpha\text{-}t}$(%): espermatozoides com DNA modificado; VLPP: espermatozoides viáveis com peroxidação lipídica; HMMP: espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial; IPIAH: membrana plasmática intacta/acrossoma/alto potencial de membrana mitocondrial; FAST: rapidez; MED: médio; SLOW: lento; CFDA: corante fluorescente carboxifluoresceína diacetato.

Na tabela 5, estão descritos os resultados significativos de cada experimento avaliado, correlacionados aos parâmetros de MT, MP, IMS e AIS. Estes resultados foram baseados em análises estáticas realizadas em cada experimento.

Tabela 5 – Delineamento dos resultados significativos de cada experimento, correlacionados aos parâmetros de MT, MP, IMS e AIS.

Autor(es)	Crioprotetor(es)	Diluente(s)	Resultados
HIDALGO *et al*., 2018	Sacarose (C, 20, 50 e 100mM) à 5°C e 22°C	INRA 96	A utilização de sacarose [20mM] a 5°C resultou em valores mais elevados para MT, MP e IMS, sendo o limite superior para detectar seu efeito prejudicial.
HIDALGO *et al*., 2018	BSA (C, 1, 5 e 10%) à 5°C e 22°C	INRA 96	A utilização do BSA 1% a 5°C resultou em maiores valores de MT, MP e IMS.
HIDALGO *et al*., 2018	Gly, Sacarose 20 mM + BSA 1% à 5°C	INRA 96	A combinação de BSA 1% e sacarose [20mM] para criopreservação a 5°C resultou em maiores valores para MT, MP, IMS e AIS, em comparação com o congelamento lento convencional utilizando Gly.
PÉREZ-MARÍN *et al*., 2018	Sacarose (0,15, 0,3 e 0,5 M), trealose (0,15, 0,3 e 0,5 M), M1 = 0,15M sacarose + 0,5M trealose e M2 = 0,5M sacarose + 0,15M trealose	INRA 96 + BSA 1%	A adição de sacarose [0,15M] e trealose [0,15M] resultou em maior motilidade espermática. A MT foi menor ao utilizar o diluente controle, M1 ou M2. A MP foi maior em amostras diluídas em sacarose [0,15M] e [0,3M] e em trealose [0,15M]. Uma baixa porcentagem de espermatozoides manteve a AIS. A AIS foi menor em amostras diluídas na combinação de sacarose e trealose.
SILVA, J. *et al*., 2018	Gly 1%, 3% e 5%	Merk	A MT e MP foi menor no sêmen diluído em Gly 1% em relação ao sêmen diluído em 3% e 5%, não tendo sido encontrada diferença entre estas duas últimas concentrações.
HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018	Gly, DMF, MF	SKM, EDTA, MSKM	O extensor EDTA + Gly apresentou menor valor de MT, MP, IMS e AIS. O uso do extensor MSKM + MF + Gly resultou em maior MT. Valores mais altos de IMS e AIS foram observados com o uso de SKM + Gly + MF.
CONSUEGRA *et al*., 2019	LDL (0,25, 0,5 e 1%)	Hippex + BSA 1% + trealose	A concentração de 0,25% LDL resultou em maiores valores de MT, MP, IMS e AIS. O uso de 1% de LDL resultou em valores menores de IMS e AIS. Todas as concentrações de LDL avaliadas melhoraram a motilidade dos espermatozóides e preservaram as membranas plasmática e acrossômica.

CONSUEGRA *et al*., 2019	Pronexcell (1, 5 e 10%)	Hippex + BSA 1% + trealose	A concentração de 1% de Pronexcell resultou em maiores valores de MT, MP, IMS e AIS. O uso de Pronexcell (proteínas do soro do leite) aumentou os valores dos parâmetros espermáticos obtidos após criopreservação e aquecimento.
ÁLVAREZ, *et al*., 2019	Trealose (0,15M) e lactose (0,15M)	INRA 96 + Equex Pastee	As amostras de ejaculados diluídas em trealose ou lactose, apresentaram melhores valores de MP quando comparadas ao controle. O processo de criopreservação com suplementação do diluente em trealose ou lactose resultou em valores maiores para amostras epididimárias do que no ejaculado em termos de MT, MP e AIS.
ÁLVAREZ, *et al*., 2019	Trealose (0,15M) e lactose (0,15M)	INRA 96 + Equex Pastee	A amostra de espermatozoides epididimários diluídos em lactose apresentou menor MT comparada a amostra controle. A adição de trealose em amostras epididimárias no meio de criopreservação resultou em maior motilidade pós-descongelamento do que com uso de lactose.
SONI *et al*., 2019	Gly (2 e 5%), DMF (2 e 5% DMF), 2,5% Gly + 2,5% DMF e 1% Gly + 1% DMF	EY + lactose-glicose-EDTA	A MP, IMS e AIS foram mais elevadas no tratamento com 5% de DMF para as raças Marwari, Manipuri e Zanskari, assim como, o tratamento com 2% Gly resultou em maior motilidade do que o tratamento com 5% Gly. O Gly 2%, resultou em uma melhor motilidade e estabilidade das membranas plasmática e acrossômica dos garanhões em todas as raças em comparação com 2% DMF. A combinação entre 2,5% Gly e 2,5% DMF resultou numa maior motilidade pós-descongelamento, IMS e AIS do que as combinações de 1% destes crioprotetores.
VAFAEI *et al*., 2019	DMA, DMF, Gly, Trealose e Sacarose	HEPES, ác. cítrico, glicose, penicilina e EY	As amostras criopreservadas em DMA apresentaram maior MT em comparação as amostras com DMF e Gly. No geral, tanto as amostras com DMA como o DMF mostraram movimento espermático mais elevado que o Gly. Não foram observados efeitos notáveis da adição da sacarose ou trealose aos crioprotetores Gly, DMA e DMF, o que nega um possível sinergismo entre crioprotetores não penetrantes e penetrantes.
NEUHAUSER *et al*., 2019	-	INRA 96, BotuSêmen, EquiPlus e EquiPlus	Os extensores INRA 96 e BotuSêmen apresentaram valores mais elevados para MT e MP em comparação com o extensor EquiPlus + EquiPlus Freeze. O extensor EquiPlus + Gent Freeze situou-se entre INRA 96 e BotuSêmen. O extensor Gent + Gent Freeze apresentou os

		Freeze, Gent e Gent Freeze	valores mais baixos para a MT e MP em comparação com todos os outros extensores.
ALAMAARY *et al*., 2019	-	HF-20, Tris, INRA Freeze, EquipPlus Freeze	Observou-se maior motilidade nas amostras criopreservadas em HF-20 em relação ao extensor Tris. A MP para os extensores HF-20, INRA Freeze e EquiPlus foi mais elevada em comparação ao Tris. A IMS utilizando o extensor HF-20 foi maior em comparação ao Tris, mas não houve diferença entre o INRA Freeze e EquiPlus.
SICHTAR *et al*., 2019	-	Gent e Lact	Observou-se maior MT, MP e IMS, pós-descongelamento, ao se utilizar o extensor Gent.
SNOECK *et al*., 2019	-	Botucrio, Merk e INRA 82 modificado	O BotuCrio apresentou melhores resultados de motilidade do que o Merk e o INRA 82 modificado. A IMS não diferiu entre os extensores utilizados.
SNOECK *et al*., 2019	-	BotuCrio, EY e LDL	A MP foi maior no sêmen congelado com EY BotuCrio em comparação com 12% de LDL. Os extensores BotuCrio contendo EY e LDL apresentaram MT semelhante após descongelamento.
FERRER *et al*., 2020	BotuCrio, EZ Mixin Cryomax LE e EZ Mixin Cryomax MFR	INRA 96	O uso do EZ Mixin Cryomax MFR resultou em menor motilidade espermática e menor IMS pós-descongelamento. A MP não diferiu com o uso dos três extensores. Para garanhões “bons congeladores”, houve mais amostras com MP satisfatória quando BotuCrio ou EZ Mixin Cryomax LE foram utilizados.
NIKITKINA, *et al*., 2020	-	LCCY e Steridyl	Observou-se MT e MP mais elevada no sêmen congelado com Steridyl quando comparado com LCCY.
SNOECK *et al*., 2020	-	BotuCrio, BotuSêmen, TALP *sperm* e solução fisiológica	A rediluição em BotuCrio resultou em maior MT e MP quando comparado ao BotuSêmen e a solução fisiológica.
MOURA *et al*., 2022	Botucrio e sacarose (C, 25, 50 e 100mM)	Leite desnatado e/ou EY	A adição de [50 e 100 mM] de sacarose ao extensor resultou em maior MT em comparação ao grupo controle (sem sacarose). Os grupos de controle e de sacarose [25 mM] resultaram em MT inferior ao BotuCrio. Observou-se melhor MP para o BotuCrio do que o grupo controle e que

			todos os tratamentos com sacarose. O sêmen congelado, na presença de [100 mM] de sacarose, apresentou maiores porcentagens de espermatozóides com IMS e AIS entre os tratamentos.
HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2023	EY, SMEY, Gly e MF	INRA 96	O sêmen congelado em EY produziu valores mais altos de MT e MP pós-descongelamento em relação ao extensor SMEY, independentemente do crioprotetor penetrante utilizado.
RAMÍREZ-AGÁMEZ *et al*., 2023	MFR5, CMMFR5, LE e CMLE	INRA 96	A MT foi semelhante em LE e CMLE, e mais elevada do que para MFR5 e CMMFR5. A MP foi menor em LE do que em CMLE, porém, maior nestes do que em MFR5 e CMMFR5.

Fonte: do autor. Abreviações: BSA: albumina de soro bovino; Gly: glicerol; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MF: metilformamida; DMF: dimetilformamida; DMA: dimetilacetamida; EY: gema de ovo; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético ; SMEY: proteínas do leite; MFR5: extensor comercial contendo gema de ovo [2%] + leite + glicerol [4%]; CMMFR5: extensor comercial contendo gema de ovo [2%] + leite + glicerol [2%] + metilformamida [3%]; LE: extensor comercial contendo gema de ovo [20%] + glicerol [4,75%]; CMLE: extensor comercial contendo gema de ovo [20%] + glicerol [2%] + metilformamida [3%]; SKM: extensor à base de leite desnatado; MSKM: extensor à base de leite desnatado modificado; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; IMS: integridade de membrana plasmática; AIS: integridade de acrossoma.

6 DISCUSSÃO

6.1 Relevância da amostra, idade, raça e método de coleta na criopreservação

Nos estudos avaliados, o número de garanhões escolhidos como amostra variou entre dois a 25 animais. 19 autores avaliaram menos de dez animais e quatro autores avaliaram até 25 animais, o que torna o número de amostras pouco relevante. Este fator se faz importante, uma vez que garanhões de diferentes raças, e mesmo dentro da mesma raça, não respondem igualmente a criopreservação (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018). Deste modo, um maior número de garanhões como amostra pode ser escolhido ao buscar a padronização da criopreservação, visando atribuir resultados mais significativos em relação a espécie e raça, afim de avaliar a influência deste parâmetro na criopreservação.

O número de ejaculados nos estudos avaliados oscilou entre sete e 27 ejaculados, com exceção do estudo envolvendo a raça Kladruber em extinção, que avaliou 108 ejaculados. Um número considerável de garanhões tem baixa qualidade e fertilidade do sêmen pós-descongelamento. Além disso, os cavalos apresentam grandes variações entre garanhões e os ejaculados nos parâmetros espermáticos e na taxa de prenhez do sêmen congelado (ALAMAARY *et al*., 2019). Desta maneira, o estudo de um número maior de ejaculados podem permitir uma melhor avaliação da diferença entre os ejaculados e entre os garanhões, no processo de criopreservação.

Os animais envolvidos nos estudos possuíam entre dois e 29 anos de idade. O cavalo atinge a idade à puberdade, em média, com 14 meses (HENRY; ECHEVERRI, 2013) e há o aumento diário na produção de espermatozoides e da reserva epididimal até os 15 anos de idade (HAFEZ, 2004). Por esse motivo, as diferenças entre as idades avaliadas podem ter contribuído para a obtenção de um sêmen de má qualidade ou de um animal considerado “mau congelador”, o que afeta diretamente na qualidade do sêmen congelado.

As raças mais avaliadas dentre os estudos foram a Quarto de Milha, Mangalarga Marchador e Árabe, embora outras raças como a Espanhola, Hanoveriana, Marwari, Manipuri, Zanskari, Turcomanos, Standardbred, Paso Fino Colombiano e Kladruber (em extinção) também foram estudadas. As taxas de fertilidade do sêmen congelado são menores do que o sêmen resfriado ou fresco, e isso, está relacionado a grande variação entre os protocolos utilizados para o congelamento ou com a inclusão de garanhões que não possuam os parâmetros aceitáveis para o congelamento (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018). Costa *et al*. (2014) afirmam que entre as raças brasileiras, a Mangalarga Marchador está entre as de menor

resistência ao processo de congelamento, e esta variabilidade na resistência do espermatozoide ao processo, pode estar relacionada a fatores genéticos. Nesse sentido, avaliar diferentes protocolos em diferentes raças, pode contribuir para a padronização da obtenção de um sêmen de qualidade para a criopreservação nesta espécie, respeitando as características de cada raça.

O método de coleta mais utilizado dentre os estudos foi a VA, dentre elas a Missouri e Colorado, com ou sem o estímulo da égua no cio. A coleta do sêmen por VA é um método de fácil utilização, prático e barato, que facilita a coleta de sêmen à campo, principalmente de garanhões jovens. Contudo, a VA não representa uma situação fisiológica de monta natural, de modo que todos os fluidos se misturam em um volume total de ejaculado (OLIVEIRA, S. *et al*., 2017). Na ejaculação, também ocorre a liberação do plasma seminal, em frações distintas e através das contrações uretrais (FARIA; ATAIDES, 2020). O plasma seminal é uma mistura complexa de proteínas e substâncias não proteicas, como íons e substâncias orgânicas, que desempenha um papel importante na fisiologia do esperma (AL-ESSAWE, 2018). As proteínas presentes no plasma seminal podem proporcionar a fragilização da membrana da célula espermática e por esse motivo, a retirada do plasma antes do congelamento do sêmen pode contribuir na redução do número de lesões espermáticas e ajudar na preservação da viabilidade dos espermatozoides (FARIA; ATAIDES, 2020). Oliveira, S. *et al*. (2017) sugerem a coleta de sêmen fracionada por meio do uso de uma VA aberta, uma vez que há variações na composição do plasma seminal entre as frações do ejaculado, sendo a fração rica em espermatozoides mais tolerante ao processo de criopreservação em relação as outras frações. A retirada do plasma seminal no processo de criopreservação ainda é um ponto bastante discutido, bem como a influência do método de coleta do sêmen. Por esse motivo, a padronização destas etapas, podem contribuir para melhores resultados no congelamento do sêmen.

A escolha no período de coleta também sofreu variação entre os estudos analisados. A coleta foi realizada em variadas épocas do ano, durante ou fora da estação de monta, em dias alternados, com ou sem esgotamento epididimal. A estação do ano influencia nas características seminais, no comportamento sexual e na fertilidade do garanhão. A produção de espermatozóides e a libido dos garanhões são maiores durante a primavera e o verão e menores durante o outono e o inverno. A testosterona plasmática dos garanhões é influenciada pela estação e pode estar envolvida nas modificações das características seminais e comportamentais (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A maior produção de espermatozóides pelos garanhões ocorre após o pico estacional dos níveis plasmáticos de testosterona (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004).

Portanto, a época da coleta pode influenciar diretamente na qualidade do sêmen coletado, o que pode acarretar em alterações dos resultados após a criopreservação.

Na criopreservação de amostras epididimárias, advindas de animais castrados, os melhores resultados para as variáveis espermáticas descritas pelos autores Álvarez *et al*. (2019) e Neuhauser *et al*. (2019) (Tabela 5), foram registrados ao utilizar a trealose, em comparação a lactose, e para INRA 96 e BotuSêmen. O sêmen congelado epididimal, registrou melhores valores do que o sêmen congelado a partir do ejaculado. Estes resultados podem ser explicados, pela característica do esperma epididimal, que não teve exposição ao plasma seminal. Álvarez *et al*. (2019) afirmam que o plasma seminal possui um pH maior e maior conteúdo de íons Na^+ e Cl^-, que são prejudiciais à sobrevivência dos espermatozóides durante o processo de criopreservação. O plasma seminal é capaz de provocar efeitos deletérios a qualidade do esperma que aumentam a permeabilidade de membrana, causando mais suscetibilidade a danos por congelamento na membrana plasmática do espermatozoide. Neuhauser *et al*. (2019) afirmam que por este motivo, mecanismos de proteção se tornam relevantes ao esperma epididimal. Possivelmente, estes resultados podem indicar que o processo de criopreservação do sêmen do garanhão é afetado pela origem do esperma.

Os espermatozoides equinos são mais suscetíveis ao resfriamento e congelamento em decorrência da constituição de sua membrana plasmática, que tem uma menor proporção de colesterol para fosfolipídeos entre as espécies domésticas, o que o torna mais suscetível a mudanças em seu estado fluido e conformação durante o resfriamento, resultando em danos mecânicos e funcionais. Há também uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática do esperma, que são mais suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem acelerar o processo de peroxidação lipídica, levando o espermatozoide à morte. O sêmen equino também demonstra menor resistência osmótica durante as condições de congelamento, em comparação as demais espécies, e tem maior suscetibilidade a danos nas membranas mitocondrial e plasmática devido ao aumento do estresse osmótico induzido por crioprotetores permeáveis (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al*., 2018). A desestabilização da membrana plasmática e o estresse osmótico e oxidativos parecem ser as principais fontes de danos aos espermatozoides do garanhão durante o congelamento e descongelamento (NEUHAUSER *et al*., 2019). Por esse motivo, diluentes e crioprotetores são utilizados na tentativa de minimizar estes efeitos.

6.2 Influência do diluente e/ou crioprotetor nas variáveis espermáticas avaliadas

Nos estudos avaliados, o INRA 96 foi o diluente mais utilizado seguido do BotuCrio, de acordo com os resultados descritos (Tabela 5) para a escolha do diluente, pelos autores Hidalgo *et al*. (2018), Pérez-Marín *et al*. (2018), Álvarez *et al*. (2019), Neuhauser *et al*. (2019), Snoeck *et al*. (2019), Ferrer *et al*. (2020), Snoeck *et al*. (2020), Moura *et al*. (2022), Hernández-Avilés *et al*. (2023) e Ramírez-Agámez *et al*. (2023). Embora sejam fórmulas patenteadas, sabe-se que o INRA 96 possui em sua composição fosfocaseinatos nativos, açúcares como glicose e lactose, além de sais, tampões, antibióticos e antifúngico. Já o BotuCrio é composto por EY, açúcares, aminoácidos, conservantes, antibiótico, além de crioprotetores como MF (4%) e Gly (1%) (NEUHAUSER *et al*., 2019). Tanto o INRA 96 quanto o BotuCrio parecem apresentar os melhores resultados seminais pós descongelamento, embora nenhum estudo, tenha comparado diretamente os efeitos entre estes dois extensores, uma vez que o INRA 96 é considerado como extensor de resfriamento e o BotuCrio como extensor de congelamento. A presença da MF e do Gly no BotuCrio e a associação aos açúcares e a EY em sua fórmula, podem contribuir com melhores resultados em relação as alterações de membrana e motilidade no processo de criopreservação.

Entre os crioprotetores utilizados, conforme descrito (Tabela 5) pelos autores Hidalgo *et al*. (2018), Pérez-Marín *et al*. (2018), Silva *et al*. (2018), Hernández-Avilés *et al*. (2018 e 2023), Álvarez *et al*. (2019), Soni *et al*. (2019), Vafaei *et al*. (2019), Moura *et al*. (2022) e Ramírez-Agámez *et al*. (2023), observa-se uma grande busca pela melhor combinação e concentração de dissacarídeos (sacarose, trealose e lactose) associados ou não a outros crioprotetores como as amidas, o Gly, a EY e o leite desnatado. O Gly, é um poliálcool altamente permeável, mas que em altas concentrações, possui toxidade para a célula espermática. As amidas são compostos orgânicos que fazem ligações de hidrogênio, sendo menos viscosas e menos solúveis em água que o Gly, o que permite a elas uma menor permeabilidade de membrana e maior proteção ao espermatozoide ao estresse osmótico. Já a EY, contém lectina, e é capaz de proteger a membrana espermática por restaurar os lipídios perdidos durante o choque térmico, além de manter a viabilidade no armazenamento. As proteínas do leite, exercem um papel semelhante ao da EY na criopreservação, contudo, não são capazes de substituí-la completamente (CASTRO *et al*., 2017 e NIKITKINA *et al*., 2020).

Dos estudos que adotaram os dissacarídeos como crioprotetores, os melhores resultados foram registrados ao se utilizar sacarose, trealose e lactose em baixas concentrações. Estes resultados podem estar relacionados ao limite da capacidade de interação da membrana

do espermatozoide com estas substâncias. Hidalgo *et al*. (2018) afirma que o sêmen do garanhão é muito mais sensível à toxidade química ou choque osmótico induzido por maiores concentrações de sacarose, em comparação a outras espécies. A combinação de sacarose e trealose foram prejudiciais a AIS e IMS, o que não aconteceu ao utilizar [100 Mm] de sacarose, o que pode estar relacionado ao nível de toxidade, uma vez que a combinação de ambos pode ter atingido o nível máximo tolerável ou que tenha acontecido efeito sinérgico entre os açúcares. A taxa de resfriamento de 5°C em comparação a de 22°C também contribuiu para melhores resultados, o que pode estar relacionado com a adaptação da membrana do espermatozoide a uma temperatura mais próxima da criopreservação, podendo evitar assim, o choque térmico.

A utilização do Gly em concentrações baixas como a 1% ou em associação com o EDTA registrou piores resultados de parâmetros seminais, conforme descrito pelos autores Silva, J. *et al*. (2018), Hernández-Avilés *et al*. (2018) e Soni *et al*. (2019) (Tabela 5). Hernández-Avilés *et al*. (2018) sugerem a hipótese de que a presença de aminoácidos aromáticos na EY, presente no EDTA, associados com os efeitos negativos do Gly podem induzir uma produção excessiva de oxidantes no sêmen durante a criopreservação, elevando as porcentagens de espermatozoides com integridade e função alteradas. Essa hipótese pode justificar os menores resultados descritos quando o Gly foi associado ao EDTA.

Já o uso do Gly a 2%, 3% ou 5% de forma isolada ou em combinação com DMF, MF, resultou em melhores valores para as varáveis espermáticas descritas pelos autores Silva *et al*. (2018), Hernández-Avilés *et al*. (2018), Soni *et al*. (2019), Vafaei *et al*. (2019), Snoeck *et al*. (2020), Ferrer *et al*. (2020), Moura *et al*. (2022) e Ramírez-Agámez *et al*. (2023) (Tabela 5). O Gly, em decorrência da sua toxidade ao sêmen, vem sendo gradualmente utilizado em associação às amidas na criopreservação do sêmen equino. O Gly atua como um estabilizador da membrana plasmática da célula, o que reduz a desidratação celular, enquanto as amidas, por seu menor peso molecular, desempenham um papel na redução do estresse osmótico induzido pelo movimento do crioprotetor penetrante. Snoeck *et al*. (2019) afirmam que o baixo peso molecular das amidas favorece uma maior permeabilidade na membrana plasmática, resultando em um menor dano osmótico aos espermatozoides. Soni *et al*. (2019) também afirmam que, na espécie equina, diferentes concentrações de Gly são utilizadas, sendo necessário avaliar a toxidade destas concentrações, podendo utilizar as amidas como alternativa de substituição e combinação para situações em que for avaliado consequências dessa toxidade.

O uso dos extensores a base de EY, registrou melhores resultados para as variáveis espermáticas descritas pelos autores Alamaary *et al*. (2019), Sichtar *et al*. (2019), Snoeck *et al*.

(2019), Nikitkina *et al*. (2020), Hernández-Avilés *et al*. (2023) e Ramírez-Agámez *et al*. (2023) (Tabela 5), que os extensores contendo leite desnatado, mesmo em associação com a metilformamida. Nikitkina *et al*. (2020) afirmam que o fosfolipídio, o colesterol e o conteúdo de lipoproteína de baixa densidade da EY atuam como componentes protetores. Entretanto, o leite e a EY são fluidos biológicos e podem conter componentes desfavoráveis ao sêmen do garanhão. As lipoproteínas da EY, reduzem o efluxo de colesterol e fosfolipídios e reduzem a suscetibilidade do esperma à criocapacitação (FERRER *et al*., 2020). O que também pode justificar a diferença entre os resultados, uma vez que os crioprotetores de melhor resultado tinham em sua composição, maior concentração de EY. Ramírez-Agámez *et al*. (2023) levantaram a hipótese de que a menor concentração de EY no extensor poderia resultar numa remoção mais eficiente do colesterol da membrana plasmática do espermatozóide, facilitando a ocorrência de alterações associadas à capacitação e à fertilização. O que está de acordo com os menores resultados de membrana encontrados nos estudos ao se utilizar menor concentração de EY.

Ao se comparar os diluentes INRA 96, BotuSêmen, EquiPlus, EquiPlus Freeze, Gent e Gent Freeze, os melhores resultados para as variáveis espermáticas descritas pelos autores Neuhauser *et al*. (2019) (Tabela 5), foram registrados para o INRA 96 e BotuSêmen e os piores resultados para o Gent e Gent Freeze. O INRA 96 é um extensor baseado em fosfocaseinatos nativos e açúcares (glicose e lactose), enquanto o BotuSêmen é baseado em leite em pó desnatado e açúcares. Já o Gent possui em sua composição leite desnatado, EY e açúcares (NEUHAUSER *et al*., 2019). A diferença nos resultados encontrados pode estar relacionada a diferença de composição e combinação entre os componentes de cada extensor. Neuhauser *et al*. (2019) afirma que o caseinato, presente na composição do INRA 96, tem sido utilizado de forma eficaz para proteger o sêmen durante o resfriamento e congelamento. Já os resultados com o Gent, podem estar associados a interferência das lipoproteínas de baixa densidade presentes na EY que podem interagir com as proteínas do plasma seminal.

Ao comparar o HF-20, INRA Freeze, EquiPlus e Tris, os piores resultados para as variáveis espermáticas descritas pelos autores Alamaary *et al*. (2019) (Tabela 5), foram registrados para o extensor Tris, enquanto os melhores resultados para o extensor HF-20. O HF-20 é composto por açúcares, EY e Gly 3%. O Tris, contém frutose, Gly e EY. Essa diferença nos resultados, pode ter sido influenciada pelas altas concentrações e tipos de açúcares encontrados no HF-20, que fornecem energia ao extensor, diferentemente do Tris que possui

em sua composição somente a frutose. Elevadas concentrações de EY no Tris também podem estar relacionadas aos resultados encontrados.

O extensor BotuCrio contendo MF e Gly, registrou resultados superiores de acordo com os valores para as variáveis espermáticas descritos pelos autores Snoeck *et al*. (2019) (Tabela 5), para preservar o sêmen equino durante a criopreservação em comparação aos extensores Merk, a base de EY, e INRA 82 modificado com a adição de acetamida, metilcelulose e trealose em substituição do Gly. Deste modo, pode-se deduzir que a composição do BotuCrio é superior a composição do Merk e do INRA 82 modificado, dada a combinação de substâncias crioprotetores intracelulares e extracelulares que podem desempenhar papel importante na criopreservação dos espermatozoides, ou mesmo que a associação de MF e Gly oferece melhor crioproteção ao espermatozoide equino (SNOECK *et al*., 2019).

Ao comparar o BotuCrio EY com o BotuCrio suplementado com 12% de LDL, o extensor a base de EY apresentou melhores resultados para as variáveis espermáticas descritas pelos autores Snoeck *et al*. (2019) (Tabela 5). As lipoproteínas de baixa densidade extraídas da EY, assim como o LDL tem capacidade protetora às membranas dos espermatozoides, associados as proteínas do plasma seminal, impedindo o efluxo de colesterol da membrana e promovendo a capacitação desejada durante a criopreservação (SNOECK *et al*., 2019). As diferenças encontradas nos resultados, podem estar relacionadas a concentração de LDL suplementada ou a interação negativa entre o LDL e outros componentes do BotuCrio.

Os resultados do extensor Steridyl, ao ser comparado ao LCCY foram mais elevados para as variáveis espermáticas analisadas e descritas pelos autores Nikitkina *et al*. (2020) (Tabela 5). O Steridyl contém frutose em sua composição, enquanto o LCCY é baseado em lactose. O Steridyl é um extensor que foi desenvolvido para o congelamento do sêmen de ruminantes, mas que apresentou bons resultados quando utilizados em equinos. A principal vantagem do Steridyl é o fato de já conter EY estéril, sendo apenas necessário adicionar água estéril ao concentrado (NIKITKINA *et al*., 2020). Contudo, os resultados registrados podem ser justificados pelo fato de não se conhecer por completo a composição do Steridyl, podendo existir combinações melhores em sua composição que contribuíram para os resultados encontrados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados avaliados nesta revisão permitiram concluir que o uso dos diluentes INRA 96 e BotuCrio promovem melhores resultados seminais após o descongelamento. O Botucrio, quando comparado ao BotuSêmen, Merk, INRA 82 modificado e sacarose [25mM], também apresentou melhores resultados. O BotuCrio suplementado com EY registrou melhores resultados que o BotuCrio suplementado com LDL. Vale destacar, que o BotuCrio também pode ser adotado como extensor de congelamento. Os extensores a base de EY e Gly ou EY, Gly e MF apresentaram piores resultados seminais que extensores a base de EY + Gly + leite e EY + Gly + MF + leite. Nesse sentido, faz-se necessário pesquisas que avaliem o uso do INRA 96 em comparação ao BotuCrio. Assim como, o BotuCrio suplementado com EY.

Com relação aos crioprotetores, observou-se melhores resultados ao se utilizar sacarose e trealose em baixas concentrações. A adição de sacarose em concentrações de [0,15M, 0,30M, 20mM, 50mM e 100mM] apresentou melhores parâmetros seminais. Já a trealose, apresentou melhores resultados, nas concentrações de [0,15M]. O uso da trealose e lactose em amostras epididimárias resultou em melhores parâmetros que para o sêmen ejaculado. O contrário, se observou ao utilizar a lactose. A utilização de Gly em concentrações de 2%, 3% e 5% registrou melhores parâmetros, assim como a combinação de Gly 2,5% e DMF 2,5%. A DMF na concentração de 5%, isolada, apresentou melhores parâmetros seminais. O contrário, ocorreu ao se associar Gly e EDTA. Deste modo, deve-se avaliar o uso de sacarose ou trealose, nas concentrações descritas, em combinação com DMF 2% e 5% e/ou em associação com Gly 2%, 3% e 5%.

Além disso, faz-se necessário estudos visando avaliar o método de coleta do sêmen, a qualidade seminal, a influência das raças, a adição do plasma seminal, da centrifugação ou filtração, bem como a curva de congelamento, o mecanismo de envase e o transporte do sêmen congelado, de forma isolada, permitindo a padronização de todo o processo de criopreservação.

A MT, MP, IMS e AIS são parâmetros que nos permitiram avaliar a qualidade seminal pós-descongelamento, bem como a influência do uso e combinação do diluente e/ou crioprotetor escolhido, e podem ser correlacionadas com outros parâmetros na avaliação do sêmen congelado, tais como a VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH e BCF.

8 REFERÊNCIAS

AIDAR, N. B. **Criopreservação de Sêmen Equino.** 2013. 51 f. Trabalho de Conclusão de Conclusão de Curso – Universidade de Brasília, 2013.

ALAMAARY, M. S. *et al*. **Effects of four extenders on the quality of frozen semen in Arabian stallions**. Veterinary World. v. 12, p. 34-40. 2019.

AL-ESSAWE, E. M. et al. **Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm**. Theriogenology. v. 115, p. 99-107. 2018.

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T. do. **Biotecnologia em reprodução equina:** o que há de novo para o veterinário de campo. 2021. Disponível em: http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ebba64683df2af06431d7ebb278a8000.pdf. Acesso em: 13 jun. 2023.

ÁLVAREZ, C. *et al*. **Ejaculated compared with epididymal stallion sperm vitrification**. Animal Reproduction Science. v. 211, n. 106205, p. 1-7. 2019.

BRANDÃO, I. de S. L. **Influência do tempo na fertilidade do sêmen descongelado de garanhões na raça Quarto de Milha.** 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2020.

CANISSO, I. F. *et al*. **Inseminação Artificial em Equinos:** sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 389-398. 2008.

CASTRO, C. da S. *et al*. **Aplicação da criopreservação em sêmen equino.** Revista Espacios. v. 38, n. 42, p. 18. 2017.

CLULOW, J.; GIBB, Z. **Liquid storage of stallion spermatozoa – Past, present and future**. Animal Reproduction Science. v. 247, n. 107088, p. 1-10. 2022.

COELHO, R. W. de A.; DIAS, J. C. O. **Congelação de sêmen equino após 24 horas de resfriamento.** Research, Society and Development. v. 10, n. 1, p. 1-21. 2021.

CONSUEGRA, C. *et al*. **Low-density lipoproteins and milk serum proteins improve the quality of stallion sperm after vitrification in straws.** Reproduction in Domestic Animals. v. 54, p. 86-89. 2019.

COSTA, A. B.; ZOLTOWSKI, A. P. C. **Como escrever um artigo de revisão sistemática**. *In*: KOLLER, S. H.; COUTO, M. C. P. de P.; HOHENDORFF, J. V. Manual de produção científica. Porto Alegre: Penso. p. 53-67. 2014.

COSTA, D. N. M. *et al*. **Eficiência dos diluidores Tris e Botu-Crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador.** Ciência Animal Brasileira. Goiânia. v. 15, n. 3, p. 322-329. 2014.

FARIA, L. C. de; ATAIDES, J. L. de S. **Avaliação da longevidade de espermatozoides equinos congelados e descongelados submetidos a centrifugação e filtração.** Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Programa de Iniciação Científica. Brasília. 2020.

FERRER, M. S. *et al*. **Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen.** Animal Reproduction Science. v. 221, n. 106581, p. 1-9. 2020.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.** 7 ed. Tradução de: Reproduction in farm animals. ISBN 85-204-1222-X. Barueri, SP: Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.** 7 ed. Tradução de: Reproduction in farm animals. ISBN 85-204-1222-X. Barueri, SP: Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Transporte e sobrevivência de gametas. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.** 7 ed. Tradução de: Reproduction in farm animals. ISBN 85-204-1222-X. Barueri, SP: Manole, 2004.

HENRY, M; ECHEVERRI, A. M. L. **Andrologia Veterinária Básica.** Belo Horizonte: CAED – UFMG. 2013.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al*. **Effects of egg yolk level, penetrating cryoprotectant, and pre-freeze cooling rate, on the post-thaw quality of stallion sperm.** Animal Reproduction Science. v. 248, n. 107162, p. 1-15. 2023.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al*. **Evaluation of Post-Thaw Sperm Function and Integrity Parameters Under Different Freezing Regimens in Colombian Paso Fino Stallions.** Journal of Equine Veterinary Science. v. 67, p. 7-14. 2018.

HIDALGO, M. *et al*. **Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success.** Animal Reproduction Science. v. 196, p. 91-98. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Rebanho de equinos (cavalos) no Brasil. 2023.** Disponível em: https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br. Acesso em: 13 jun. 2023.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, B. Fertilidade reprodutiva em machos. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal.** 7 ed. Tradução de: Reproduction in farm animals. ISBN 85-204-1222-X. Barueri, SP: Manole, 2004.

LIMA, H. C. G. *et al*. **Comportamento Reprodutivo de Equinos:** Equuscaballus (Perissodactyla: Equidae). UNICIÊNCIAS. v. 23, n. 2, p. 110-114. 2019.

MIRANDA, G. S. *et al*. **Importância do melhoramento genético para os equinos da raça Quarto de Milha – Revisão de Literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária da FAEF. n. 35, p. 1-15. 2020.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; PRISMA GROUP. **Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses**: the PRISMA statement. PLoS Medicine, v. 6, n. 7, p. e1000097. 2009.

MOURA, T. C. M. *et al*. **Diluent Containing Dimethylformamide Added With Sucrose Improves In Vitro Quality After Freezing/Thawing Stallion Sperm.** Journal of Equine Veterinary Science. v. 109, n. 103825, p. 1-5. 2022.

NEUHAUSER, S. *et al*. **Comparison of the Effects of Five Semen Extenders on the Quality of Frozen-Thawed Equine Epididymal Sperm.** Journal of Equine Veterinary Science. v. 79, p. 1-8. 2019.

NIKITKINA, E. *et al*. **Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions.** Animals. v. 10, p. 1-9. 2020.

OLIVEIRA, G. C. *et al*. **Criopreservação do sêmen equino:** uma revisão. Rev. Bras. Reprod. Anim.. Belo Horizonte. v. 37, n. 1, p. 23-28. 2013.

OLIVEIRA, R. L. *et al*. **Inseminação artificial em equinos**. IV Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar. II Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar. UNIFIMES, 2019.

OLIVEIRA, S. N. *et al*. **Colheita fracionada e seus principais benefícios na criopreservação do sêmen de garanhões.** Veterinária e Zootecnia. v. 24, n. 3, p. 435-443. 2017.

ORSOLINI, M. F. *et al*. **An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine Embryo Production:** Section I. Animals. v. 11, n. 3248, p. 1-15. 2021.

PAPIN, J. et al. **Stored Stallion Sperm Quality Depends on Sperm Preparation Method in INRA82 or INRA96.** Journal of Equine Veterinary Science. v. 98, n. 103367, p. 1-8. 2021.

PEREIRA, G. L. *et al*. **Perspectivas do uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de equinos de corrida da raça Quarto de Milha.** Veterinária e Zootecnia. v. 22, n. 3, p. 347-369. 2015.

PÉREZ-MARÍN, C. C. *et al*. **Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results.** Cryobiology. v. 80, p. 62-69. 2018.

RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. *et al*. **Sperm factors associated with the production of equine blastocysts by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen/thawed semen.** Theriogenology. v. 195, p. 85-92. 2023.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. **Biotecnologias da reprodução animal:** de Aristóteles à edição gênica. **Anais** do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019); Gramado – RS. 2019.

SAADELDIN, I. M. *et al*. **The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation.** Animals. v. 10. n. 2281, p. 1-16. 2020.

SICHTAR, J. *et al*. **Improvement in Semen Conservation of the Indigenous Czech Endangered Old Kladruber Horse:** Special Focus on the Type of Extender and Packaging System. Journal of Equine Veterinary Science. v. 72, p. 101-107. 2019.

SILVA, J. C. F. *et al*. **Freezing of stallion semen: I – In vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved under different glycerol concentrations.** Pferdeheilkunde - Equine Medicine. v. 34, p. 51-56. 2018.

SILVA, M. R. *et al*. **Utilização da transferência de embriões em equinos**. IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal. 2019.

SILVA, Y. F. R. S.; MONTEIRO, G. A. **Tecnologias para criopreservação de sêmen em equinos.** IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal. 2019.

SNOECK, P. P. N. *et al*. **Can we use LDL instead of egg yolk in BotuCrio® extender to cryopreserve sperm from the Mangalarga Marchador stallion?** Animal Reproduction. v. 16, n. 2, p. 340-347. 2019.

SNOECK, P. P. N. *et al*. **Padronização do Sperm Class Analyzer® (SCA®) para avaliação de espermatozoides equinos criopreservados.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 72, n. 4, p. 1163-1171. 2020.

SONI, Y. *et al*. **Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds.** Cryobiology. v. 86, p. 52-57. 2019.

VAFAEI, F. *et al*. **Influence of Different Combinations of Permeable and Nonpermeable Cryoprotectants on the Freezing Capacity of Equine Sperm. Journal of Equine Veterinary Science.** v. 75, p. 69-73. 2019.

VIEIRA, E. R. *et al*. **Caracterização da equideocultura no estado de Minas Gerais**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 67, n. 1, p. 319-323, 2015.

ZAMAI, M. F. *et al*. **Panorama das publicações científicas sobre reprodução animal: 2000 a 2017.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 16 n. 29, p. 1149-1160. 2019.