

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 24/08/2026.

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

**AVANÇOS NA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN ASININO (*EQUUS
ASINUS*)**

AMANDA CARVALHO SILVA

Botucatu, SP
Fevereiro - 2026

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

**AVANÇOS NA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN ASININO (*EQUUS
ASINUS*)**

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

Amanda Carvalho Silva
Orientador: Prof. Dr. Lorenzo G. T. M.
Segabinazzi
Coorientador: Prof. Dr. Gabriel Augusto
Monteiro

Botucatu, SP
Fevereiro - 2026

S586a

Silva, Amanda Carvalho

Atualizações na refrigeração de sêmen asinino (*Equus asinus*) / Amanda Carvalho Silva. -- Botucatu, 2026

78 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Lorenzo Garrido Teixeira Martini Segabinazzi

Coorientador: Gabriel Augusto Monteiro

1. Diluente. 2. Jumento. 3. Refrigeração. 4. Sêmen. I. Título.

Nome do autor (a): Amanda Carvalho Silva

Título: Avanços na refrigeração de sêmen asinino (*Equus asinus*)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lorenzo G. T. M. Segabinazzi

Presidente e Orientador

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

Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro

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

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Membro

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAV – UnB, Brasília/DF

Data da defesa: 24 de Fevereiro de 2025

AGRADECIMENTOS

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

RESUMO

SILVA, A.C. **AVANÇOS NA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN ASININO (*EQUUS ASINUS*)**

Botucatu – SP. 2025. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Apesar da expansão do mercado de asininos e muares, as biotécnicas reprodutivas utilizadas ainda são amplamente extrapoladas da espécie equina, frequentemente resultando em eficiência subótima. Evidências indicam que diluentes convencionais à base de leite desnatado não mantêm adequadamente a viabilidade espermática em asininos e que a adição de colesterol ou o uso de diluentes contendo gema de ovo pode melhorar a preservação celular, porém estudos de fertilidade foram conduzidos predominantemente em éguas. Assim, este trabalho avaliou o efeito de diferentes diluentes comerciais, da retirada de plasma seminal e da adição de gema de ovo sobre a qualidade espermática e fertilidade em jumentas. No primeiro experimento, amostras de sêmen foram refrigeradas nos seguintes grupos: diluente à base de leite com colesterol (BS – BotuSêmen Special®; controle), diluente à base de caseinato de sódio com colesterol (BG – BotuSêmen Gold®), diluente à base de gema de ovo com crioprotetores (BC – BotuCrio®), BotuCrio® sem crioprotetores (BC-Sc) e BotuCrio® com substituição da gema de ovo por caseinato de sódio (BCC). Um experimento adicional comparou BG com BG sem plasma seminal (BG-sP). A fertilidade e a contagem de polimorfonucleares (PMN) foi testada em jumentas inseminadas com BG, BC, BC-Sc e BC-sP, que apresentaram melhor cinética espermática. Posteriormente, avaliou-se a adição de diferentes proporções de BotuCrio e gema de ovo ao BG: BG, BG+2% gema de ovo (BG2E), BG+10% gema de ovo (BG10E), BC, BG+2% BC (BG2BC), BG+10% BC (BG10BC) e BG+20% BC (BG20BC). As taxas de fertilidade foram comparadas entre BG e BG20BC. Por fim, um último experimento comparou a cinética do sêmen refrigerado a 5 °C em BG, BG sem plasma seminal (BG-P), BG+20% BC (BGBC), BGBC sem plasma seminal (BGBC-P), INRA 96 (IN), IN sem plasma seminal (IN-P), IN+20% BC (INBC) e INBC sem plasma seminal (INBC-P). Os resultados demonstraram que a gema de ovo foi mais determinante que o colesterol para melhorar e manter a qualidade espermática de sêmen asinino refrigerado e que a retirada do plasma seminal beneficiou os resultados de cinética espermática. A seguir, os resultados indicaram que a adição de 20% de BotuCrio associada à remoção do plasma seminal retornou os melhores resultados de cinética, enquanto a fertilidade e a contagem de PMN não foi afetada pelos diferentes tratamentos.

Palavras-chave: Diluente; jumento; refrigeração; semen.

ABSTRACT

SILVA, A.C. **ADVANCES IN DONKEY (EQUUS ASINUS) SEMEN COOLING**
Botucatu – SP. 2025. Master's Thesis – São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – Botucatu Campus

Despite the expansion of the donkey and mule market, available reproductive biotechniques are still largely extrapolated from the equine species, frequently resulting in low efficiency. Evidence indicates that conventional skim milk-based extenders do not adequately maintain sperm viability in donkeys and that the addition of cholesterol or the use of egg yolk-containing extenders may improve cellular preservation; however, fertility studies have been conducted predominantly in mares. Thus, this study evaluated the effect of different commercial extenders, seminal plasma removal, and the addition of egg yolk on sperm quality and fertility in jennies. In the first experiment, semen samples were cooled in the following groups: milk-based extender with cholesterol (BS – BotuSêmen Special®; control), sodium caseinate-based extender with cholesterol (BG – BotuSêmen Gold®), egg yolk-based extender with cryoprotectants (BC – BotuCrio®), BotuCrio® without cryoprotectants (BC-Sc), and BotuCrio® with the replacement of egg yolk by sodium caseinate (BCC). An additional experiment compared BG with BG without seminal plasma (BG-sP). Fertility and polymorphonuclear (PMN) counts were tested in jennies inseminated with BG, BC, BC-Sc, and BG-sP, which exhibited superior sperm kinetics. Subsequently, the addition of different proportions of BotuCrio and egg yolk to BG was evaluated: BG, BG+2% egg yolk (BG2E), BG+10% egg yolk (BG10E), BC, BG+2% BC (BG2BC), BG+10% BC (BG10BC), and BG+20% BC (BG20BC). Fertility rates were compared between BG and BG20BC. Finally, a last experiment compared the kinetics of semen cooled at 5 °C in BG, BG without seminal plasma (BG-P), BG+20% BC (BGBC), BGBC without seminal plasma (BGBC-P), INRA 96 (IN), IN without seminal plasma (IN-P), IN+20% BC (INBC), and INBC without seminal plasma (INBC-P). The results demonstrated that egg yolk was more determinant than cholesterol in improving and maintaining the quality of cooled donkey sperm, and that the removal of seminal plasma benefited sperm kinetic outcomes. Furthermore, the results indicated that the addition of 20% BotuCrio associated with the removal of seminal plasma yielded the best kinetic results, while fertility and PMN counts were not affected by the different treatments.

Keywords: donkey; extender; cooled semen

LISTA DE SIGLAS

ABCJPêga: Associação Brasileira dos Criadores de Jumento Pêga

BSP: *bindin of sperm protein*

CASA: *computer-assisted semen analysis*

CBRA: colégio brasileiro de reprodução animal

COX-2: ciclooxygenase-2

DNA: ácido desoxirribonucléico

EROs: espécies reativas de oxigênio

IA: inseminação artificial

IMP: integridade de membrana plasmática

LDL: *low density lipoprotein*

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

O₂⁻: ânion superóxido

PH: potencial hidrogeniônico

PMM: potencial de membrana mitocondrial

PMN: polimorfonuclear

PS: plasma seminal

PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados

RAP: porcentagem de espermatozoides rápidos

UHT: ultra high temperature

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: ilustração simplificada da genealogia das espécies *Equus caballus* e *Equus asinus* dentro do grupo *Perissodactyla*, baseada em Tougard et al., 2001, Steiner & Ryder, 2011 e Cozzuoul et al., 2013.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sumário Comparativo dos Estudos de Fertilidade em Éguas e Asininas Inseminadas com Sêmen Refrigerado, Avaliando Diferentes Bases Diluidoras e a Presença de Plasma Seminal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Asininos.....	4
2.2. Célula espermática	6
2.3. Membrana plasmática	8
2.4. Plasma seminal	9
2.5. Diluentes.....	10
2.6. Crioproterores.....	11
2.6. Refrigeração de sêmen.....	12
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
4. HIPÓTESE E OBJETIVOS	16
4.1. Hipótese.....	16
4.2. Objetivos.....	16
4.2.1 Objetivo gerais	17
4.2.2 Objetivo específicos	17

5. REFERÊNCIAS	18
-----------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Apesar da proximidade filogenética entre equinos (*Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*), as espécies diferem em anatomia, fisiologia, comportamento e necessidades de manejo. Tais diferenças refletem nas biotécnicas aplicadas à reprodução. Apesar do crescimento exponencial do mercado de asininos e muares no mundo, as biotécnicas aplicadas a esses animais ainda são extrapoladas da espécie equina, o que algumas vezes desencadeia resultados frustrantes nessa cadeia produtiva.

Asininos e muares compuseram uma fração importante das tropas utilizadas para trabalho e transporte em todo o mundo. A mecanização do trabalho e o êxodo rural, no entanto, contribuíram para o desinteresse nesses animais para ao trabalho de campo (1). Apesar de o consumo da carne de jumento não ser tão comum, há um recente interesse da indústria pelo leite de jumentas, principalmente para uso na indústria cosmética (2).

Enquanto algumas raças correm risco de extinção, outros locais como o Nordeste Brasileiro, regiões áridas dos Estados Unidos e Caribe a superpopulação de jumentos é um problema (3). Ainda sob outra perspectiva, existem raças em crescimento exponencial principalmente devido à valorização dos seus produtos, como o jumento Pêga, raça brasileira que conta com associação (ABCJPêga – Associação Brasileira de Criadores do Jumento Pêga) e provas de morfologia e marcha espalhadas por todo o país.

Além disso, a produção de híbridos movimentou o mercado equestre e os centros de pesquisa em biotécnicas da reprodução. Cavalos e jumentos possuem números diferentes de cromossomos (64 e 62, respectivamente), enquanto os seus produtos apresentam 63 cromossomos e, como consequência, são estéreis. Mulas e burros, produzidos pelo cruzamento entre um macho de espécie asinina e uma fêmea de espécie equina, são amplamente utilizados na lida com o gado, em cavalgadas e em provas de marcha, e apesar de estéreis, mulas podem ser utilizadas como receptoras de embrião. Por outro lado, o cruzamento entre um macho da espécie equina e uma fêmea asinina, que produz um bardoto, desperta curiosidade pelas baixas taxas de fertilidade (4).

Apesar de apresentar ótimos resultados de fertilidade com sêmen fresco tanto em éguas quanto em jumentas, o sêmen refrigerado e congelado de

jumentos ainda não retorna resultados satisfatórios (5,6). Os processos de refrigeração e criopreservação de sêmen se apoiam em anos de estudo a respeito da composição, do funcionamento e das demandas nutricionais da célula espermática, além da compreensão da fisiologia reprodutiva das fêmeas que vão receber esse sêmen.

O crescente interesse na reprodução de asininos desencadeou a percepção de que as biotécnicas aplicadas à reprodução equina não retornam os mesmos resultados quando extrapoladas para a espécie asinina. Extrapolar biotécnicas desenvolvidas para equinos é ignorar a complexidade e a individualidade da espécie asinina e esperar os mesmos resultados sem o mesmo nível de compreensão da espécie (4–7).

A necessidade de controle populacional, proteção de raças ameaçadas e as demandas comerciais de raças valorizadas indicam a urgência de maior compreensão da anatomia, fisiologia e comportamento dessa espécie e do desenvolvimento de novas biotecnologias aplicáveis especificamente à espécie asinina. Dessa forma, diversos estudos são conduzidos há anos para desvendar os mistérios que permeiam a reprodução de jumentos (3–8).

Para asininos, a utilização de sêmen criopreservado ainda não é uma realidade. O sêmen asinino pode ser criopreservado, entretanto, as taxas de fertilidade quando utilizado para inseminar jumentas é muito baixa, impossibilitando a aplicação dessa biotécnica na espécie (5,9). Essa particularidade torna mais urgente a compreensão dos processos de refrigeração para a espécie, já que, além de ser a única alternativa viável até o momento, a compreensão dos desafios do sêmen asinino refrigerado pode ajudar a desvendar as dificuldades enfrentadas para a utilização desse mesmo sêmen criopreservado.

A utilização de sêmen refrigerado permite o estreitamento de fronteiras, a proteção contra a disseminação de doenças e facilita o manejo reprodutivo da fêmea, mas, para tal, se faz necessária a utilização de meios diluentes e sistemas de refrigeração. Aparentemente, o sêmen asinino é capaz de suportar a taxa de refrigeração aplicada à espécie equina, entretanto, os diluentes à base de leite desnatado utilizados para equinos não retornam bons resultados para asininos (6,7).

Estudos recentes indicam que a adição de fontes de colesterol pode ser

1 benéfica para a manutenção da qualidade espermática (3,6), além de que o
2 sêmen asinino refrigera melhor quando exposto a caseína ou gema de
3 ovo (10,11), entretanto, não existem ainda protocolos bem definidos ou
4 diluentes comerciais para a refrigeração de sêmen asinino.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

5. REFERÊNCIAS*

1. Rota A, Magelli C, Panzani D, Camillo F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology*. 2008 May 15;69(2):176–85. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.003 PubMed PMID: 17945340.
2. Camillo F, Rota A, Biagini L, Tesi M, Fanelli D, Panzani D. The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. *Journal of Equine Veterinary Science*. W.B. Saunders; 2018. p. 44–9. doi:10.1016/j.jevs.2017.11.008
3. Canisso IF, Panzani D, Miró J, Ellerbrock RE. Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. W.B. Saunders; 2019. p. 607–42. doi:10.1016/j.cveq.2019.08.014 PubMed PMID: 31672204.
4. Fanelli D, Tesi M, Monaco D, Diaz-Jimenez M, Camillo F, Rota A, et al. Deep-horn Artificial Insemination With Frozen Thawed Semen After re-extension in Autologous Seminal Plasma May Improve Pregnancy Rates in Jennies. *J Equine Vet Sci*. 2022 May 1;112. doi:10.1016/j.jevs.2022.103932 PubMed PMID: 35283216.
5. Vidament M, Vincent P, Martin FX, Magistrini M, Blesbois E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci*. 2009 May;112(1–2):22–35. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.03.016 PubMed PMID: 18502059.
6. Segabinazzi LGTM, Scheeren VF da C, Freitas-Dell'Aqua C de P, Papa FO, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA, et al. Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Addition to Skim Milk-Based Extender Enhances Donkey Semen Cooling and Fertility in Horse Mares. *J Equine Vet Sci*. 2021 Oct 1;105. doi:10.1016/j.jevs.2021.103719 PubMed PMID: 34607680.
7. M Gobato MLDPS, Miro J, Gaitskell-Phillips G, Carluccio A, T M Segabinazzi LG, M Gobato ML, et al. Ability of donkey sperm to tolerate cooling: Effect of extender base and removal of seminal plasma on sperm parameters and fertility rates in mares. 2022. Report.
8. Morais RNMRGVWG. REPRODUCTIVE BIOLOGY OF DONKEY. II. PHYSICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEMEN. 1994. Report.
9. Oliveira JV de et al. . Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim Reprod Sci*. 2006 Aug;94(1–4):82–4. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.010
10. de Melo MIV et al. USO DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE E DE GEMA DE OVO NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN ASININO RESFRIADO A 6°C Maria Isabel Vaz de Melo¹, Yolanda de Fátima Resende², Elton Pavão Rezende², Paola Per. 2012.

* Referências organizadas de acordo com as regras de estilo e formato para referências do *International Committee of Medical Journals Editor (ICMJE)* intitulada *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly work in Medical Journals – Recommendations ICMJE - Vancouver*

- 1 11. Luiza M, Gobato M, Paulo BS. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE
2 MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA
3 QUALIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE JUMENTO PÊGA (*Equus*
4 *asinus*). Report.
- 5 12. Steiner CC, Ryder OA. Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla. *Zool J*
6 *Linn Soc.* 2011 Dec;163(4):1289–303. doi:10.1111/j.1096-3642.2011.00752.x
- 7 13. Mcdonnell SM. Reproductive behavior of donkeys *Equus asinus*. *Applied Animal*
8 *Behaviour Science*. 1998. Report.
- 9 14. Segabinazzi LGTM, Landers M, Kent A, Peterson E, Gilbert R, French H. Efficacy and Side
10 Effects of Low Single Doses of Cloprostenol Sodium or Dinoprost Tromethamine to
11 Induce Luteolysis in Donkeys. *J Equine Vet Sci.* 2021 Dec 1;107.
12 doi:10.1016/j.jevs.2021.103774 PubMed PMID: 34802629.
- 13 15. Segabinazzi LGTM, Gilbert RO, Ambrosia RL, Bergfelt DR, Samper JC, Peterson EW, et al.
14 Structural and Functional Dynamics of the Ovary and Uterus during the Estrous Cycle in
15 Donkeys in the Eastern Caribbean. *Animals.* 2023 Jan 1;13(1). doi:10.3390/ani13010074
- 16 16. Panzani D, Tardella M, Govoni N, Tesi M, Fanelli D, Rota A, et al. Effect of the
17 administration of alfaprostol 3 or 6 days after ovulation in jennies: ultrasonographic
18 characteristic of corpora lutea and serum progesterone concentration. *Theriogenology.*
19 2018 Nov 1;121:175–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.08.014 PubMed PMID:
20 30165306.
- 21 17. Carluccio A, Panzani S, Contri A, Tosi U, De Amicis I, Veronesi MC. Luteal function in
22 jennies following PGF 2α treatment 3 days after ovulation. *Theriogenology.* 2008 Jul
23 1;70(1):121–5. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.03.010 PubMed PMID: 18439666.
- 24 18. Miró J, Papas M. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control
25 in Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science.* W.B. Saunders; 2018. p. 38–43.
26 doi:10.1016/j.jevs.2017.11.007
- 27 19. Kreider JL, Ogg WL, Turner JW. INFLUENCE OF PROSTAGLANDIN F $_{2a}$ ON SPERM
28 PRODUCTION AND SEMINAL CHARACTERISTICS OF THE STALLION. 1981. Report.
- 29 20. Mcdonnell SM. EJACULATION Physiology and Dysfunction. Vol. 8. 1992. Report.
- 30 21. Panzani D, Quaresma M, Fanelli D, Camillo F, Moroni R, Rota A, et al. Hastening time to
31 ejaculation in donkey jacks treated with the pgf 2α analog, cloprostenol sodium.
32 *Animals.* 2020 Dec 1;10(12):1–11. doi:10.3390/ani10122231
- 33 22. Panzani D, Quaresma M, Fanelli D, Camillo F, Moroni R, Rota A, et al. Hastening time to
34 ejaculation in donkey jacks treated with the pgf 2α analog, cloprostenol sodium.
35 *Animals.* 2020 Dec 1;10(12):1–11. doi:10.3390/ani10122231
- 36 23. Veronesi MC, De Amicis I, Panzani S, Kindahl H, Govoni N, Probo M, et al. PGF 2α , LH,
37 testosterone, oestrone sulphate, and cortisol plasma concentrations around sexual
38 stimulation in jackass. *Theriogenology.* 2011 May;75(8):1489–98.
39 doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.010 PubMed PMID: 21295832.

- 1 24. Cruz DF, Freitas MJ, Patrício A, Fardilha M. Vias de sinalização reguladoras das funções
2 do espermatozoide. *Revista Internacional de Andrologia*. Ediciones Doyma, S.L.; 2014.
3 p. 104–11. doi:10.1016/j.androl.2014.04.006
- 4 25. Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Vet*
5 *J*. 2015 Jan 1;47(1):16–24. doi:10.1111/evj.12308 PubMed PMID: 24943233.
- 6 26. Orsolini MF, Meyers SA, Dini P. An update on semen physiology, technologies, and
7 selection techniques for the advancement of in vitro equine embryo production:
8 Section i. *Animals*. MDPI; 2021. doi:10.3390/ani11113248
- 9 27. Brito LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine*
10 *Practice*. 2007 Dec;6(4):249–64. doi:10.1053/j.ctep.2007.09.004
- 11 28. Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability,
12 fertility and cryopreservation. *Micron*. 2006. p. 597–612.
13 doi:10.1016/j.micron.2006.02.006 PubMed PMID: 16621580.
- 14 29. Canisso IF, Andrade Souza F, Ribeiro De Carvalho G, Domingos Guimarães J, Capistrano
15 Da Silva E, Linhares Lima A. *Rev Bras Reprod Anim [Internet]*. Vol. 4. Report. Available
16 from: www.cbra.org.br
- 17 30. Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human sperm
18 tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Molecular and Cellular*
19 *Proteomics*. 2013;12(2):330–42. doi:10.1074/mcp.M112.020552 PubMed PMID:
20 23161514.
- 21 31. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic
22 review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*. Taylor and Francis
23 Ltd.; 2019. p. 87–97. doi:10.1080/2090598X.2019.1599624
- 24 32. Castro M, Leal K, Pezo F, Contreras MJ. Sperm Membrane: Molecular Implications and
25 Strategies for Cryopreservation in Productive Species. *Animals*. Multidisciplinary Digital
26 Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/ani15121808
- 27 33. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal*
28 *Reproduction Science [Internet]*. 2000. Report. Available from:
29 www.elsevier.com/locate/theriogen
- 30 34. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma
31 membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 2005 Dec;51(3):241–9.
32 doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.004 PubMed PMID: 16122725.
- 33 35. Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. Reactive oxygen species promote tyrosine
34 phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2003 Oct
35 15;60(7):1239–47. doi:10.1016/S0093-691X(03)00144-4 PubMed PMID: 14511778.
- 36 36. Chaves M. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
37 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA PERFIL LIPÍDICO DA MEMBRANA
38 CITOPASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES “IN NATURA” E CRIOPRESERVADOS DE
39 JUMENTOS E CAVALOS MARIA MANOELA BARATA DE CASTRO CHAVES. 2015. Report.

- 1 37. Prasinou P, De Amicis I, Fusaro I, Bucci R, Cavallini D, Parrillo S, et al. The Lipidomics of
2 Spermatozoa and Red Blood Cells Membrane Profile of Martina Franca Donkey:
3 Preliminary Evaluation. *Animals*. 2023 Jan 1;13(1). doi:10.3390/ani13010008
- 4 38. Catalán J, Yáñez-Ortiz I, Tvarijonaviciute A, González-Aróstegui LG, Rubio CP, Barranco I,
5 et al. Seminal Plasma Antioxidants Are Related to Sperm Cryotolerance in the Horse.
6 *Antioxidants*. 2022 Jul 1;11(7). doi:10.3390/antiox11071279
- 7 39. Wen X, Ren H, He Q, Yi M, Ulaangerel T, Bou G. Comparative Analysis of Proteomic
8 Characteristics in Seminal Plasma Between Horses and Donkeys. *Animals*. 2025 Jun
9 1;15(11). doi:10.3390/ani15111532
- 10 40. Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins:
11 What role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011
12 Jul;66(SUPPL. 1):11–22. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x PubMed PMID:
13 21726334.
- 14 41. Papas M, Arroyo L, Bassols A, Catalán J, Bonilla-Correal S, Gacem S, et al. Activities of
15 antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses
16 than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. *Theriogenology*.
17 2019 Dec 1;140:180–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.08.032 PubMed PMID:
18 31479834.
- 19 42. Manjunath et al. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective
20 agents during semen preservation [Internet]. 2007. Report. Available from:
21 <https://www.researchgate.net/publication/6193603>
- 22 43. Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, et al.
23 Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod*
24 Sci. 2011 Sep;127(3–4):197–201. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.08.002 PubMed PMID:
25 21890290.
- 26 44. Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Calvete JJ, Peña Vega FJ, Roca J. Seminal plasma:
27 Relevant for fertility? *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
28 doi:10.3390/ijms22094368 PubMed PMID: 33922047.
- 29 45. Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. Effect of ketoprofen treatment on the
30 uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*.
31 2013 Apr 15;79(7):1019–26. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.01.006 PubMed PMID:
32 23453786.
- 33 46. Miró J, Vilés K, García W, Jordana J, Yeste M. Effect of donkey seminal plasma on sperm
34 movement and sperm-polymorphonuclear neutrophils attachment in vitro. *Anim*
35 *Reprod Sci*. 2013 Aug;140(3–4):164–72. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.06.007 PubMed
36 PMID: 23891218.
- 37 47. Miró J, Catalán J, Marín H, Yáñez-Ortiz I, Yeste M. Specific seminal plasma fractions are
38 responsible for the modulation of sperm–pmn binding in the donkey. *Animals*. 2021
39 May 1;11(5). doi:10.3390/ani11051388
- 40 48. Catalán J, Yáñez-Ortiz I, Tvarijonaviciute A, González-Arostegui LG, Rubio CP, Yeste M,
41 et al. Impact of Seminal Plasma Antioxidants on Donkey Sperm Cryotolerance.
42 *Antioxidants*. 2022 Feb 1;11(2). doi:10.3390/antiox11020417

- 1 49. Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. Relationship of
2 seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity.
3 Theriogenology. 2005 Apr 1;63(6):1584–91. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.030
4 PubMed PMID: 15763103.
- 5 50. Brinsko SP, Crockett LEC, Squires EL. EFFECT OF CENTRIFUGATION AND PARTIAL
6 REMOVAL OF SEMINAL PLASMA ON EQUINE SPERMATOZOAL MOTILITY AFTER
7 COOLING AND STORAGE. Report.
- 8 51. Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT. Equine seminal plasma reduces sperm
9 binding to polymorphonuclear neutrophils (PMN's) and improves the fertility of fresh
10 semen inseminated into inflamed uteri. Reproduction. 2004;127(5):593–600.
11 doi:10.1530/rep.1.00096 PubMed PMID: 15129015.
- 12 52. Aurich JE, Ktibne JA, Hoppe3 H, Auricbz C. SEMINAL PLASMA AFFECTS MEMBRANE
13 INTEGRITY AND MOTILITY OF EQUINE SPERMATOZOA AFTER CRYOPRESERVATION.
14 1996. Report.
- 15 53. Serres C, Rodriguez A, Alvarez A, Santiago I, Gabriel J, Go Âmez-Cue Âtara C, et al. Effect
16 of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of
17 Zamorano-Leone Âs donkey semen. 2002. Report.
- 18 54. Rodrigues et al. LT. Efeito de diferentes diluentes e da remoção do plasma seminal na
19 refrigeração do sêmen asinino (*Equus asinus*). Revista Acadêmica: Ciência Animal. 2017
20 Jul 21;15:143. doi:10.7213/academica.15.s01.2017.71
- 21 55. Dalmau CS. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID ASNO ZAMORANO-LEONES
22 MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR Consuelo Serres
23 Dalmau Bajo la dirección del Doctor. 2004. Report.
- 24 56. Phillips PH, Lardy HA. A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen. J Dairy
25 Sci. 1940;23(5):399–404. doi:10.3168/jds.S0022-0302(40)95541-2
- 26 57. Salisbury GW, Fuller HK, Willett EL. Preservation of Bovine Spermatozoa in Yolk-Citrate
27 Diluent and Field Results from its Use. J Dairy Sci. 1941;24(11):905–10.
28 doi:10.3168/jds.S0022-0302(41)95476-0
- 29 58. Almquist JO, Wickersham EW. Diluents for Bovine Semen. XII. Fertility and Motility of
30 Spermatozoa in Skimmilk with Various Levels of Glycerol and Methods of
31 Glycerolization. J Dairy Sci. 1962;45(6):782–7. doi:10.3168/jds.S0022-0302(62)89488-0
- 32 59. Thacker DL, Almquist JO. Diluters for Bovine Semen. I. Fertility and Motility of Bovine
33 Spermatozoa in Boiled Milk. J Dairy Sci. 1953;36(2):173–80. doi:10.3168/jds.S0022-
34 0302(53)91474-X
- 35 60. O'Dell WT, Almquist JO. Freezing Bovine Semen. I. Techniques for Freezing Bovine
36 Spermatozoa in Milk Diluents. J Dairy Sci. 1957;40(12):1534–41. doi:10.3168/jds.S0022-
37 0302(57)94674-X
- 38 61. Brinsko SP. Antibiotics and other additives for semen extenders to enhance fertility 1.
39 2009. Report.
- 40 62. Müller Y. Effects of substituting sodium chloride and omitting antibiotics in stallion
41 semen diluents for prolonged storage at elevated temperatures. 2019. Report.

- 1 63. Trentin JM, Centeno LAM, De Souza Balestrin T, Minela T, Zanatta GM, Pessoa GA, et al.
2 Sodium bicarbonate and HEPES as buffer components for cooling the semen of pony
3 stallions. *Semina:Ciencias Agrarias*. 2018 Mar 1;39(2):631–42. doi:10.5433/1679-
4 0359.2018v39n2p631
- 5 64. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, et al. Advances in
6 cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 2001. Report.
- 7 65. Conde DC, Souza GV de, Almeida Filho PR de O, Shimoda E, Silva JFS. Características
8 seminais de dois diluentes de simples preparação e acessibilidade de seus
9 componentes para o resfriamento de ejaculado equino. *Brazilian Journal of*
10 *Development*. 2025 Jun 23;11(6):e80541. doi:10.34117/bjdv11n6-064
- 11 66. Pickett BW, Amann RP. EXTENSION AND STORAGE OF STALLION SPERMATOZOA: A
12 REVIEW. 1987. Report.
- 13 67. Graham JK. CRYOPRESERVATION OF STALLION SPERMATOZOA. 1996. Report.
- 14 68. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm
15 membrane lipid modification that occurs during capacitation. Thérien / *Journal of*
16 *Reproductive Immunology* [Internet]. 2002. Report. Available from:
17 www.elsevier.com/locate/jreprimm
- 18 69. Dalal J, Chandolia RK, Pawaria S, Kumar A, Kumar D, Selokar NL, et al. Low-density
19 lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: Unraveling mechanism
20 of action. *Mol Reprod Dev*. 2020 Dec 1;87(12):1231–44. doi:10.1002/mrd.23434
21 PubMed PMID: 33140487.
- 22 70. Nouri Gharajelar S, Ali Sadrkhanloo R, Onsoni M, Saberivand A, Nouri Gharajelar DVM S.
23 A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine
24 sperm during vitrification process. *ARTICLE Veterinary Research Forum*. 2016. Report.
- 25 71. Oliveira SN de. EFEITO DO GLICEROL E AMIDAS EM DIFERENTES CURVAS DE
26 REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO EQUINO. 2020. Report.
- 27 72. Macías García B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, Miró-Morán A, Morillo Rodriguez A,
28 Gallardo Bolaños JM, et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on
29 membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane
30 potential. *Theriogenology*. 2012 Apr 15;77(7):1280–9.
31 doi:10.1016/j.theriogenology.2011.10.033 PubMed PMID: 22326587.
- 32 73. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as
33 cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci*. 2005;89(1-4
34 SPEC. ISS.):105–13. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.07.001 PubMed PMID: 16099609.
- 35 74. Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving
36 stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2004 Sep 15;62(6):1056–65.
37 doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.024 PubMed PMID: 15289047.
- 38 75. Van Den Bulcke M, Rosseel MT, Wijnants P, Buylaert W, Belpaire FM. Metabolism and
39 hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide, N-hydroxymethyl-N-methylformamide, and
40 N-methylformamide in the rat. *Arch Toxicol*. 1994. Report.

- 1 76. Avanzi BR. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine
2 semen viability in a hot environment. Anim Reprod Sci. 2006 Aug;94(1–4):152–4.
3 doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.042
- 4 77. Canisso IF, Andrade Souza F, Capistrano Da Silva E, Carvalho GR, Domingos Guimarães J,
5 Linhares Lima A. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS: sêmen fresco, diluído,
6 resfriado e transportado Artificial insemination in equines: diluted, cooled and
7 transported race semen. Ciênc. Agrár. Ambient. 2008. Report.
- 8 78. Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. DETERMINATION OF TEMPERATURE AND
9 COOLING RATE WHICH INDUCE COLD SHOCK IN STALLION SPERMATOZOA. 1992.
10 Report.
- 11 79. Nunes. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas - Nunes
12 2006.
- 13 80. Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. ISFECTS OF LINEAR
14 coowNG RATE ON MOTION CEARACIERISTICS OF IZTALUON SPERhtA’IOZOA. 1992.
15 Report.
- 16 81. Oliveira JV de, Oliveira PV de LF, Melo e Oña CM, Guasti PN, Monteiro GA, Sancler da
17 Silva YFR, et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen.
18 Theriogenology. 2016 Apr 15;85(7):1267–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.12.010
19 PubMed PMID: 26806444.
- 20 82. Papa PM, Maziero RD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell’Aqua CP, Papa FO, et al.
21 Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. Theriogenology.
22 2015 Jan 1;83(1):107–13. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.08.009 PubMed PMID:
23 25441498.
- 24 83. Mohri H, Masaki J. GLYCEROKINASE AND ITS POSSIBLE ROLE IN GLYCEROL METABOLISM
25 OF BULL SPERMATOZOA’. Report.
- 26 84. T. MANN & I. G. WHITE. Metabolism of Glycerol, Sorbitol and Related Compounds by
27 Spermatozoa.
- 28
- 29