

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES DILUENTES NA PRÉ-  
CENTRIFUGAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

**BRUNA MERCI DE ZUTTER**

**BOTUCATU**

**2024**

**BRUNA MERCI DE ZUTTER**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES DILUENTES NA PRÉ-CENTRIFUGAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para a obtenção do título de Residente em Fisiopatologia da Reprodução e Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

**BOTUCATU**

**2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Zutter, Bruna Merci de.

Influência da adição de diferentes extensores na  
pré-centrifugação para criopreservação de sêmen equino /  
Bruna Merci de Zutter. - Botucatu, 2024

Trabalho acadêmico (residência - Fisiopatologia da  
Reprodução e Obstetrícia) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa  
Capes: 50504002

1. Biotecnologia. 2. Motilidade dos Espermatozoides. 3.  
Criopreservação. 4. Sêmen - Equinos.

Palavras-chave: Biotecnologia; Cinética espermática;  
Criopreservação; Sêmen equino.

ZUTTER, BRUNA MERCI DE. Influência da adição de diferentes diluentes na pré-centrifugação para criopreservação de sêmen equino. Botucatu, 2024. 20p. Trabalho de Conclusão da Residência em Medicina Veterinária (área de Fisiopatologia da Reprodução e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

## **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo comparar a influência de quatro diferentes diluentes de sêmen contendo Leite desnatado (G1), Leite desnatado e Pentoxifilina (G2), Colesterol (G3) e Colesterol e Caseína (4) acrescidos na pré-centrifugação do ejaculado de garanhões, visando avaliar cinética e integridade de membrana citoplasmática dos espermatozoides. Foram realizadas sete coletas de sêmen de quatro garanhões (n= 28), de diferentes idades e sadios. As amostras foram separadas em quatro alíquotas e diluídas nos extensores supracitados, a criopreservação foi realizada seguindo metodologia de Papa *et al* (2002). A análise dos parâmetros de cinética foi realizada por meio do sistema computadorizado CASA (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), e a análise da integridade de membrana citoplasmática realizada a partir de microscopia de fluorescência. Os parâmetros foram avaliados no momento pré-centrifugação, pós-descongelação e 30 minutos pós- descongelação. Os extensores G3 e G4 apresentaram em média os melhores índices de cinética espermática em ambas as análises. Diluentes a base de colesterol e ciclodextrina obtiveram melhores taxas de cinética pós-descongelação em comparação a extensores baseados em leite desnatado no processo de criopreservação seminal.

**PALAVRAS-CHAVES:** BIOTECNOLOGIA, CONGELAÇÃO, ANDROLOGIA, CINÉTICA ESPERMÁTICA, GARANHÃO

ZUTTER, BRUNA MERCI DE. Influence of adding different diluents in pre-centrifugation for equine semen cryopreservation. Botucatu, 2024. 20p. Trabalho de Conclusão da Residência em Medicina Veterinária (área de Fisiopatologia da Reprodução e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

## **ABSTRACT**

This work aimed to compare the influence of four different semen extenders containing Skimmed Milk (G1), Skimmed Milk and Pentoxifylline (G2), Cholesterol (G3) and Cholesterol and Casein (4) added in the pre-centrifugation of stallion ejaculate, in progress to evaluate kinetics and integrity of the sperm cytoplasmic membrane. Seven semen collections were carried out from four stallions (n= 28), of different ages and healthy conditions. The samples were separated into four aliquots and diluted in the aforementioned extenders, cryopreservation was carried out following the methodology of Papa et al (2002). The analysis of kinetic parameters was carried out using the CASA computerized system (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), and the analysis of the integrity of the cytoplasmic membrane was carried out using fluorescence microscopy. The parameters were evaluated pre-centrifugation, post-thawing and 30 minutes post-thawing. Extenders G3 and G4 had the best sperm kinetic indexes on average in both analyses. Cholesterol and cyclodextrin-based diluents obtained better post-thawing kinetic rates compared to skimmed milk-based extenders in the seminal cryopreservation process.

**KEYWORDS:** BIOTECHNOLOGY, FREEZING, ANDROLOGY, SPERM KINETICS, STALLION

## **SUMÁRIO**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>CÉLULA ESPERMÁTICA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL .....</b>	<b>8</b>
2.2.1	CINÉTICA ESPERMÁTICA .....	8
2.2.2	INTEGRIDADE DE MEMBRANA.....	9
<b>2.3</b>	<b>BIOTECNOLOGIAS APLICADAS AO SÊMEN .....</b>	<b>9</b>
2.3.1	REFRIGERAÇÃO .....	9
2.3.2	CONGELAÇÃO .....	10
<b>2.4</b>	<b>MEIOS DILUIDORES DE SÊMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>LOCAL DE PESQUISA E ANIMAIS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>COLHEITA E AVALIAÇÃO SEMINAL .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN .....</b>	<b>14</b>
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>20</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira cresce de forma exponencial, segundo o IBGE (2021) alcançando um total de 5,7 milhões de animais no ano de 2021. Esse alto contingente reflete em uma posição de destaque internacional da indústria equestre, impulsionando a necessidade de implementação de novas biotecnologias reprodutivas, visando acelerar e facilitar o melhoramento genético do plantel brasileiro.

O Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza sêmen refrigerado para transporte a longas distâncias, e existe uma crescente ampliação do uso do sêmen congelado visando a redução de custos de produção, além da seleção de garanhões com alto valor zootécnico para reprodução (ESMAIL *et al.*, 2023; PAPA, 2020). Contudo, sabe-se que a seleção de animais reprodutores é baseada na genética, performance e conformação, como consequência, é grande o número de animais subfêrteis em programas de reprodução assistida (VARNER *et al.*, 2008).

Desta forma, é alta a demanda do mercado equestre para melhoramento da qualidade seminal a partir de biotecnologias reprodutivas. O sucesso da criopreservação espermática é afetado por diversos fatores, como temperatura de armazenamento, taxa de resfriamento, composição do plasma seminal e higiene do laboratório, bem como a utilização de diluentes ou extensores pré-centrifugação (NEUHAUSER *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2011).

A eficácia dos extensores de sêmen é comprovada na manutenção da cinética e integridade funcional dos espermatozoides, responsáveis por estabilizar o pH, remover subprodutos nocivos ao metabolismo, fornecimento de energia, proteção contra choque térmico e supressão do desenvolvimento bacteriano (AURICH *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2011). Porém, sabe-se que a composição do diluente pode ter influência direta na fertilidade do sêmen refrigerado ou congelado, sendo vantajoso o teste individual de cada garanhão, afim de verificar a existência de fatores genéticos ou raciais que possam interferir nesse processo (PAPA, 2020).

Assim, esse trabalho tem como objetivo comparar a influência de quatro diluentes de sêmen a base de: leite desnatado (BotuSêmen®), leite desnatado e pentoxifilina (BotuTurbo®), colesterol (BotuSêmen Special®) e colesterol e caseína (BotuSêmen Gold®) (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Utilizados na pré-centrifugação para criopreservação do ejaculado de garanhões, visando avaliar cinética

e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides e discutir as variações individuais de ganhões e diluentes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÉLULA ESPERMÁTICA

A morfológica espermática foi descrita pela primeira vez por Van Leeuwenhoek, em 1677, propondo sua semelhança com a forma de um girino. Porém somente no ano de 1964, com a introdução dos microscópios eletrônicos foi possível a descrição detalhada da célula (AMANN, 2011; VARNER *et al.*, 2008; SAACKE, ALMQUIST, 1964).

O espermatozoide equino tem comprimento médio de 61 a 86 $\mu$ m e é dividido anatomicamente entre cabeça e cauda. A cabeça é subdividida em região acrossomal, segmento equatorial, região pós-acrossomal e região posterior ao anel, que indica a divisão entre cabeça e cauda, separando componentes citosólicos entre eles. Já a cauda pode ser subdividido em peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça final (AMANN, 2011; CUPPS, 1991).

O citoesqueleto é composto por proteínas que dão à cabeça sua forma de espátula achatada dorsoventralmente (DAVIES-MOREL, 2008; VARNER *et al.*, 2015). O acrossoma é uma organela que se origina do aparelho de Golgi que contém receptores de proteínas e enzimas hidrolíticas essenciais para reação acrossomal (VAN MOL, 2020). Já o núcleo é responsável por armazenar o DNA paterno que é densamente empacotado e intimamente associado a proteínas nucleares (SAMPER, 2008).

A peça intermediária contém mitocôndrias dispostas de forma helicoidal, responsáveis pelo fornecimento de energia para o metabolismo basal e movimento da cauda do espermatozoide (AMANN, 2011). Na junção com a peça principal, existe um anel fibroso de separação, em que a bainha mitocondrial é substituída por uma bainha fibrosa, que associada a um axonema centralizado e fibras densas externas formam a peça principal. A peça final é composta por pequena extensão do axonema e uma terminação local da bainha fibrosa (VARNER *et al.*, 2015).

Toda extensão da célula espermática é circundada por uma membrana plasmática, composta por uma bicamada fosfolipídica que contém proteínas, carboidratos complexos e colesterol. As proteínas atravessam a membrana e funcionam como receptores, canais iônicos, poros e componentes de transdução de sinal (VAN MOL, 2020). Entretanto, existe uma

divisão de regiões de domínio celular da membrana, que impactam no processo de fertilidade (BRINSKO *et al.*, 2010; EDDY, O'BRIEN, 2006).

## 2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE SEMINAL

A avaliação da qualidade espermática tem como objetivo determinar o potencial de fertilidade de um sêmen, seja uma amostra fresca, refrigerada ou congelada. Sabe-se que existem garanhões com aparente boa qualidade espermática e baixas taxas de fertilidade, assim é necessário lançar mão de métodos adicionais de controle de parâmetros seminais, visando maior precisão à estimativa do potencial de fertilização (JOHANNISSON, COJKIC, MORRELL, 2023; PAPA, 2020).

### 2.2.1 Cinética Espermática

A motilidade espermática é a característica celular que permite o deslocamento no trato genital feminino, e reflete no sucesso da fertilização. Sua ocorrência depende da propulsão produzida pela cauda, que realiza deslizamentos síncronos dos microtúbulos que o compõem (PAPA, 2020). Esse processo depende de altas concentrações de AMPc, sintetizado a partir do ATP gerado pela metabolização da glicose durante a etapa da glicólise, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (PETER *et al.*, 2021; VARNER, JOHNSON, 2011; PAPA, 2020).

A avaliação de parâmetros de cinética é um exame realizado imediatamente após a coleta, sem a interferência de diluentes e em um ambiente aquecido a 37°C. A motilidade total é definida como a porcentagem dos espermatozoides viáveis em um determinado campo, já a motilidade progressiva depende da quantidade de células avançando ativamente, levando em consideração as altas taxas de inserção abaxial da peça intermediária à cabeça do espermatozoide, alterando a trajetória da célula (PETER *et al.*, 2021; PAPA, 2020).

Atualmente, a avaliação computadorizada do movimento espermático é amplamente utilizada, visando a padronização da cinética, retirando a subjetividade da pesquisa (PAPA, 2020). O sistema CASA (*Computer assisted sperm analysis*) é um software projetado para aquisição de sucessivas imagens do espermatozoide, define diferentes subpopulações de espermatozoides e informa parâmetros detalhados de velocidade, linearidade, oscilação, amplitude do deslocamento lateral da cabeça e frequência de batimento flagelar (PETER *et al.*, 2021).

### 2.2.2 Integridade de membrana

Ao final da espermatogênese, o espermatozoide maduro perde grande parte das organelas celulares e não é capaz de realizar transcrição de DNA, impedindo a síntese de novos componentes da membrana celular (EDDY, O'BRIEN, 2006). Como consequência, o dano à membrana plasmática resulta em perdas irreversíveis da funcionalidade espermática, levando a diminuição das taxas de fertilidade (AURICH, 2005).

A membrana espermática é suscetível a danos desde a ejaculação e transporte no trato genital feminino, até o processamento e criopreservação do sêmen (VARNER, JOHNSON, 2011). Vários fatores são responsáveis por lesionar a membrana, como a exposição às espécies reativas de oxigênio (EROS) durante a passagem no útero, peroxidação lipídica, choque térmico, centrifugação, além da própria refrigeração e congelamento (PETER *et al.*, 2021; AURICH, 2005).

Testes funcionais e de coloração para determinar o grau de integridade da membrana são disponíveis no mercado. As sondas fluorescentes são compostas por uma solução de diacetado de 6-carboxifluoresceína, que será convertida em fluoresceína por enzimas presentes no citoplasma de espermatozoides com membrana intacta, emitindo uma coloração verde. Além do iodeto de propídeo, que se liga a receptores localizados no DNA espermático, alcançado em células com membrana lesionada, emitindo uma coloração vermelha (BERGSTEIN, WEISS, BICUDO, 2014; ARRUDA *et al.*, 2011).

## 2.3 BIOTECNOLOGIAS APLICADAS AO SÊMEN

A refrigeração e congelamento são biotecnologias amplamente utilizadas visando a preservação de material genético de animais de alto valor zootécnico, maximizando a utilização de garanhões, minimizando gastos e risco de transportes de animais, além de reduzir a disseminação de doenças (PAPA, 2020; SQUIRES, 2013).

### 2.3.1 Refrigeração

O processo de refrigeração seminal foi inserido no mercado equino na década de 1980, com objetivo de aumentar a distribuição de doses inseminantes pelos Estados Unidos, sendo

amplamente aceita entre associações de criadores. Essa técnica implementou o transporte do ejaculado a longas distancias, aumentando a longevidade do material genético de 24 a 72 horas (HERNÁNZES-AVILÉS, LOVE, 2021; NOVELLO *et al.*, 2020).

A refrigeração tem como objetivo a redução do metabolismo celular através de baixas temperaturas, retardando reações químicas e o crescimento bacteriano, estabilizando a amostra a 5°C. Em temperaturas entre 19 e 8°C os espermatozoides sofrem uma transição de fase dos fosfolipídeos presentes na membrana, que passam de estado líquido para gel (HARTWIG *et al.*, 2014; GRAHAM, 1996). É denominado como uma fase crítica da refrigeração, suscetível a choque térmico celular (PAPA, 2020).

Esse acontecimento predispõe a ruptura da membrana, alteração na conformação dos fosfolipídeos de membrana, induzindo desarranjo das moléculas, perda rápida de motilidade e danos no acrossoma, que comprometem o funcionamento celular (VITA *et al.*, 2011). A prevenção se dá pela queda da temperatura de forma lenta e gradual, realizada em uma taxa de -0,1 a -0,05°C/minuto, objetivando a redução de efeitos deletérios à célula espermática (PAPA, 2020).

### 2.3.2 Congelação

O primeiro relato de gestação em égua obtida com sêmen criopreservado foi descrita em 1957 por Barker e Gandier, a partir da secção *post mortem* de um epidídimo equino, e subsequente coleta de material biológico. A partir deste acontecimento foram realizadas diversas pesquisas visando a otimização de seu uso, e o aumento das taxas de fertilização (CAMARGO, 2023).

Após a refrigeração do sêmen a 5°C com uma taxa de -0,1 a 0,05°C/min durante 20 minutos, a amostra é submetida a uma taxa de congelação de -20°C/minuto, chegando à temperatura de -130°C. Na sequência é realizado a submersão em nitrogênio líquido, alcançando a temperatura de -196°C de forma segura para proteção da célula espermática (PAPA, 2020). O princípio da criopreservação se baseia na desidratação celular, ocasionado pelo transporte de água do meio intra para o extracelular, permitindo que o espermatozoide se torne isosmótico em relação ao meio (OLIVEIRA, 2020).

Durante o decréscimo de temperatura entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  ocorre o segundo ponto crítico da criopreservação espermática, dando início a formação de cristais de gelo no meio extracelular. Esse acontecimento acarreta a desidratação excessiva da célula espermática, que ficará hipotônica em relação ao meio externo. Para ocorrer o equilíbrio osmótico da solução, é essencial o uso de diluentes crioprotetores (OLIVEIRA, 2020; PAPA, 2020; SQUIRES *et al.*, 1999).

Os crioprotetores são compostos químicos que interagem com as moléculas de água e inibem a formação das pontes de hidrogênio que são essenciais para a formação de cristais de gelo, classificados em penetrantes e não penetrantes (NEUHAUSER *et al.*, 2019). Os crioprotetores penetrantes, como glicerol e amidas, são moléculas com baixo peso molecular que penetram na membrana plasmática, diminuindo o ponto de congelação da água e evitando a formação de cristais de gelo intracelulares. Já os não penetrantes, como gema de ovo e açúcares, são macromoléculas que facilita a saída da água intracelular, tornando a célula isotônica em relação ao meio (OLIVEIRA, 2020; PAPA, 2020; IAFFALDANO *et al.*, 2014).

#### 2.4 MEIOS DILUIDORES DE SÊMEN

Os diluidores de sêmen desempenham um papel essencial na manutenção da viabilidade seminal fora do trato reprodutor, e são responsáveis pelo sucesso da inseminação artificial com sêmen refrigerado e transportado (PAPA, 2020). O primeiro meio diluidor foi produzido na década de 1970, pelo Dr. Robert Kenney, denominado Kenney é a base de leite desnatado, glicose, bicarbonato de sódio, gentamicina e água destilada, e foi precursor de diversos estudos sobre manutenção da célula espermática (NOVELLO *et al.*, 2020; KENNEY *et al.*, 1975).

Dentre os diversos benefícios do uso de diluidores de sêmen, estão a diluição do plasma seminal, controle de pH e osmolaridade, fornecimento de energia, inibição do crescimento bacteriano e proteção contra choque térmico (AURICH, 2005). Atualmente, existem diversos compostos formulados para melhorar a performance espermática após refrigeração a  $5^{\circ}\text{C}$ , como leite desnatado, antibióticos, pentoxifilina, açúcares, caseína e colesterol (PAPA, 2020; MOORE, SQUIRES, GRAHAM, 2005).

O leite desnatado é constituído de água, proteínas, açúcares, lactose, lipídeos e minerais. Seu principal fator de proteção ao sêmen é a caseína, proteína responsável por prevenir o dano criogênico ao espermatozoide por ligação competitiva às proteínas do plasma seminal, estabilizando a membrana contra o efluxo de colesterol e fosfolipídeos (GOBATO, 2020).

Atualmente, o caseinato de sódio é amplamente utilizado na composição de diluentes de sêmen, resultando em maiores taxas de fertilidade em comparação ao uso de diluentes com leite desnatado em garanhões denominados “*bad cooler*” ou “*bad freezer*” (CAMPOS, 2018).

Com objetivo de aumentar a resistência espermática em baixas temperaturas, é possível acrescentar colesterol associado a ciclodextrina nos compostos diluidores. A ciclodextrina é responsável pelo transporte, dissolução e aumento da solubilidade de componentes hidrofóbicos em solução aquosa (HARTWIG *et al.*, 2014). Já o colesterol é um componente comprovadamente benéfico para criopreservação, responsável pela fluidez e estabilização da membrana plasmática, acarretando maiores níveis de cinética espermática e integridade de membrana (PAPA, 2020).

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina, que tem como função a inibição da atividade enzimática da fosfodiesterase, que leva ao aumento do AMPc intracelular. Desta forma, a geração de energia que atua diretamente no controle flagelar da célula espermática é mantida, sendo eficiente para elevação da cinética espermática (GUASTI, 2014; TSUNODA, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da adição de diferentes diluentes na pré-centrifugação seminal, para posterior congelamento.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Realizar congelamento seminal em quatro garanhões
- b) Avaliar cinética espermática e integridade de membrana plasmática
- c) Definir qual melhor diluente pré-centrifugação no grupo definido

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ) Unesp – Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil (Protocolo CEUA nº 0508/2023).

### 3.2 LOCAL DE PESQUISA E ANIMAIS

O estudo foi conduzido durante o período de julho a setembro de 2023, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FMVZ) Unesp – Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil (latitude 22° 53’ S, longitude 130 48° 26’ W, altitude 840 m). Foram utilizados quatro garanhões, com idade entre cinco e 20 anos, clinicamente saudáveis e de diferentes raças. Os animais foram mantidos em piquetes (25x25m) e a alimentação a base de feno de Tifton-85 (*Cynodon spp.*), ração comercial balanceada, sal mineral e água *ad libitum*.

### 3.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO SEMINAL

Foram realizadas 7 colheitas do sêmen de cada garanhão (n= 28) por meio de vagina artificial modelo Botupharma® (Botucatu, São Paulo, Brasil), preenchida com água a 50°C, em manequim com égua em cio. Após a colheita, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gelatinosa e possíveis sujidades. O volume total do ejaculado foi determinado pela graduação do tubo, e a concentração espermática avaliada a partir da contagem de células na câmara de Neubauer, diluindo 10µL de sêmen em 190µL de água destilada.

Na sequência, o ejaculado foi fracionado em quatro alíquotas iguais, diluídos na proporção 1:1 nos seguintes extensores: G1 - BotuSÊMEN® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil); G2 - BotuTURBO® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil); G3 – BotuSÊMEN ESPECIAL® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e G4 - BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

Os parâmetros de cinética espermática motilidade espermática total (MT [%]), motilidade espermática progressiva (MP [%]) e porcentagem de espermatozoides com

movimento rápido (RAP [%]) foram avaliados por meio do sistema computadorizado CASA - Computer Assisted Semen Analyzer (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), depositando uma alíquota de 10µL de sêmen em uma câmara de Makler (Makler Counting Chamber®, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C.

A análise da integridade de membrana citoplasmática (IM%) foi realizada a partir da técnica de Harrison e Vickers (1990), que consiste em adicionar 50µl da solução de trabalho de iodeto de propídio e diacetato 6-carboxifluoresceína e 20µl de amostra seminal em um tubo Eppendorf®. A amostra foi mantida a 30°C por 10 minutos, sem exposição a luz. Para leitura do resultado, é necessário dispor uma gota do composto em uma lâmina coberta por lamínula, analisada pela microscopia de fluorescência.

### 3.4 REFRIGERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

As amostras foram dispostas em tubos Falcon® e centrifugadas a 600G durante 10 minutos (Centrífuga Baby I 206 BL, Fanem®, Guarulhos, SP, Brasil). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em diluente comercial para congelamento a base de gema de ovo (BotuCRIO®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) em uma concentração de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por ml. Após adequada homogeneização, foram envasadas em palhetas de 0,5ml e lacradas com álcool polivinílico.

Para refrigeração, as palhetas serão armazenadas a 5°C por 20 minutos em refrigerador com temperatura controlada (Minitube do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil). A congelamento seguiu protocolo descrito por Papa *et al.* (2002), utilizando uma caixa de isopor com capacidade para 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido (LN2) até a marca de 4cm de altura.

As palhetas serão acondicionadas horizontalmente 4,0cm acima do nível do LN2 por 20 minutos para resfriamento rápido, em uma temperatura entre -110 e -120°C. Na sequência serão imersas no nitrogênio líquido, chegando à temperatura de -196°C. A descongelamento em banho-maria a 37°C por 30 segundos, transferidas para um tubo Eppendorf® de 2,0mL e incubadas em banho seco por 10 minutos a 37°C para subsequente avaliação.

O material biológico foi submetido aos mesmos testes pré-congelamento, de cinética e integridade de membrana mitocondrial e acrossomal, respectivamente utilizando o CASA - Computer Assisted Semen Analyzer (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) e microscopia de fluorescência.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das avaliações de cinética espermática e integridade de membrana plasmática foram avaliados pelo software GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), e expressos em média e erro padrão. Todos os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal das variáveis estudadas. Para as médias obtidas com distribuição normal, utilizou-se teste ANOVA de medidas repetidas seguida de Tukey e quando não paramétrico teste de Friedman seguido de Dunn. Diferenças foram consideradas quando  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Os dados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 representam os resultados da análise computadorizada de movimento espermático (CASA) realizada em 28 ejaculados provenientes de quatro garanhões antes e após o processo de criopreservação. As amostras foram submetidas ao processo de congelamento utilizando quatro diferentes diluidores no momento pré-centrifugação (G1 - BotuSÊMEN®; G2 - BotuTURBO®; G3 – BotuSÊMEN SPECIAL® e G4 - BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Os parâmetros avaliados incluem motilidade total, motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides rápidos e velocidade média dos espermatozoides.

No momento pré-congelamento (Tabela 1), a motilidade total variou ( $P < 0,05$ ) entre os grupos G2 e G3/G4, porém G1 foi semelhante a ambos. Os parâmetros de motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos foram superiores no G4 em comparação ao G1 e G2 ( $P < 0,05$ ), entretanto, não houve diferença estatística entre todos os grupos em relação ao G3. Em relação a velocidade média, os grupos G1 e G4 obtiveram valores significativamente maiores em relação ao G2 ( $P < 0,05$ ), enquanto G3 não diferiu de ambos os grupos.

**TABELA 1** – Valores médios e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos e velocidade média, avaliados a partir da análise

computadorizada de movimento espermático (CASA) em 28 ejaculados de quatro garanhões diferentes no momento pré-congelação. G1 – BotuSêmen, G2 – BotuSêmen Turbo, G3 – BotuSêmen Special e G4 – BotuSêmen Gold.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<b>Motilidade Total (%)</b>	90,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	88,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	89,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	91,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	39,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	39,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	41,1 ± 2,0 <sup>ab</sup>	42,2 ± 2,0 <sup>b</sup>
<b>Espematozoides Rápidos (%)</b>	83,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	82,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	84,2 ± 1 <sup>ab</sup>	86,2 ± 0,8 <sup>b</sup>
<b>Velocidade Média (mm/s)</b>	143 ± 2,1 <sup>a</sup>	134 ± 3,0 <sup>b</sup>	138 ± 2,4 <sup>ab</sup>	142 ± 2,4 <sup>a</sup>

ab – Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (P <0,05).

Após o processo de criopreservação e subsequente descongelação (Tabela 2), as avaliações de cinética foram repetidas. A motilidade total foi significativamente maior (P <0,05) nos grupos G3 e G4 em comparação ao G2, porém não diferiu do G1 (P >0,05). Na motilidade progressiva, G3 e G4 obtiveram maiores índices de cinética, enquanto G1 e G2 foram inferiores e semelhantes entre si.

**TABELA 2** – Valores médios e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos e velocidade média, avaliados a partir da análise computadorizada de movimento espermático (CASA) em 28 ejaculados de quatro garanhões diferentes no momento pós-descongelação. G1 – BotuSêmen, G2 – BotuSêmen Turbo, G3 – BotuSêmen Special e G4 – BotuSêmen Gold.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
<b>Motilidade Total (%)</b>	75,3 ± 1,8 <sup>ab</sup>	73,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	78,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	78,9 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	40,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	41,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	44,7 ± 2,3 <sup>b</sup>	45,1 ± 2,3 <sup>b</sup>
<b>Espematozoides Rápidos (%)</b>	60,1 ± 3,2 <sup>a</sup>	61,2 ± 2,8 <sup>ab</sup>	64 ± 2,8 <sup>ab</sup>	65 ± 2,5 <sup>b</sup>
<b>Velocidade Média (mm/s)</b>	97,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	96,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	97,6 ± 1,9 <sup>ab</sup>	101 ± 1,8 <sup>b</sup>

ab – Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (P <0,05).

A porcentagem de espermatozoides rápidos foi superior no G4 em comparação ao G1 (P <0,05), sobretudo G2 e G3 não demonstrarem diferença estatística entre todos os grupos (P >0,05). Estatisticamente o G4 apresentou resultados semelhantes a G3 para velocidade média (P >0,05), enquanto G1 e G2 obtiveram índices menores, porém sem diferença estatística em comparação ao G3. Em todas as análises supracitadas, G1 e G2 obtiveram maiores níveis de desvio padrão.

**TABELA 3** – Valores médios e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total, motilidade progressiva, número de espermatozoides rápidos e velocidade média, avaliados a partir da análise

computadorizada de movimento espermático (CASA) em 28 ejaculados de quatro garanhões diferentes 30 minutos pós-descongelção. G1 – BotuSêmen, G2 – BotuSêmen Turbo, G3 – BotuSêmen Special e G4 – BotuSêmen Gold.

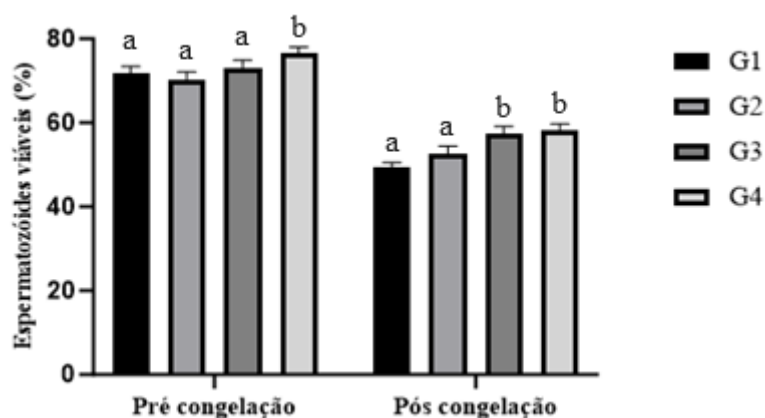
	G1	G2	G3	G4
<b>Motilidade Total (%)</b>	66,5 ± 2,0 <sup>ab</sup>	61,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	70,2 ± 2,0 <sup>bc</sup>	71,9 ± 2,0 <sup>c</sup>
<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	32,7 ± 2,6 <sup>ab</sup>	31 ± 2,8 <sup>a</sup>	36 ± 2,8 <sup>b</sup>	36,6 ± 2,5 <sup>b</sup>
<b>Epermatozoides Rápidos (%)</b>	52,2 ± 2,9 <sup>ab</sup>	49,1 ± 3,5 <sup>a</sup>	54,9 ± 3,1 <sup>bc</sup>	57,8 ± 3,2 <sup>c</sup>
<b>Velocidade Média (mm/s)</b>	92,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	87,3 ± 2,5 <sup>b</sup>	90,9 ± 2,0 <sup>ab</sup>	91,7 ± 2,2 <sup>a</sup>

ab – Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (P <0,05).

Os parâmetros de cinética foram repetidos 30 minutos após a descongelção (Tabela 3). Na avaliação da motilidade total, G4 apresentou resultados superiores em relação a G1 e G2 (P <0,05), porém não obteve diferença estatística em comparação a G3 (P >0,05). Enquanto na motilidade progressiva, G3 e G4 obtiveram índices semelhantes e superiores a G2, no entanto G1 não diferiu estatisticamente (P >0,05) de nenhum grupo descrito.

A porcentagem de espermatozoides rápidos foi maior no G4 (P <0,05), em comparação a G1 e G2, porém foi semelhante a G3 (P >0,05). Na avaliação da velocidade média, G1 e G4 obtiveram resultados mais altos e semelhantes entre si (P >0,05), enquanto G2 foi inferior (P <0,05) e G3 (P >0,05) não diferiu estatisticamente de todos os grupos.

**FIGURA 1** – Valores médios e erro padrão da avaliação da integridade de membrana plasmática por microscopia de fluorescência em 28 ejaculados de quatro garanhões diferentes no momento pré e pós-congelção. G1 – BotuSêmen, G2 – BotuSêmen Turbo, G3 – BotuSêmen Special e G4 – BotuSêmen Gold.



ab – Letras diferentes no mesmo grupo diferem significativamente entre si (P <0,05).

A avaliação da integridade de membrana plasmática a partir do corante de fluorescência em microscopia óptica foi instituída no momento pré-centrifugação e imediatamente após a descongelção (Figura 1). Na pré-congelção, a porcentagem de espermatozoides íntegros foi

maior no G4, em relação a G1, G2 e G3, que não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Enquanto na avaliação pós-descongelamento, G3 e G4 não obtiveram diferença estatística entre si ( $P > 0,05$ ), e foram superiores a G1 e G2 ( $P < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A avaliação seminal é fundamental para previsibilidade da qualidade espermática de garanhões. A associação da análise da cinética e integridade da membrana têm se revelado um componente crucial no prognóstico da fertilidade, visto que estas características frequentemente estão interrelacionadas e têm o potencial de definir desfechos clínicos similares (FOSTER *et al.*, 2011). Sobretudo, esses parâmetros podem sofrer reduções substanciais durante o processo de criopreservação, em virtude do dano à membrana plasmática, causados especialmente por estresse osmótico e oxidativo (STEPHENS *et al.*, 2013).

O diluente BotuSêmen® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) é derivado do leite desnatado, substância composta por água, proteínas, minerais e açúcares. O fosfocaseinato nativo constitui 80% das proteínas presentes nessa substância, e têm como função reduzir a perda de lipídeos da membrana plasmática, se ligando as BSP (PAPA, 2020; PAGL *et al.*, 2006). Neuhauser *et al.* (2019) compararam o uso da associação de BotuSêmen® e BotuCrio® a INRA96® e INRA Freeze® (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França), EquiPlus® e Gent Freeze®, EquiPlus® e EquiPlus Freeze®, e Gent® e Gent Freeze® (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) na criopreservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo.

Observou-se que a cinética espermática foi superior no grupo BotuSêmen®, semelhante ao grupo INRA 96®, em comparação aos demais. Isso pode ser atribuído ao fato de ambos os diluentes terem em sua composição fosfocaseinato nativo em diferentes concentrações, o que pode justificar a superioridade dos valores de motilidade. Sobretudo, os valores de velocidade média (VAP) pós-descongelamento foram inferiores nessa pesquisa (78,6mm/s), em relação ao presente trabalho (97,6mm/s).

BotuTurbo® é um extensor baseado na pentoxifilina, inibidor de fosfodiesterase, que regula positivamente a glicólise, pelo acúmulo da adenosina monofosfato cíclico (cAMP), gerando maiores níveis de trifosfato de adenosina (ATP), e consequente aumento da cinética espermática (STEPHENS *et al.*, 2013; NEGRI *et al.*, 2013).

No presente estudo, observou-se uma acentuada redução nos parâmetros de cinética após a descongelamento das amostras seminais diluídas com pentoxifilina. Esses dados corroboram com descritos anteriormente (GUAISTI *et al.*, 2013; GIL *et al.*, 2010; ESTEVES,

SPAINE, CEDENHO, 2007), que indicam o esgotamento rápido do substrato energético, decorrente a produção excessiva de ATP, resultando em aumento do esforço espermático e subsequente perda de energia durante o processo de criopreservação. Sobretudo, Gradil e Ball (2000) obtiveram resultados favoráveis ao adicionar 3,5mM de pentoxifilina após a descongelação, demonstrando ser útil para ativar células espermáticas com metabolismo reduzido.

Os diluentes que contêm colesterol, como BotuSêmen Special® e BotuSêmen Gold®, são amplamente utilizados devido à sua capacidade de proteger as células espermáticas. Esses componentes ajudam a manter a fluidez e estabilizar os fosfolipídeos da membrana espermática, que são suscetíveis a alterações estruturais e lesões irreversíveis durante o processo de criopreservação (HARTWIG *et al.*, 2014). O extensor de sêmen BotuSêmen Gold® ainda conta com a adição do caseinato de sódio, molécula proteica que interage com as proteínas BSP do plasma seminal, reduzindo o sequestro de moléculas de colesterol da membrana plasmática (CAMPOS *et al.*, 2020; FERRER *et al.*, 2020).

No estudo atual, a avaliação da cinética espermática e integridade da membrana plasmática não obteve diferença estatística entre os grupos G3 (BotuSêmen Special®) e G4 (BotuSêmen Gold®) nos momentos pré-congelação, pós-congelação e 30 minutos pós-descongelação. Os resultados foram satisfatórios de acordo com as diretrizes do CBRA (2013), destacando a importância da adição de colesterol no extensor seminal no momento pré-centrifugação. Sobretudo, a avaliação individual de cada garanhão é crucial para indicação do melhor diluente, visto que a composição do ejaculado é individual.

Até o momento, não existem relatos das avaliações da cinética espermática dos diluentes BotuSêmen Special® e BotuSêmen Gold® usados na centrifugação pré congelação em amostras descongeladas. Contudo, autores comparam o uso do BotuSêmen Gold® frente ao extensor INRA96® no processo de refrigeração a 5°C, e subsequente avaliação da cinética espermática em 24, 48 e 72 horas. Novello *et al* (2020) relataram superioridade estatística média nas amostras diluídas em BotuSêmen Gold®, enquanto os resultados de Rečková *et al* (2022), demonstraram que a eficácia do mesmo diluente foi notável apenas durante as primeiras 24 horas de refrigeração. Os maiores níveis de cinética podem ser explicados pela presença de colesterol e ciclodextrina no BotuSêmen Gold®, visto que o fosfocaseinato nativo e o caseinato de sódio são moléculas semelhantes, proporcionando um nível adequado de proteção.

No entanto, é imperativo conduzir pesquisas adicionais para validar a fertilidade do sêmen criopreservado com o uso de extensores testados nessa pesquisa.

## 6. CONCLUSÃO

Os diluentes a base de colesterol obtiveram níveis superiores de cinética pós-descongelamento em comparação com os extensores à base de leite desnatado no processo de criopreservação do sêmen. De forma geral, BotuSêmen Special® e BotuSêmen Gold® são as melhores escolhas para a centrifugação pré-congelamento de amostras seminais. No entanto, é crucial a avaliação individual de cada garanhão, a fim de selecionar o diluente que melhor atenda às necessidades específicas para a utilização bem-sucedida do material genético a longo prazo, bem como obter melhores resultados de fertilidade com sêmen congelado equino.

## REFERÊNCIAS

AMANN, R. Functional Anatomy of the Adult Male. In: Mckinnon, A.O. Equine Reproduction, 2. ed., v.2, p. 868–879, 2011.

ARRUDA, Rubens Paes de et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

AURICH, Christine. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.

AURICH, Jörg et al. Efficiency of semen cryopreservation in stallions. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1033, 2020.

BARKER, C. A. V.; GANDIER, J. C. C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v. 21, n. 2, p. 47, 1957.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 189-194, 2014.

BRINSKO, Steven P. et al. **Manual of equine reproduction**. Elsevier Health Sciences, 2010.

CAMARGO, Carlos Eduardo. A arte de inseminar éguas com sêmen congelado. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 226-230, 2023.

CAMPOS, Gabriela A. et al. Sodium caseinate and cholesterol improve bad cooler stallion fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 93, p. 103201, 2020.

CAMPOS, Gabriela Amorim. Comparação entre diluentes a base de leite desnatado e caseinato de sódio na refrigeração do sêmen equino. 2018.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CUPPS, Perry T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. Elsevier, 1991.

DAVIES, Morel et al. The reproductive anatomy of the stallion. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**, n. Ed. 3, p. 15-27, 2008.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. The spermatozoon. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**, v. 1, p. 3-54, 2006.

ESMAIL, Ahmed et al. Effect of Cryopreservation on Arabian Stallion Semen After Adding INRA96 and DMF Based Extenders. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 13, n. 4, p. 594-598, 2023.

ESTEVES, Sandro Cassiano; SPAINE, Deborah Montagnini; CEDENHO, Agnaldo Pereira. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 985-992, 2007.

FERRER, M. S. et al. Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen. **Animal reproduction science**, v. 221, p. 106581, 2020.

FOSTER, M. L. et al. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1499-1505, 2011.

GOBATO, Mariana Luiza Mezzena. Efeito de diferentes diluentes na qualidade e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento Pêga (*Equus asinus*). 2020.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

GUASTI, P. N. et al. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. **Animal reproduction science**, v. 179, p. 27-34, 2017.

GUASTI, Priscilla Nascimento. Avaliação dos constituintes proteicos do plasma seminal e da membrana plasmática se espermatozoides e sua correlação com a fertilidade de garanhões. 2014.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, Sally E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HARTWIG, F. P. et al. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 340-346, 2014.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, Camilo; LOVE, Charles. Cool-stored and frozen-thawed stallion semen: thoughts on collection, evaluation, processing, insemination, and fertility. **Clinical Theriogenology**, v. 13, n. 3, p. 280-288, 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. 2021. Rebanho de equinos (cavalos). Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>

IAFFALDANO, Nicolaia et al. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 3-4, p. 220-228, 2014.

JASKO, D. J. et al. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. In: **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)**. 1993.

JOHANNISSON, Anders; COJKIĆ, Aleksandar; MORRELL, Jane M. The relationship between sperm quality parameters and stallion fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104592, 2023.

KENNY, R. M. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. **Proc Am Ass in Equine Practitioners**, p. 327-336, 1975.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

MONTEIRO, Gabriel Augusto et al. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis. **Veterinária e Zootecnia**, p. 255-263, 2011.

MOORE, Amanda I.; SQUIRES, Edward L.; GRAHAM, James K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 241-249, 2005.

NEGRI, P. et al. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1236-1239, 1996.

NEUHAUSER, Stefanie 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.

NOVELLO, Guilherme et al. Stallion semen cooling using native phosphocaseinate-based extender and sodium caseinate cholesterol-loaded cyclodextrin-based extender. **Journal of equine veterinary science**, v. 92, p. 103104, 2020.

OLIVEIRA, Sidnei Nunes de. Efeito do glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado equino. 2020.

PAGL, Roland et al. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 C. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1115-1122, 2006.

PAPA, F. O. et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Sci Vet**, v. 33, n. Suppl 1, p. 19-27, 2005.

PAPA, F. O. **Reprodução de Garanhões**. São Paulo: Editora Med Vet, 2020.

PETER, Augustine T. et al. Andrology laboratory review: evaluation of sperm motility. **Clinical Theriogenology**, v. 13, n. 1, p. 24-36, 2021.

REČKOVÁ, Zuzana et al. The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. **Animal Bioscience**, v. 35, n. 5, p. 670, 2022.

SAACKE, R. G.; ALMQUIST, J. O. Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal, ejaculated sperm. **American Journal of Anatomy**, v. 115, n. 1, p. 143-161, 1964.

SAMPER, Juan C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Elsevier Health Sciences, 2008.

SILVA, Luis Fernando Mercês Chaves. Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelamento. 2016.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University. **Bulletin**, v. 9, 1999.

SQUIRES, E. L. et al. Semen cryopreservation-challenges and perspectives. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v. 37, p. 136-139, 2013.

STEPHENS, Taylor D. et al. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. **Journal of equine veterinary science**, v. 33, n. 8, p. 615-621, 2013.

TSUNODA, Roberta Harue. **Efeitos da pentoxifilina sobre a qualidade espermática e hemodinâmica uterina em equinos**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

VAN MOL, Bram. **ADVANCED TECHNIQUES FOR SELECTION OF EQUINE SPERMATOZOA**. 2020. Tese de Doutorado. Ghent University.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2015.

VARNER, D. D, JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: Mckinnon, A.O. Equine Reproduction, 2. ed., v.2, p. 909-990, 2011.

VARNER, D. D. et al. Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 677-685, 2008.

VITA, Bruna de et al. Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação. **Ciência Animal Brasileira**, p. 120-125, 2011.

## AVALIAÇÃO DOS RESIDENTES

ANO: 2024

NOME DO RESIDENTE: Bruna Merc de Zutter

DEPARTAMENTO: CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

ÁREA: Fisiopatologia da Reprodução e Obstetrícia

PRECEPTOR: Prof(a). Dr(a). Frederico Ozanam Papa

### I – AVALIAÇÃO:

Nota das atividades realizadas no período e a entrevista (NA)	9.0
Nota do trabalho de conclusão (monografia) (NTC)	10.0
Nota do desempenho durante as atividades de Residência, emitida pelo Preceptor (ND)	10.0
Média = $\frac{(NA \times 1) + (NTC \times 1) + (ND \times 1)}{3}$	9.6

Botucatu, 26/02/2024

Prof(a). Dr(a). Eunice Oba

Prof(a). Dr(a). Frederico Ozanam Papa

Prof(a). Dr(a). João Carlos Pinheiro Ferreira

