

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LAVRAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FELIPE DE SOUSA GOMES PIMENTA

LAVRAS-MG

2024

FELIPE DE SOUSA GOMES PIMENTA

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário de Lavras, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Matheus Camargos de Britto Rosa

LAVRAS-MG

2024

FELIPE DE SOUSA GOMES PIMENTA

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário de Lavras, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

APROVADO EM ____/____/____

ORIENTADOR

Prof. Dr. Matheus Camargos de Britto Rosa

LAVRAS-MG

2024

Ficha Catalográfica preparada pelo Setor de
Processamento Técnico da Biblioteca Central do
UNILAVRAS

P644c Pimenta, Felipe de Sousa Gomes.
Criopreservação de sêmen de garanhão / Felipe de Sousa Gomes
Pimenta. – Lavras: Unilavras, 2024.

33f.: il.

Portfólio acadêmico (Graduação em Medicina Veterinária) –
Unilavras, Lavras, 2024.

Orientador: Prof. Matheus Camargos de Britto Rosa.

1. Biotecnologias reprodutivas. 2. Congelamento de sêmen. 3.
Garanhão equino. 4. Melhoramento genético. I. Rosa, Matheus
Camargos de Britto. (Orient.). II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus, por me guiar e fortalecer em todos os momentos da minha vida. Sem Ele, nada disso seria possível.

Gostaria também de agradecer à minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha jornada acadêmica e profissional. Em especial, agradeço aos meus pais Carlos José Pimenta e Maria Emília de Sousa Gomes, por serem minha base e meu suporte incondicional.

Meus sinceros agradecimentos também aos meus avós, Waldenor da Rocha Gomes, Gildeia Duarte de Sousa, José Pimenta Neto, e minha querida avó falecida, Magali Aparecida de Alvarenga Pimenta. Vocês sempre acreditaram em mim e me incentivaram a buscar meus sonhos.

Um agradecimento especial a todos os meus tios, especialmente a Guilherme de Sousa Gomes, e ao meu falecido tio Maximilian de Sousa Gomes, que foram figuras importantes na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus professores, especialmente ao meu professor e orientador Matheus Camargos de Britto Rosa, por toda a orientação, paciência e ensinamentos valiosos que me ajudaram a crescer e me desenvolver academicamente.

Sou muito grato ao grupo de estudo Hippius, que me proporcionou um ambiente de aprendizado colaborativo e enriquecedor.

Gostaria de agradecer imensamente ao médico veterinário Miguel Pizzolante Bottino por todo o conhecimento transmitido e por todo o apoio durante meu estágio. Também sou grato por todas as amizades que fiz durante essa experiência, que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos vocês, meu mais sincero muito obrigado.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino” (Leonardo Da Vinci)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotômetro Minitube utilizado para análise de concentração espermática do sêmen.	12
Figura 2- Coleta de sêmen de garanhão utilizando vagina artificial.	14
Figura 3- Processamento do ejaculado utilizando centrífuga.	15
Figura 4- Separação de plasma seminal em tubo de Falcon.....	16
Figura 5- Palhetas envasadas e identificadas.	17
Figura 6- Equipamento utilizado para o congelamento de sêmen.....	18
Figura 7- Criopreservação de sêmen em botijões de Nitrogênio.....	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 DESENVOLVIMENTO	09
2.1 Descrição do local de estágio	09
2.2 Atividades desenvolvidas	09
2.3 Coleta e criopreservação de sêmen de garanhão	12
3 AUTO AVALIAÇÃO	19
4 CONCLUSÃO	20
5 ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
Introdução	23
Criopreservação de sêmen	24
Efeitos negativos da criopreservação de sêmen	25
Congelamento e descongelamento de sêmen	26
Influência da criopreservação na qualidade do sêmen equino	28
Etapas da criopreservação de sêmen equino.....	30
4 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

No final de 2016 realizei minha inscrição para o vestibular de Medicina Veterinária na Unilavras, sendo esse um grande passo na realização de um sonho de criança. Pertencço a uma família enraizada no agronegócio, esse fato me possibilitou vivenciar o ambiente rural e o convívio com os animais desde minha infância. Com o passar do tempo tive o privilégio de tornar essa realidade parte da minha vida, escolhendo a Medicina Veterinária como profissão para a vida.

Apesar de ser apaixonado pela área de Reprodução, durante o período de graduação tive a oportunidade de participar do grupo de estudos Hippius, no qual fiz amizades que levarei por toda minha vida e onde despertei um grande interesse pela clínica de equinos. Após concluir a graduação pretendo me especializar em reprodução de grandes animais para adquirir mais conhecimentos e experiência nessa área, e me tornar um profissional mais completo e competente.

A vivência de estágio descrita nesse trabalho foi realizada na empresa Matriz Genética localizada na cidade de Lavras, no estado de Minas Gerais. Essa experiência foi fundamental para desenvolver novos conhecimentos e práticas relacionados à reprodução de equinos. Nessa etapa tive a oportunidade de realizar diversos manejos reprodutivos como: seleção de animais para reprodução, protocolos de inseminação artificial em tempo real, acompanhamento gestacional, transferência de embriões, coleta e congelamento de sêmen. Todas as atividades desenvolvidas no período de estágio foram acompanhadas pelos médicos veterinários da equipe responsáveis pelas diferentes etapas do manejo reprodutivo desenvolvidas pela empresa.

Além de conhecer a rotina, pude correlacionar toda a prática com os conhecimentos adquiridos nas disciplinas do curso e toda a literatura científica atual sobre o assunto. Essa vivência, foi de grande importância tanto para minha formação pessoal quanto profissional, além de proporcionar a aplicação prática de todos os conhecimentos adquiridos durante o curso de graduação em Medicina Veterinária, tive a oportunidade de conhecer e aprender com grandes profissionais da área.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Descrição do local do estágio

O estágio descrito a seguir foi realizado na empresa Matriz Genética - Veterinária Avançada que oferece assistência técnica focada em biotecnologias da reprodução aplicadas à equinos e bovinos. A empresa está localizada no município de Lavras-MG e atende criadores de equinos de diversas cidades da região sul de Minas Gerais. O médico veterinário Miguel Pizzolante Bottino é o profissional responsável pela empresa e atua especialmente com o manejo reprodutivo de equinos e bovinos.

Durante essa vivência tive a oportunidade de colocar em prática meus conhecimentos teóricos e práticos em reprodução de equinos. Essa vivência superou todas as minhas expectativas, pois tive oportunidade de realizar todas as etapas do manejo reprodutivo de equinos e conhecer detalhadamente as diversas biotecnologias de reprodução animal.

2.2 Atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio participei em todas as etapas relacionadas à biotecnologia da reprodução de equinos que a empresa trabalha. As atividades foram desenvolvidas durante o acompanhamento da atuação do médico veterinário responsável nas propriedades atendidas pela empresa.

As biotecnologias reprodutivas buscam principalmente melhorar a eficiência reprodutiva dos animais e propagar genética de qualidade aumentando a quantidade de potros de genética superior produzidos anualmente. Essas tecnologias estão em constante desenvolvimento e cada vez mais são adotados por produtores de equinos. Dessa forma, é exigido que o profissional que irá atuar nessa área se mantenha atualizado e informado sobre equipamentos, técnicas e manejos utilizados para alcançar os objetivos determinados pelos produtores.

Nas propriedades atendidas pela empresa inicialmente era realizada a avaliação reprodutiva do plantel equino. Nessa avaliação eram selecionados os animais com características de interesse e eram avaliados atributos do animal

como idade, escore de condição corporal, estado nutricional e sanitário, e características relacionadas à saúde reprodutiva dos animais para determinar os animais mais aptos às técnicas de biotecnologias reprodutivas.

Em fêmeas eram analisados os históricos de gestações das éguas e também era realizada a identificação do estro. Em machos era realizado o exame andrológico para avaliar detalhadamente as características reprodutivas do garanhão como o estado físico e sanitário do animal, os órgãos reprodutivos e a qualidade do sêmen.

As amostras de sêmen dos animais selecionados eram transportadas ao laboratório onde eram submetidas ao exame de espermograma para avaliar tanto a quantidade quanto a qualidade dos espermatozóides presentes na amostra.

A Figura 1 apresenta o Fotômetro Minitube utilizado para calcular a concentração espermática das amostras no sêmen. No exemplo apresentado na Figura 1 a concentração espermática da amostra analisada foi de 223×10^6 espermatozóides/ml de sêmen (em destaque).

Figura 1- Fotômetro Minitube utilizado para análise de concentração espermática do sêmen.



Fonte: Autor, 2024.

Após os exames andrológicos era realizada a coleta de sêmen dos garanhões selecionados para reprodução. O sêmen coletado passa por algumas etapas de preparação após a coleta como diluição, centrifugação para retirada do plasma seminal e incorporação de crioprotetores.

As amostras de sêmen preparadas são envasadas em palhetas e inseridas na máquina de congelamento, em seguida as palhetas são armazenadas em nitrogênio para sua preservação e posterior utilização em programas reprodutivos.

Após a seleção e mapeamento dos animais aptos à reprodução são realizados os protocolos de indução ao estro e inseminação das éguas, e, posterior exame de ultrassonografia para diagnóstico precoce e acompanhamento gestacional.

Na empresa também auxiliei nas atividades relacionadas à outras biotecnologias reprodutivas como a transferência de embriões, sexagem fetal e produção de embriões *in vitro*. A oportunidade de conhecer as diferentes biotecnologias aplicadas à reprodução de equinos ampliou minha visão sobre as diferentes formas de atuação que um médico veterinário deve conhecer e dominar para alcançar os objetivos reprodutivos almejados.

2.3 Coleta e criopreservação de sêmen de garanhão

A coleta de sêmen é uma atividade fundamental no manejo reprodutivo de equinos, uma vez que o sêmen contém o material genético dos garanhões selecionados. Esse material deve ser preservado em segurança para ser utilizado em diversas biotecnologias reprodutivas que ajudem a propagar os genes de interesse no plantel e aumentar a quantidade de potros produzidos.

O sêmen é o material mais importante do programa reprodutivo, devido a isso, é necessário o manejo adequado em todas as etapas de preparação desse material. Desde a coleta até a criopreservação.

A primeira etapa prática do manejo é a coleta de sêmen dos garanhões selecionados (Figura 2). O procedimento é realizado com auxílio de uma égua contida por uma corda a qual vai ser montada e uma vagina artificial para coleta do ejaculado. O procedimento deve ser realizado com segurança tanto para os animais quanto para o médico veterinário.

Figura 2- Coleta de sêmen de garanhão utilizando vagina artificial.



Fonte: Autor, 2024.

Após a coleta do ejaculado, é incorporado o diluidor para transporte de sêmen Botusêmen, que é composto de leite em pó desnatado, açúcares e aminoácidos que protegem os espermatozóides e melhoram a qualidade seminal.

Foi utilizada a proporção 1:1 de Diluente:Sêmen conforme recomendações do fornecedor. O diluidor também é um componente fundamental para a centrifugação do ejaculado antes do congelamento.

A amostra contendo o sêmen e o diluidor é processada utilizando uma centrífuga Tecnal NT-810 (Figura 3) para separar o plasma seminal dos pallets de espermatozóide que após a centrifugação ficam concentrados no fundo do Tubo de Falcon.

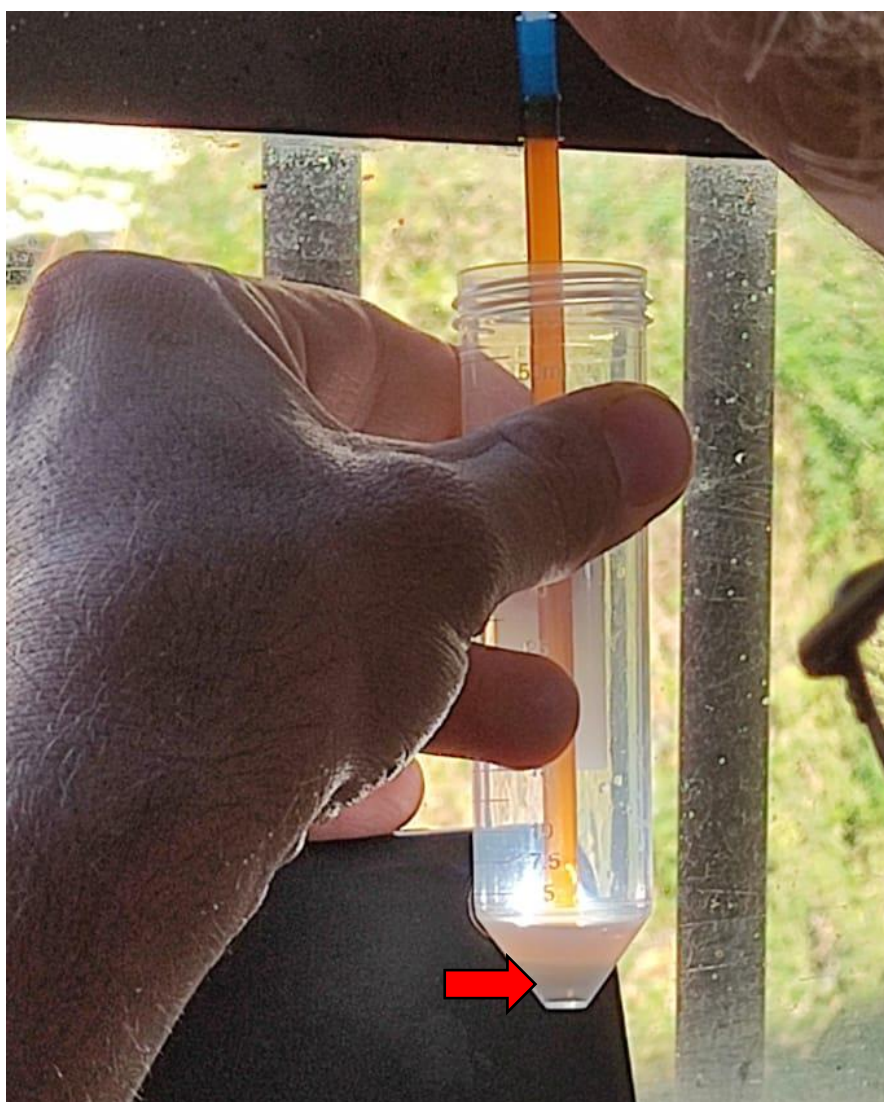
Figura 3- Processamento do ejaculado utilizando centrífuga.



Fonte: Autor, 2024.

A retirada do plasma seminal é realizada após a centrifugação que sedimenta somente os pallets de espermatozóides no fundo do tubo de Falcon (Figura 4).

Figura 4- Separação de plasma seminal em tubo de Falcon.



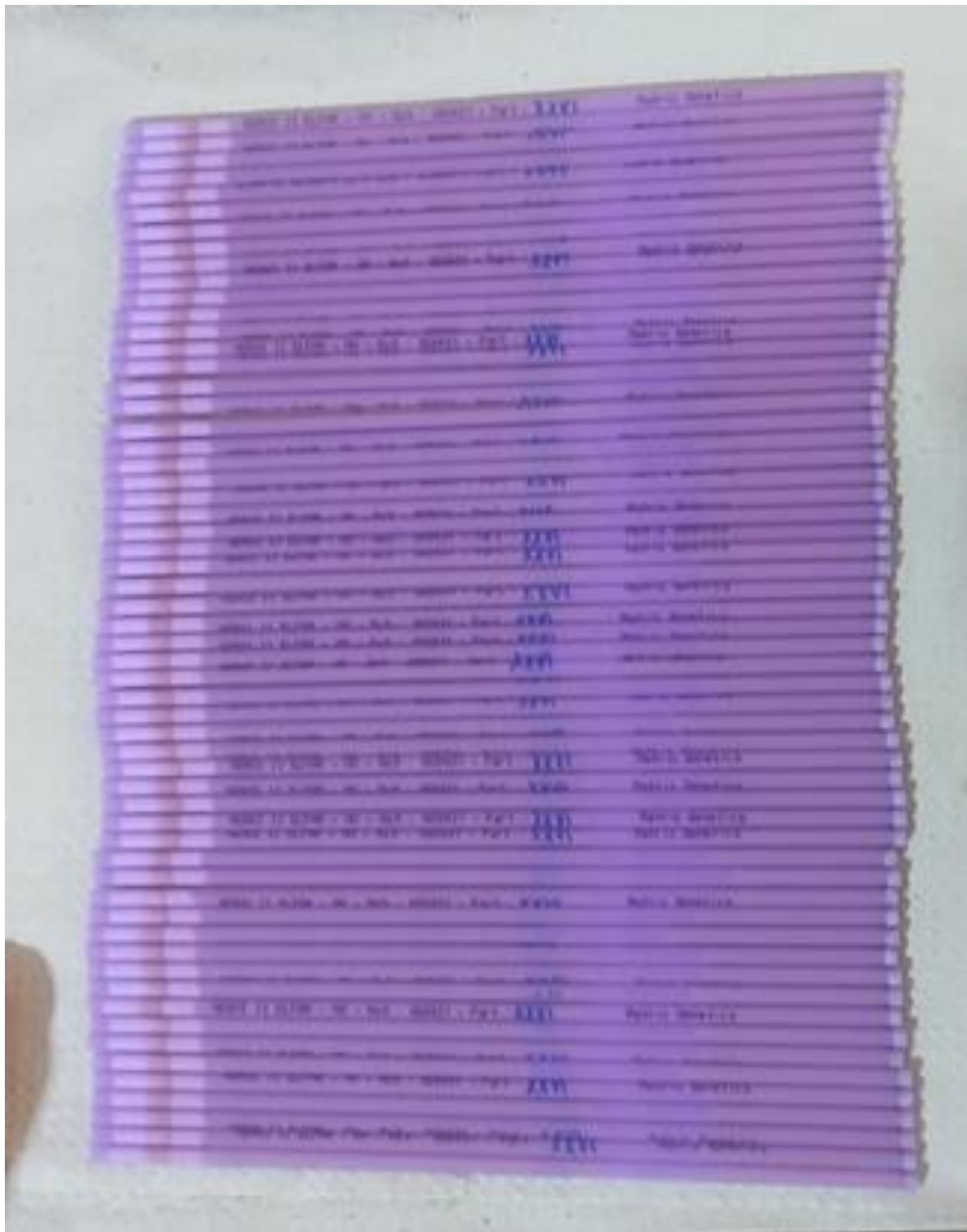
Fonte: Autor, 2024.

Após a separação do plasma seminal é realizada a diluição do pellet de sêmen com o crioprotetor Botucrio que auxilia na motilidade, integridade e viabilidade dos espermatozóides.

Na sequência o material é envasado em palhetas com a identificação do animal (Figura 5). As palhetas envasadas são lacradas com uma esfera metálica

e posteriormente são direcionadas à máquina de congelamento.

Figura 5- Palhetas envasadas e identificadas.



Fonte: Autor, 2024.

A máquina de congelamento modelo TK 3000 (Figura 6) começa com uma curva positiva que inicia em 24 °C reduzindo gradativamente até alcançar 0,5°C por minuto. Em seguida é realizada a estabilização, que reduz a temperatura até alcançar -120 °C.

Figura 6- Equipamento utilizado para o congelamento de sêmen.



Fonte: Autor, 2024

Por fim, o material congelado nas palhetas é retirado do copo de congelamento e armazenado em botijões contendo nitrogênio líquido (-196°C) para criopreservação do material genético por tempo indeterminado (Figura 7).

Figura 7- Criopreservação de sêmen em botijões de nitrogênio.



Fonte: Autor, 2024

3 AUTO AVALIAÇÃO

Durante o período de estágio na empresa Matriz Genética tive oportunidade de conhecer mais sobre as práticas diárias relacionadas à Biotecnologias da reprodução de equinos. Essas práticas englobam desde a seleção de animais como matrizes e reprodutores até a aplicação e acompanhamento dos protocolos de indução ao cio, inseminação artificial, controle gestacional, etc.

Nas atividades vivenciadas no estágio tive a oportunidade de colocar em prática diversos conhecimentos adquiridos nas disciplinas do curso de Medicina Veterinária e integrar os conhecimentos adquiridos no grupo de estudos com as práticas desenvolvidas no estágio.

Entre os diversos manejos que acompanhei, aprendi bastante sobre a prática diária com o médico veterinário responsável, que se mostrou experiente e eficiente no manejo reprodutivo dos animais. Acompanhar essas experiências foi enriquecedor e de altíssima importância para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, além de me trazer grandes reflexões sobre a ética e a responsabilidade da profissão.

4 CONCLUSÃO

As experiências vivenciadas durante o estágio supervisionado foram fundamentais para o meu desenvolvimeto tanto profissional quanto pessoal. Durante esse período tive oportunidade de correlacionar e aplicar todos os conhecimentos teóricos adquiridos nas disciplinas do curso de forma prática em situações da rotina profissional de um médico veterinário.

O mercado de equinos movimenta bilhões anualmente e cada vez mais a qualidade genética dos animais se torna importante para o desenvolvimento de novas tecnologias e práticas reprodutivas que auxiliem no manejo reprodutivo estratégico dos plantéis.

As biotecnologias reprodutivas são ferramentas fundamentais no desenvolvimento reprodutivo do plantel. A criopreservação é uma biotecnologia fundamental para preservação e propagação de genes superiores no rebanho. No entanto, para que seja realizado corretamente é necessário que a realização seja dirigida ou supervisionada por profissionais qualificados.

No estágio tive a oportunidade de uma grande troca de conhecimentos e experiências com grandes profissionais da área de reprodução equina. Este fato me motivou a estudar mais sobre o tema e me desenvolver como um profissional consciente e capacitado para atuar nessa área, que apresenta inúmeras possibilidades de pesquisa e atuação.

O período de estágio assim como a elaboração desse portfólio foram etapas fundamentais para minha formação pessoal e profissional. Pude desenvolver e colocar em prática os conhecimentos assimilados durante a graduação e integrar os conhecimentos adquiridos nas disciplinas do curso com as práticas de exercício profissional.

Além de ampliar meus conhecimentos em relação às principais biotecnologias utilizadas na reprodução de equinos, também adquiri novos conhecimentos nessa área, o que me estimulou a buscar cada vez mais novos conhecimentos através da leitura de artigos e contato direto com excelentes profissionais da área durante a vivência do estágio obrigatório.

Os aprendizados adquiridos nas disciplinas ministradas no curso foram de extrema relevância para a minha formação, pois me deram base para aplicar de

maneira prática o que havia visto na teoria construindo uma vivência profissional prática da profissão que escolhi para minha vida.

Espero que esse trabalho sirva como base para futuros pesquisadores e profissionais que tenham interesse nessa área tão diversa, enriquecedora e que permanece constantemente em transformação. Que os conhecimentos compartilhados nesse portfólio possam colaborar e enriquecer com o desenvolvimento de novos conhecimentos e estimular futuros profissionais da área.

5. REVISÃO DE LITERATURA



Revisão de literatura

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÃO

Cryopreservation of stallion semen

Felipe de Sousa Gomes Pimenta¹, Matheus Camargos de Britto Rosa²

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, Lavras-MG, Brasil.

²Professor titular do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, Lavras-MG, Brasil.

RESUMO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores mundiais de equinos, um mercado que movimenta bilhões de reais anualmente. Nesse cenário, cada vez mais é exigido um aumento na produção de animais com características de interesse econômico. Os programas de melhoramento animal buscam selecionar indivíduos com genética superior para a reprodução melhorando assim a genética do plantel por propagar genes desejáveis aos descendentes. As técnicas desenvolvidas para reprodução são práticas utilizadas para obter resultados mais expressivos no desempenho reprodutivo dos animais. Entre as principais biotecnologias utilizadas em programas de reprodução de equinos, a inseminação artificial e a transferência de embriões têm sido amplamente utilizadas por criadores de equinos. Entretanto a obtenção de resultados satisfatórios na implementação dessas biotecnologias é diretamente influenciada pela qualidade do material genético utilizado. A criopreservação é uma biotecnologia que possibilita o armazenamento e preservação de material genético superior de garanhões para utilização estratégica para melhorar a genética e o desempenho reprodutivo do rebanho. A criopreservação é uma ferramenta eficiente no desenvolvimento reprodutivo do rebanho que deve ser desenvolvida por profissionais que considerem a interação dos gametas com as baixas temperaturas, as curvas de congelamento, diluidores e crioprotetores que possam ser utilizados para melhorar a eficiência dessa biotecnologia e assegurar a preservação dos gametas selecionados.

Palavras-chave: Biotecnologias reprodutivas, Congelamento de sêmen, Garanhão equino, Melhoramento genético, Crioproteção de gametas.

CRYOPRESERVATION OF STALLION SEMEN

Felipe de Sousa Gomes Pimenta¹, Matheus Camargos de Britto Rosa²

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, Lavras-MG, Brasil.

² Professor titular do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS, Lavras-MG, Brasil.

ABSTRACT

Brazil stands out as one of the world's largest producers of horses, a market that generates billions of reais annually. In this scenario, an increase in the production of animals with characteristics of economic interest is increasingly required. Animal breeding programs seek to select individuals with superior genetics for reproduction, thus improving the genetics of the herd by propagating desirable genes to descendants. Reproductive biotechnologies are practices used to obtain more significant results in the reproductive performance of animals. Among the main biotechnologies used in equine breeding programs, artificial insemination and embryo transfer have been widely used by equine breeders. However, obtaining satisfactory results in the implementation of these biotechnologies is directly influenced by the quality of the genetic material used. Cryopreservation is a biotechnology that enables the storage and preservation of superior genetic material from stallions for strategic use to improve herd genetics and performance. Cryopreservation is an efficient tool in the reproductive development of the herd that must be developed by professionals who consider the interaction of gametes with low temperatures, freezing curves, extenders and cryoprotectants that can be used to improve the efficiency of this biotechnology and ensure the preservation of selected gametes.

Keywords: Reproductive biotechnologies, Semen freezing, Equine stallion, Genetic improvement, Gamete cryoprotect.

Introdução

O Brasil possui o quarto maior plantel equino mundial com aproximadamente 5.799.514 milhões de animais. Os mesmos estão alocados em 1.170.696 estabelecimentos e o estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor brasileiro da espécie com um plantel de 805 mil equinos. Os equinos são animais robustos e resistentes podendo ser direcionados à diversas atividades relacionadas à trabalho, lazer e competição (IBGE, 2023).

O mercado nacional de equinos movimenta em média R\$30 milhões anuais e tem se desenvolvido cada vez mais, torna-se mais produtivo e mais exigente com a qualidade genética dos indivíduos produzidos. Nesse cenário torna-se indispensável desenvolver e aprimorar tecnologias que colaborem com o aumento de produtividade nas propriedades e otimizem os sistemas de criação e a rentabilidade dos plantéis (FAO, 2022).

Nesse contexto, as técnicas reprodutivas se apresentam como estratégias fundamentais para o desenvolvimento dos plantéis equinos. Entre essas técnicas, a inseminação artificial (IA) mostra-se como a técnica mais utilizada em todo mundo, uma vez que agrega diversas vantagens aos rebanhos. As vantagens da IA ficam mais evidenciadas em relação ao processo de monta natural uma vez que possibilita a utilização de sêmen de garanhões geneticamente superiores permitindo a aceleração de ganho genético, gerando potros que apresentem características genéticas de interesse econômico (ALVARENGA; PAPA; NETO, 2017).

Existem diversas técnicas reprodutivas além da IA que podem ser utilizadas estrategicamente para alcançar uma melhor eficiência reprodutiva considerando os principais sistemas de produção adotados no Brasil. Assim, destacam-se biotecnologias como a transferência de embriões, a fertilização *in vitro* e a clonagem. Para desenvolver as mesmas com eficiência é necessário primeiramente selecionar reprodutores com materiais genéticos de alta qualidade, uma vez que as biotecnologias reprodutivas ampliam a propagação dos genes de interesse em maior escala no rebanho. Sendo assim, no cenário atual da pecuária brasileira, as biotecnologias reprodutivas passam a ocupar um papel determinante para o desenvolvimento tecnológico da pecuária nacional possibilitando a seleção e propagação do material genético superior para o melhoramento genético (ALVARENGA; PAPA; NETO, 2017).

O sêmen é um fluido orgânico produzido pelos machos que serve de veículo para os espermatozoides produzidos pelo garanhão. Esse fluido carrega o material genético selecionado que será assimilado ao plantel, tanto para inseminação artificial de matrizes quanto para a fertilização *in vitro*. Ademais, as biotecnologias apresentam melhores resultados quando realizadas utilizando sêmen fresco no entanto existem diversos fatores que limitam o manejo de sêmen fresco. Diante dessas limitações a criopreservação se apresenta como uma estratégia reprodutiva de grande importância, uma vez que permite utilizar material genético superior de maneira estratégica para aumentar a qualidade genética e a produtividade do plantel (PAPA, 2020).

Diante do cenário apresentado e das possibilidades de potencializar a eficiência dos rebanhos brasileiros utilizando as técnicas reprodutivas, o presente trabalho tem como principal objetivo discutir a biotecnologia de criopreservação de sêmen de garanhões equinos através de uma breve revisão de literatura abordando os aspectos fundamentais da criopreservação, vantagens e limitações dessa técnica e sua importância nos programas de melhoramento genético e no aumento de produtividade de plantéis equinos.

Criopreservação

A preservação de material biológico em baixas temperaturas é uma técnica antiga utilizada para melhorar a eficiência reprodutiva. Em 1957 foi relatada a primeira inseminação artificial utilizando sêmen equino criopreservado acarretando na primeira gestação equina do mundo utilizando essa técnica. Desde então, os estudos prosseguiram e atualmente a criopreservação têm sido apontada como uma das biotecnologias reprodutivas mais expressivas na reprodução de equinos e de diversas outras espécies (AL-KASS; MORRELL, 2024).

Os programas de melhoramento genético identificam através de avaliações detalhadas os animais que apresentam atributos fenotípicos desejáveis e genes favoráveis que possam ser replicáveis e expressos nos descendentes. Essa seleção permite a propagação estratégica desses genes no plantel, permitindo ao produtor decidir estrategicamente o momento da inseminação (CAMARGO, 2023).

A criopreservação possibilita um melhor aproveitamento e valorização de ganhões geneticamente superiores, possibilita inseminar um maior número de fêmeas por ano, armazenamento e preservação do material por tempo indeterminado, facilita o transporte e a comercialização do material genético à plantéis geograficamente distantes e possibilita continuidade nos programas de melhoramento genético mesmo em caso de perda do animal (VITA et al., 2011; SQUIRES et al., 2013).

É importante ressaltar que todas as etapas relacionadas à aplicação de biotecnologias reprodutivas como inseminação artificial (IA) e transferência de embrião (TE) são diretamente influenciadas pela qualidade do sêmen utilizado. Sendo assim, podemos considerar que a criopreservação é uma biotecnologia complexa e que deve ser realizada de forma consciente e responsável desde a coleta do material até o congelamento e armazenamento dele. O manejo inadequado do sêmen durante as etapas de coleta e congelamento podem comprometer a qualidade do material e, conseqüentemente, a eficácia de outras biotecnologias que demandem esse material como recurso (AL-KASS; MORRELL, 2024).

O processo de criopreservação apresenta efeitos negativos na morfologia e funcionalidade dos espermatozoides, podendo comprometer a fertilidade do sêmen. Diversos estudos apresentaram dados referentes à redução na taxa de prenhez em protocolos de IATF (inseminação artificial em tempo fixo) utilizando sêmen congelado, apontando que essa taxa pode alcançar até 75% de redução ao ser comparado com protocolos utilizando sêmen fresco (OLIVEIRA et al., 2013; JOHANNISSON et al., 2023; AL-KASS; MORRELL, 2024).

Entretanto a taxa de prenhez utilizando sêmen congelado pode ser otimizada utilizando maiores quantidades de sêmen na inseminação artificial (maior número de palhetas) ou utilizando amostras de sêmen que apresentem maior concentração espermática (VITA et al., 2019). A associação de diluidores e crioprotetores consegue proteger os espermatozoides dos efeitos negativos que ocorrem no processo de criopreservação aumentando, conseqüentemente, a taxa de prenhez em plantéis que utilizam essa biotecnologia como alternativa para o armazenamento e a preservação do material genético (REIKOVÁ et al., 2022).

A criopreservação é uma biotecnologia reprodutiva amplamente utilizada para melhorar a eficiência reprodutiva e engloba as etapas de exame andrológico e seleção de ganhões; coleta, manejo e transporte do sêmen; eficácia e eficiência de diluidores e crioprotetores; congelamento e descongelamento das amostras de sêmen; controle de conservação (congelamento) e armazenamento correto para preservação das amostras (CAMARGO, 2023).

É recomendada a avaliação andrológica dos garanhões acompanhada de espermograma para avaliar aspectos fundamentais do sêmen como características gerais (cor, textura, etc); concentração (quantidade de espermatozóides por volume de ejaculado); morfologia, vigor, motilidade e turbilhonamento dos espermatozóides. Cada amostra de sêmen pode apresentar um comportamento específico ao congelamento, e para evitar alta variabilidade nas amostras é fundamental selecionar garanhões que produzam sêmen mais resistentes ao processo de congelamento (AURICH et al., 2020; PAPA, 2020).

A coleta de sêmen deve ser realizada por profissional médico veterinário evitando manejos que possam estressar o animal e reduzindo os riscos de acidentes no manejo. A coleta pode ser realizada utilizando uma vagina artificial equipada com um copo coletor e água aquecida à 45^oC. Pode ser utilizado um manequim ou uma fêmea em estro para estimular a monta do garanhão. Além disso, a introdução do pênis e coleta do ejaculado deve ser controlada pelo responsável, caso necessário devem ser utilizados instrumentos de contenção para evitar acidentes. Os animais e equipamentos devem ser limpos e desinfetados e o material coletado deve ser enviado rapidamente ao laboratório de análises para evitar contaminações e perda de viabilidade (VITA et al., 2011).

Efeitos negativos da criopreservação de sêmen de garanhões

Embora a criopreservação seja uma biotecnologia com potencial de melhorar significativamente as taxas de fertilidade dos rebanhos, esse método de conservação pode comprometer a viabilidade espermática devido às interações das baixas temperaturas com a morfologia e metabolismo dos espermatozóides presentes na amostra de sêmen. Os principais aspectos relacionados à essas interações são a formação de cristais de gelo no interior das células espermáticas, desidratação das células espermáticas e choques térmicos que afetam o metabolismo espermático (SQUIRES et al., 2013).

Esses aspectos afetam atributos fundamentais dos espermatozóides como o metabolismo e a motilidade reduzindo, conseqüentemente, as taxas de sucesso nas inseminações e outras biotecnologias reprodutivas (PAPA, 2020).

As baixas temperaturas também afetam a composição da membrana plasmática dos espermatozóides e reduz a atividade das enzimas acrossomais, responsáveis pela penetração no óvulo e sobrevivência do gameta no trato reprodutivo da fêmea (CAMARGO, 2023).

A membrana plasmática dos espermatozóides é composta principalmente por fosfolipídeos e proteínas e apresenta estado fluído à temperatura corporal possibilitando a interação com outras moléculas (VITA et al., 2019).

A permeabilidade da membrana é realizada pelas proteínas estruturais que são comprometidas em baixas temperaturas devido ao desalinhamento das camadas de fosfolipídeos e proteínas reduzindo ou aumentando a taxa de passagem na membrana (ALVARENGA; PAPA; NETO, 2017). Sendo assim, os fosfolipídeos estruturais da membrana congelam impossibilitando a movimentação das proteínas fluidamente acarretando aumento na permeabilidade da membrana plasmática e redução do metabolismo espermático (OLIVEIRA et al., 2013).

Os equinos apresentam menor proporção de colesterol na composição da membrana do que outras espécies de mamíferos como bovinos e bubalinos. Essa característica reduz drasticamente a resistência dos gametas às baixas temperaturas (ALKASS; MORRELL, 2024).

As células espermáticas são submetidas à estresse térmico tanto na etapa de

congelamento quanto na etapa de descongelamento. Em temperaturas negativas ocorre a formação de cristais de gelo no interior da célula. Esses cristais expulsam a água intracelular causando desidratação espermática (OLIVEIRA et al., 2013).

As práticas corretas no manejo de criopreservação podem minimizar os efeitos negativos do congelamento de gametas dos garanhões. Nesse sentido é necessário promover uma integração correta do congelamento buscando técnicas mais ajustadas e a utilização de diluidores e crioprotetores para proteger os gametas (AL-KASS; MORRELL, 2024).

Congelamento e descongelamento de sêmen

Na criopreservação ocorre desidratação gradativa da água intracelular para o meio extracelular. Entretanto, nas etapas de congelamento e descongelamento dos gametas devem ser evitados cenários que promovam a cristalização intracelular e a desidratação incorreta dos espermatozóides no decorrer dessas etapas (AURICH et al., 2020).

Para isso são determinadas curvas de congelamento que podem ser lentas ou rápidas. As curvas de congelamento lentas promovem a desidratação gradativa das células evitando a formação de cristais intracelulares enquanto as curvas de congelamento rápida não completam a desidratação das células possibilitando a formação dos cristais intracelulares e posterior desidratação. A curva de descongelamento deve sempre adotar a mesma determinação utilizada no congelamento (REYKOVÁ et al., 2022).

Diversos autores recomendam a adoção de curvas de resfriamento lentas com redução gradativa de aproximadamente 0,5°C por minuto (VITA et al., 2019; PAPA, 2020). Para evitar possíveis danos aos espermatozóides nesse processo devem ser utilizados produtos como diluidores (ou extensores) e crioprotetores para aumentar a resistência espermática aos efeitos do congelamento (CAMARGO, 2023).

Os diluidores são soluções que devem ser utilizadas próximas à temperatura corporal (37°C) em proporções de 1:1 (Sêmen:Diluidor). Os diluidores devem apresentar características bioquímicas semelhantes ao sêmen animal como osmolaridade de 350 mOsmol/litro de ejaculado e pH entre 6,7 e 6,9. Em geral, os diluidores apresentam ponto de congelamento menor que a água (REYKOVÁ et al., 2022).

A principal função dos diluidores é estabilizar os elementos da membrana espermática e proteger os espermatozóides dos efeitos térmicos indesejáveis. Em equinos são utilizados principalmente diluidores à base de lipoproteínas como gema de ovo e leite desnatado e soluções comercializadas que podem conter também minerais, antibióticos e protetores térmicos como o EDTA, soluções tamponantes e detergentes (OLIVEIRA et al., 2013).

Os diluidores impedem que as moléculas extracelulares de cálcio afetem a osmolaridade da célula espermática e aumentam a solubilidade dos fosfolípidos da membrana promovendo interações moderadas da célula espermática com o meio (REYKOVÁ et al., 2022).

Os crioprotetores são substâncias com a capacidade de alterar a pressão osmótica tanto dos gametas quanto dos diluidores atuando como soluto e como solvente no meio (AURICH et al., 2020). Os crioprotetores penetrantes conseguem atravessar a membrana plasmática atuando tanto no interior da célula quanto no meio extracelular enquanto os crioprotetores não-penetrantes atuam somente no meio extracelular (AL-KASS; MORRELL, 2024).

Em equinos o glicerol é um dos principais crioprotetores utilizado na preservação de sêmen de garanhões, embora esse produto possa causar toxicidade aos

espermatozoides (JOHANNISSON et al., 2023). O glicerol é um crioprotetor solúvel com ponto de congelamento inferior ao da água que afeta a composição lipídica da membrana afetando sua permeabilidade e fluidez. Dessa forma os crioprotetores evitam a desidratação celular, protegem os gametas e auxiliam na redução de danos ocasionados nos processos de congelamento e descongelamento (COTTORRELLLO et al., 2001).

Uma vez que o material genético esteja preparado com crioprotetores e diluidores o mesmo é refrigerado a 5°C com uma taxa de congelamento de 0,05°C/min durante 20 minutos, em seguida o material é levado a uma taxa de congelamento de -20°C/minuto até alcançar -130°C. Ao atingir essa temperatura o material é submerso em nitrogênio líquido até atingir -196°C. Nessa temperatura os gametas podem ser preservados por tempo indeterminado e utilizados estrategicamente para melhorar os índices reprodutivos do plantel (PAPA, 2020).

Influência da criopreservação na qualidade do sêmen equino

A criopreservação é uma biotecnologia utilizada para conservação de material genético de garanhões equinos e essa técnica apresenta pontos positivos e negativos em relação à sua adoção para preservação do sêmen. As principais vantagens dessa biotecnologia estão principalmente relacionadas à economia de recursos utilizados no manejo reprodutivo. Os custos de transporte do botijão de nitrogênio são imensuravelmente menores se comparados aos custos para transportar garanhões ou matrizes que serão cobertas (ALMEIDA, 2006). Além disso, a técnica de inseminação artificial utilizando material criopreservado reduz a incidência de infecções sexualmente transmissíveis uma vez que esse método substitui a reprodução sexuada com monta natural (AURICH, 2020).

A criopreservação também apresenta a vantagem de selecionar o material genético que será preservado possibilitando escolher garanhões com genética superior cujo material genético poderá ser usado estrategicamente no melhoramento do plantel, mesmo em situações de ausência do animal, como cavalos atletas em recuperação, doentes, idosos e até mesmo em casos de perda do animal (OLIVEIRA et al., 2013).

A biotecnologia de criopreservação apresenta a desvantagem de não contar com protocolos de congelamento definidos e estruturados que assegurem o aumento da taxa de prenhez no plantel (OSÓRIO et al., 2008). Isso ocorre pelo fato de muitos gametas não sobreviverem aos processos de congelamento e descongelamento que apresentam efeitos deletérios sobre os gametas. Sendo assim, existem limitações da técnica quanto à qualidade do material submetido à criopreservação após descongelamento resultando em taxas de prenhez inferior à mesma técnica utilizando sêmen fresco ou resfriado (GOMES et al., 2002).

Dessa forma, a integridade e a qualidade do material genético criopreservado sofrem influência direta tanto da qualidade espermática quanto das técnicas utilizadas no resfriamento da amostra. A busca pela qualidade na criopreservação aumenta os custos relativos aos processos de congelamento e preservação (LOVE, 2002).

Em sua conformação os espermatozoides apresentam componentes espermáticos responsáveis pela sobrevivência do gameta no trato reprodutor da fêmea, penetração dele no ovócito e pela fecundação. Esses componentes englobam os processos metabólicos envolvidos na síntese de proteínas que serão utilizadas na produção de plasma seminal e energia utilizada para a motilidade progressiva do espermatozoide (CAMARGO, 2023). A falta de energia ou de volume no sêmen impedem que os espermatozoides sobrevivam no trato reprodutor feminino e alcancem o óvulo (COTTORRELLLO et al., 2001).

As enzimas acrossomais são estruturas localizadas na região anterior do espermatozóide que são responsáveis pela penetração do gameta masculino na membrana do ovócito, caso essas enzimas sejam comprometidas o espermatozoide não consegue penetrar a membrana uma vez que essas enzimas dissolvem a zona pelúcida do ovócito e permitem a fusão entre os núcleos das células gaméticas (AL KASS; MORREL, 2024).

O comprometimento de qualquer uma das estruturas espermáticas impede que ocorra a fecundação. Os processos de congelamento e descongelamento promovem alterações irreversíveis à integridade espermática comprometendo a viabilidade das amostras criopreservadas (GOMES et al., 2002). Os gametas equinos são sensíveis ao choque térmico, podendo nesses processos alterar sua conformação e apresentar movimentação lenta, circular ou retrógrada ocasionada por redução na produção de energia ou rompimento de estruturas celulares como membranas, acrossomas e flagelos (OLIVEIRA et al., 2013).

O congelamento compromete a fluidez da membrana plasmática impossibilitando a movimentação de proteínas, limitando sua permeabilidade e transporte ativo (VITA et al., 2011). O manejo correto de criopreservação considera um congelamento gradativo utilizando uma curva ótima de congelamento que não seja muito lenta causando desidratação celular e nem seja muito rápida causando a cristalização de componentes intracelulares. Ambos os processos causam danos à célula espermática e podem comprometer sua viabilidade (LOVE, 2002; AURICH, 2020).

O processo de descongelamento também se apresenta como um fator limitante da qualidade espermática, sendo indicado que esse processo seja realizado utilizando o mesmo protocolo do congelamento. Diversos protocolos adotados na criopreservação de sêmen equino resultam em taxas de sobrevivência espermática inferiores a 50% após o descongelamento. A taxa de concepção também é comprometida uma vez que os espermatozoides sobreviventes ao processo de descongelamento podem apresentar uma qualidade espermática inferior ocasionada pelos danos celulares ocasionados pela criopreservação (PAPA, 2020).

Nesse contexto, a criopreservação utiliza mecanismos de proteção chamados crioprotetores para reduzir os danos espermáticos do congelamento. Entretanto, a qualidade espermática também é influenciada pelo manejo realizado em todas as etapas da criopreservação. A adoção de boas práticas de higiene e de protocolos estruturados de coleta, preparação, congelamento e descongelamento das amostras é um fator determinante nos resultados obtidos no desempenho reprodutivo dos animais (AURICH, 2020).

Etapas da criopreservação de sêmen equino

O processo de criopreservação de sêmen equino se inicia na coleta, avaliação e seleção do sêmen que será criopreservado. A coleta é realizada utilizando uma vagina artificial com água na temperatura entre 48 a 55°C (LOOMIS, 2006). O material coletado é filtrado para separar a parte gelatinosa e o restante da amostra deve ser submetido ao exame andrológico para avaliar anormalidades morfológicas ou funcionais como o esgotamento das reservas espermáticas (SQUIRES et al., 2013).

As amostras filtradas são avaliadas utilizando um microscópio eletrônico para identificar alterações no aspecto geral, coloração, cheiro, concentração espermática, vigor e motilidade dos espermatozoides (LOVE, 2002). Na seleção para o congelamento é desejável que o ejaculado apresente uma concentração superior a 60 milhões spz/mL de sêmen e uma taxa de motilidade progressiva superior a 50% do total de espermatozoides (CAMARGO, 2023).

A segunda etapa da criopreservação é a centrifugação do sêmen. Para realizar a centrifugação é necessário primeiramente diluir o sêmen para aumentar o volume da amostra. A amostra filtrada do ejaculado é diluída em meio extensor pré-aquecido a 37°C até alcançar uma concentração de 50 x 10⁶ spz/MI (REYKOVA et al., 2022). Os principais diluidores utilizados nesse processo são o EDTA associado à glicose, citrose ou lactato, leite UHT desnatado, entre outros. O sêmen diluído é transferido para tubos de ensaio de 15 a 50 mL e centrifugado por aproximadamente 15 minutos. O objetivo da centrifugação é remover parcialmente o plasma seminal e aumentar a concentração espermática da amostra (ALVARENGA et al., 2005).

Estudos apontam que uma maior concentração de plasma seminal na amostra diluída pode acarretar em redução de motilidade espermática. São recomendadas como boas práticas reduzir a concentração de plasma seminal a valores inferiores a 5% para melhorar a taxa de sobrevivência dos espermatozoides criopreservados (LOVE, 2002; ALMEIDA, 2006). Entretanto, a composição do plasma é influenciada por múltiplos fatores e apresenta grande variação entre os indivíduos. A variação dos componentes afeta as características de qualidade da criopreservação podendo ocasionar um desempenho reprodutivo inferior devido à influência dos componentes no processo de congelamento (OLIVEIRA et al., 2013).

A terceira etapa é a crioproteção, que é fundamental nesse processo, uma vez que utiliza um composto crioprotetor para evitar danos celulares aos gametas aumentando a taxa de sobrevivência e viabilidade do sêmen criopreservado. Os crioprotetores protegem as células e tecidos espermáticos durante o congelamento amenizando os efeitos do choque térmico na qualidade da amostra (VITA et al., 2019).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação de sêmen em diversas espécies animais, porém diversos estudos apontam que esse composto pode causar danos na qualidade do sêmen após descongelamento como a redução da motilidade espermática e desnaturação de proteínas. Esses danos reduzem a taxa de fertilidade das amostras e afetam sua capacidade de congelamento (OLIVEIRA et al., 2013, PAPA, 2020).

Dessa forma, outros crioprotetores são utilizados para contornar os efeitos negativos do glicerol. Podem ser utilizados crioprotetores alcoólicos como o etilenoglicol ou à base de amidas como a dimetilformamida, o metilformamida e o dimetilacetamida. As amidas apresentam resultados superiores em termos de motilidade espermática, possivelmente associado ao menor peso molecular em comparação ao glicerol, que favorece o processo de criopreservação (ALMEIDA, 2006; SQUIRRES et al., 2013).

O estudo de Gomes et al. (2002) sugere que o glicerol utilizado como crioprotetor apresenta desempenho inferior em animais da raça Mangalarga Marchador, possivelmente ocasionadas por características individuais da raça que reduzem o potencial de congelamento do sêmen associado ao glicerol, apresentando resultados superiores ao utilizar crioprotetores à base de aminas.

A etapa seguinte compreende o envase das amostras crioprotetidas. O envase das amostras de sêmen pode ser realizado utilizando *pellets*, ampolas ou tubos. Em equinos são principalmente utilizadas palhetas plásticas de 0,5 mL, principalmente por proporcionar uma curva de congelamento mais uniforme das amostras e armazenar um volume maior de sêmen (ALVARENGA et al., 2005).

A última etapa da criopreservação é o congelamento. A maior parte dos protocolos de congelamento adotados utiliza uma curva de congelamento rápida de -60°C/min. As palhetas são expostas horizontalmente a 3 cm acima do vapor de nitrogênio líquido (LOOMIS, 2006).

Para obter melhores resultados nos protocolos de resfriamento e congelamento das amostras devem ser considerados fatores de influência como o crioprotetor utilizado, quantidade de plasma na amostra, diluidor escolhido, características inerentes do espermatozóide e, principalmente, o protocolo de congelamento adotado (AURICH, 2020). O congelamento também pode ser realizado em máquina computadorizada de congelamento, utilizando diferentes opções de taxas e curvas de congelamento. As curvas adotadas em máquinas de congelamento utilizam duas curvas de congelamento, sendo uma curva de congelamento de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, da temperatura de 20°C até atingir -15°C e outra curva de $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -15°C até atingir -120°C , quando as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido (COTTORELLO et al., 2001)

O descongelamento de amostra deve seguir o mesmo protocolo adotado no congelamento das amostras. O descongelamento das palhetas de 0,5 mL, deve ser realizado gradativamente em banho-maria com temperatura entre 60 e 70°C por 6 a 7 segundos (VITA et al., 2019).

Considerações finais

As biotecnologias reprodutivas são ferramentas fundamentais em programas de melhoramento genético que busquem melhores resultados no desempenho reprodutivo de seus plantéis. As mesmas são ferramentas estratégicas para propagar genes de interesse nos descendentes e melhorar os ganhos econômicos da produção utilizando genética superior.

A qualidade do material genético utilizado em técnicas como a inseminação artificial, a transferência de embriões entre outras é determinante para alcançar melhores resultados reprodutivos utilizando essas técnicas. Devido a isso, é necessário realizar um controle de qualidade em todas as etapas relativas à coleta e preservação dos gametas.

Em equinos a IA é amplamente utilizada para alcançar melhores índices reprodutivos utilizando material genético superior para melhoramento genético. A criopreservação é uma biotecnologia utilizada para o armazenamento de sêmen de garanhões selecionados e utilização estratégica desse material genético em programas de reprodução.

A criopreservação possibilita o transporte e comercialização do material genético selecionado à diferentes regiões, mantém a viabilidade dos gametas selecionados por longos períodos de tempo, possibilitando inclusive prosseguir em programas de melhoramento genético mesmo que ocorra perda do garanhão.

Obviamente ainda são necessários estudos sobre os diversos fatores que podem afetar a criopreservação do sêmen equino e as particularidades relativas às diferentes raças. Uma vez que diversos estudos apontam uma taxa de prenhez inferior utilizando sêmen congelado em comparação ao fresco e a toxicidade do glicerol aos espermatozoides enquanto crioprotetor.

Embora essa biotecnologia reprodutiva apresente diversos desafios na implementação, a criopreservação de sêmen de garanhão é uma ferramenta eficaz no melhoramento reprodutivo e genético dos plantéis equinos.

O período de estágio assim como a elaboração desse portfólio foram etapas fundamentais para minha formação pessoal e profissional. Pude desenvolver e colocar em prática os conhecimentos assimilados durante a graduação e integrar os conhecimentos adquiridos nas disciplinas do curso com as práticas de exercício profissional.

Além de ampliar meus conhecimentos em relação às principais biotecnologias utilizadas na reprodução de equinos também adquiri novos conhecimentos nessa área, o

que me estimulou a buscar cada vez mais novos conhecimentos através da leitura de artigos e contato direto com excelentes profissionais da área durante a vivência do estágio obrigatório.

Os aprendizados adquiridos nas disciplinas ministradas no curso foram de extrema relevância para a minha formação, pois me deram base para aplicar de maneira prática o que havia visto na teoria construindo uma vivência profissional prática da profissão que escolhi para minha vida.

Espero que esse trabalho sirva como base para futuros pesquisadores e profissionais que tenham interesse nessa área tão diversa, enriquecedora e que permanece constantemente em transformação. Que os conhecimentos compartilhados nesse portfólio possam colaborar e enriquecer com o desenvolvimento de novos conhecimentos e estimular futuros profissionais da área.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino**. Dissertação de Mestrado em Ciências agrárias – Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária de Brasília, 77p., 2006.

ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105–113, 2005.

AL KASS, Z.; MORRELL, J.M. Freezing Stallion Semen—What Do We Need to Focus on for the Future? **Vet Science**, v.11, n. 65, 2024.

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

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

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

COTTORIELLO, A.C.P.; HENRY, M.; FERREIRA, M.K.V.; JULIANI, G.C. Efeito da associação do etilenoglicol ao glicerol na criopreservação de sêmen equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.25, p.456-457, 2001.

IBGE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- **Plantel equino brasileiro – 2023**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>. Acesso: 17 out 2024.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Censo Agropecuário Brasileiro 2022**. Disponível em: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/faoweb/Effimia_files/Documents/MEX_RE_P_ENG_2022.pdf. Acesso em: 17 out 2024.

GOMES, G. M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.

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.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. In: CARNEVALE, E.M. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract**, v. 22, p. 663 – 376, 2006.

OLIVEIRA, G.C; OLIVEIRA, B.M.M.; CELEGHINI E.C.C, et al.. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão Cryopreservation of equine semen: a review. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, 2013.

OSÓRIO, J.P. et al. Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão. **Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 15-22, 2008.

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

REŸKOVÁ, Z. et al. Eficiência de diferentes tipos de diluentes para resfriamento de sêmen em garanhões. **Animal Bioscience**, v. 35, n. 5, 2022.

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

VITA, B. et al. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.71, n.3, p.770-776, 2019.

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.