



## Renovação de diluidor na tecnologia de sêmen de pequenos ruminantes

*Extender renewal in the technology of small ruminants semen*

Larissa Pires Barbosa<sup>\*1</sup>, Ana Lúcia Almeida Santana<sup>1</sup>, Rosileia Silva Souza<sup>1</sup>, Caene Borges dos Santos<sup>1</sup>, Lorena Ribeiro Silva Andrade<sup>1</sup>, Jamile dos Santos Nardi Gomes<sup>1</sup>, Diego Silva Macêdo<sup>3</sup>, Israel Freitas Linhares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

\*larissa@ufrb.edu.br

### Resumo

O objetivo desta revisão foi compilar o que se tem na literatura a respeito do efeito da renovação de diluidor seminal, mediante centrifugação, na qualidade do sêmen refrigerado de caprinos e ovinos e no tempo de viabilidade seminal. Um dos primeiros estudos publicados com essa metodologia foi realizado com sêmen de cão, em 2005, por Verstegen et al., seguido por estudos em outras espécies, como a equina e suína. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu alguns estudos com diferentes metodologias para avaliar a eficiência do método, a necessidade do uso da centrifuga refrigerada nesse processo, o uso de antioxidantes no diluidor para renovação e o tempo de renovação do diluidor em pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** Renovação de diluidor seminal, caprinos, ovinos

### Abstract

*The objective of this revision was to compile what exists in literature regarding the effect of seminal diluent renewal, through centrifugation, in the quality of cooled semen of goat and sheep and during seminal viability time. One of the first studies published with this methodology was performed with dog semen in 2005 by Verstegen et al., followed by studies in other species, such as equine and swine. Our research group developed some studies using different methodologies to evaluate method efficiency, the need to use a cooled centrifuge in this process, the use of antioxidants in the diluent for renewal and the diluent renewal time in small ruminants.*

**Key words:** Seminal diluent renewal, goats, sheep

### Introdução

De acordo com os dados disponibilizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), até abril de 2023, há um total de 434 estabelecimentos ativos e registrados no Brasil que trabalham com biotecnologias da reprodução animal. A espécie bovina (336) lidera o *ranking*, seguida da espécie equina/equídeos (73), suína (43), ovina (26), bubalina (25), caprina (23) e outras espécies (11). Desse total de 434 estabelecimentos, 350 trabalham com sêmen convencional das diversas espécies de produção, 100 trabalham com sêmen sexado e 51, com sêmen heterospermico.

Quando focamos apenas nos pequenos ruminantes, dos 49 estabelecimentos envolvidos nessa área, 20 deles trabalham com sêmen convencional na espécie ovina e 17 na espécie caprina; e com sêmen sexado, tem-se apenas cinco estabelecimentos na espécie ovina e sete, na caprina.

O panorama acima mostra a diferença existente entre bovinos, espécie com maior capilaridade, e as espécies de pequenos ruminantes, na área de tecnologia de sêmen. Um dos caminhos para diminuir essas desigualdades, passa pela pesquisa e geração de resultados eficientes.

Dentre as várias técnicas, a renovação de diluidor seminal surgiu com intuito de evitar os danos causados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos aos espermatozoides durante o resfriamento (Love et al., 2012), fornecendo nova fonte de açúcares e lipoproteínas (Busato et al., 2017).

Diante disso, o objetivo desta revisão foi compilar o que se tem na literatura a respeito do efeito da renovação de diluidor seminal, mediante centrifugação, na qualidade do sêmen refrigerado de caprinos e ovinos e no tempo de viabilidade seminal.



## Renovação de diluidor em sêmen refrigerado de pequenos ruminantes

A utilização do sêmen refrigerado de caprinos e ovinos para a inseminação artificial (IA) é uma estratégia utilizada para maximizar o uso de reprodutores em estações de monta, como também, pode ser uma alternativa ao uso do sêmen criopreservado, por este proporcionar menores taxas de gestação (Siqueira *et al.*, 2009).

O resfriamento seminal à 5 °C mostra-se uma alternativa viável para maiores taxas de gestação. Entretanto, a vida útil da célula espermática em sêmen refrigerado é relativamente curta, tornando necessária a adoção de procedimentos com intuito de prolongar essa vida útil, já que a refrigeração é capaz de manter a motilidade espermática progressiva próxima ao preconizado pelo CBRA, por 48 h em caprinos (Sadeghi *et al.*, 2020) e por 24 h em ovinos (O'hara *et al.*, 2010). Após esse período há declínio da motilidade e outros parâmetros seminais (Sadeghi *et al.*, 2020).

Esse fato está relacionado principalmente às alterações bioquímicas do meio diluidor, que ocorrem ao longo do período de refrigeração, afetando negativamente a viabilidade espermática (Sieme *et al.*, 2016). Entre estas alterações, destaca-se o acúmulo de metabólitos tóxicos aos espermatozoides, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam à peroxidação lipídica (Santiani *et al.*, 2014) e consequente declínio da qualidade seminal (Zarei *et al.*, 2021).

Apesar do plasma seminal possuir antioxidantes que preservam as células da ação de ROS, quando os antioxidantes endógenos se tornam insuficientes para atender às demandas celulares, ocorre o estresse oxidativo. Com isso, um dos métodos para prolongar a viabilidade espermática é a adição de antioxidantes ao diluidor com o objetivo de proteger os espermatozoides, por meio da redução da peroxidação lipídica (Zarei *et al.*, 2021).

Outra técnica para prolongar a qualidade de espermatozoides submetidos à refrigeração é a renovação do diluidor, que surgiu para evitar os danos causados pelo acúmulo de metabólitos tóxicos aos espermatozoides durante a refrigeração (Love *et al.*, 2012). Neste método, o meio exaurido de substratos metabolizáveis e com acúmulo de produtos tóxicos é centrifugado e o *pellet* de espermatozoides ressuspenso com novo diluidor, fornecendo nova fonte de açúcares e lipoproteínas (Busato *et al.*, 2017).

Um dos primeiros estudos publicados com essa metodologia foi realizado com sêmen de cão, em 2005, por Verstegen *et al.*, seguido por estudos em outras espécies, como a equina (Love *et al.*, 2012; El-Badry *et al.*, 2013; Kiser *et al.*, 2013; Snoeck *et al.*, 2018) e suína (Bury *et al.*, 2017).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu alguns estudos com diferentes metodologias para avaliar a eficiência do método, a necessidade do uso da centrifuga refrigerada nesse processo, o uso de antioxidantes no diluidor para renovação e o tempo de renovação do diluidor em pequenos ruminantes.

Estudos referentes à renovação de diluidor mencionam a necessidade do uso de centrífuga refrigerada, exigência que inviabiliza o uso dessa técnica à campo, mas em estudo recente foi observado que o uso da centrífuga de bancada, à temperatura ambiente, no processo de renovação de diluidor, não afeta a viabilidade do sêmen renovado na espécie ovina (Santos, 2020), como também, na espécie caprina (Santos, 2023, UFRB, Informação Pessoal).

O primeiro estudo foi realizado por Santos (2020), buscando avaliar a eficiência da técnica com sêmen de ovino. Para isto, avaliou o efeito da renovação diária do diluidor sobre a viabilidade do sêmen resfriado de ovinos, e observou que a renovação preservou a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático, a integridade da membrana plasmática, a atividade mitocondrial, mantém o pH próximo à 7, e não interfere na compactação da cromatina e na integridade acrossomal, por 72 h, em relação ao grupo sem renovação.

Essa mesma autora, buscando viabilizar a técnica à campo, observou também que a variação da temperatura durante a centrifugação não afetou a motilidade espermática, o vigor espermático, o pH, a integridade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial em sêmen de ovinos resfriado à 5 °C por pelo menos 72 h, viabilizando o uso da centrífuga de bancada, à temperatura ambiente, no processo de renovação para a espécie ovina.

Também realizando estudos em ovinos, Busato *et al.* (2017) observaram que a motilidade progressiva e o vigor, 5 dias após a coleta seminal, foram maiores no tratamento submetido à renovação diária do diluidor em comparação ao tratamento que não foi submetido à renovação. Os autores concluíram que ocorreu melhora na motilidade progressiva e no vigor espermático após cada centrifugação e renovação, demonstrando que a renovação representa uma opção viável para prolongar a viabilidade do sêmen resfriado de ovinos, o que foi confirmado por Santos em 2020.

Continuando suas pesquisas, Santos (2023, UFRB, Informação Pessoal) avaliou a técnica de renovação de diluidor do sêmen de caprinos, com o objetivo de validar a técnica e também a necessidade da utilização da centrífuga refrigerada, com renovação diária e por 72 h. A renovação de diluidor em sêmen



resfriado de caprinos foi benéfica para a motilidade espermática progressiva e vigor espermático com 72 horas de resfriamento, tornando-se uma alternativa viável quando se deseja utilizar o sêmen após 48 horas de resfriamento. Foi observado também que a alteração na temperatura durante a centrifugação não interferiu negativamente na qualidade espermática, validando o uso da centrifuga de bancada para renovação de sêmen de bode.

Também foram realizados estudos em caprinos por Zhao *et al.* (2009), os quais realizaram estudo com fertilização *in vitro* utilizando sêmen de bode submetido à renovação de diluente à cada 48 h por 13 dias. Os autores relataram que as taxas de clivagem, indicando fertilização, foram similares às obtidas utilizando sêmen fresco, até o 11º dia de armazenamento à 5 °C.

Santos (2023, UFRB, Informação Pessoal) também avaliou o efeito do uso de trolox, como antioxidante, na viabilidade do sêmen refrigerado de caprinos submetido à renovação de diluidor e concluiu que a renovação associada à adição de trolox foi benéfica para a manutenção do vigor espermático até 72 horas de resfriamento. Porém, a adição de trolox e vitamina C, associadas ou isoladamente, não exerceram influência sobre os demais parâmetros seminais, sendo necessário avaliar além das 72 horas de resfriamento.

Verstegen *et al.* (2005) também buscaram investigar o efeito dessa renovação, mas sobre o tempo de armazenamento de sêmen de cães. Para isto, coletaram sêmen de cinco cães adultos e trabalharam com *pool*. O sêmen foi diluído, armazenado a 4 °C e avaliado diariamente. No dia 11, ao perceberem diminuição na motilidade, realizaram a primeira renovação, a qual promoveu aumento na motilidade até o dia 21, quando foi feita nova renovação, resultando em melhora na motilidade novamente. Depois disso, uma terceira renovação foi feita no dia 27, mas não houve resposta quanto à motilidade. Verstegen *et al.* (2005) ainda mencionaram a possibilidade da gema de ovo possuir papel central na reativação dos espermatozoides após a renovação, devido ao substrato energético e adição de fosfolipídios.

Love *et al.* (2012), por sua vez, estudaram a possibilidade de prolongar a qualidade do sêmen resfriado de equinos por meio da renovação diária de diluidor em sêmen com diferentes proporções de plasma seminal, armazenado de 4 a 7 °C por 96 h e constataram que a motilidade de espermatozoides refrigerados armazenados por 24 horas com 50% do plasma seminal, pode ser mantida se o sêmen for centrifugado e ressuspensionado diariamente com diluente fresco contendo 10% de plasma seminal. Demonstraram também, que este protocolo de renovação preserva a qualidade do sêmen de equinos por até 4 dias.

Já Snoeck *et al.* (2018) obtiveram espermatozoides móveis de equinos, até 5 dias após a coleta de sêmen, através de centrifugação e renovação do diluidor a cada 48 horas. El-Badry *et al.* (2013) verificaram que a centrifugação e renovação não causam efeitos deletérios ao sêmen refrigerado de equinos.

Kiser *et al.* (2013) analisaram sêmen equino e compararam a taxa de gestação, inseminando éguas com sêmen fresco; sêmen resfriado armazenado por 96 h sem renovação; e sêmen resfriado renovado diariamente por 72 h. Ao avaliarem a taxa de gestação, não obtiveram diferença entre os grupos, e reportaram uma taxa de 45% nos grupos inseminados com sêmen não renovado e 58% em grupo inseminado com sêmen renovado.

Em contrapartida, Bury *et al.* (2017) trabalharam com sêmen de suínos, comparando: grupo controle sem renovação; grupos em que centrifugou e fizeram a ressuspensão no próprio sobrenadante, e grupo que centrifugou, descartou o sobrenadante para remover o plasma seminal e ressuspenderam em novo diluente. Os autores avaliaram a motilidade espermática após a centrifugação a cada 24 h até 96h, e concluíram que a centrifugação pode danificar os espermatozoides de varrões, porém esse dano não é perceptível até 72 h, e com isso não afetaria a fertilidade se usado antes desse período.

Atualmente, nossa equipe está avaliando a frequência de renovação do diluidor em ovinos (24, 48 e 72 h) por seis dias, como também, o efeito do uso de outros antioxidantes e aditivos.

### Considerações Finais

Os avanços na tecnologia do sêmen são notáveis. Há um anseio por aumentar o período de viabilidade seminal sem perder a qualidade espermática. Por isso, a renovação de diluidor é uma estratégia promissora, principalmente pela fácil aplicabilidade, por isso, é importante que se cheguem a resultados consolidados. Ao validar o uso da centrifuga de bancada torna a técnica mais acessível, viabilizando a renovação.

### Referências

Bury O, Mcera V, Len J, Plush K, Kirkwood RN. Effects of centrifugation and removal of seminal



- plasma on motility of fresh boar sperm. *Thai J Vet Med*, v.47, p.557-562, 2017.
- Busato EM, Abreu ACMR, Bergstein Galan T, Bertol MAF, Koziicki LE, WEISS RR.** Efeitos da troca diária de diluente sobre a longevidade do sêmen ovino refrigerado. *Rev Bras Rep Anim*, v.41, p.369, 2017.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3ª edição. Belo Horizonte: Brasil, 2013.
- El-Badry DA, Rawash ZM, El-Bakhmy AS.** Effect of centrifugation, resuspension and concentration of re-added seminal plasma on the quality of cooled stored and frozen-thawed Arabian horse sêmen. *J Egypt Vet Med Assoc*, v.73, p.139-153, 2013.
- Kiser AM, Brinsko SP, Love CC, Varner DD, Sudderth K, Blanchard TL.** Relationship of Sperm Quality to Fertility after 4 Days of Cooled Storage of Equine Semen. *J Eq Vet Sci*, v.34, p.602-605, 2013.
- Love CC, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Voge J, Bliss S, Sudderth K, Teague S, Lacaze K.** Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriog*, v.77, p.1911-1917, 2012.
- MAPA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/mma/index.htm>. Acesso em: 14 maio 2023.
- O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans AC, Lonergan P.** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriog*, v.73, p.541-549, 2010.
- Sadeghi S, Gallego RD, García-Colomer B, Gómez EA, Yániz JL, Gosálvez J, López-Fernández C, Silvestre MA.** Effect of sperm concentration and storage temperature on goat spermatozoa during liquid storage. *Biol*, v.9, p.300, 2020.
- Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N, Risopatrón J, Villegas J, Sánchez R.** Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriog*, v.82, p.884-889, 2014.
- Santos CB.** Renovação de diluente em diferentes temperaturas no sêmen resfriado de ovinos (Monografia). Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil, 2020.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Rep Sci*, v.169, p.2-5, 2016.
- Siqueira AP, Silva Filho JM, Fonseca JF, Bruschi JH, Palhaares MS, Borges AM, Bruschi MCM, Peixoto MP, Rossi R.** Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.66-71, 2009.
- snoeck PPN, pessoa THO, abreu GCO, Barros CHSC, Aguiar CS, Leite Filho AO.** Efeito da renovação dos diluidores Kenney e BotuSêmen® sobre a longevidade espermática durante o resfriamento: estudos in vitro. *Rev Bras Med Eq*, v.77, p.26-30, 2018.
- Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouad M.** Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriog*, v.64, p.720-733, 2005.
- Zarei F, Daghigh Kia H, Masoudi R, Moghaddam G, Ebrahimi M.** Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. *Cryob*, v.98, p.215-218, 2021.
- Zhao BT, Han D, Xu CL, Luo MJ, Chang ZL, Tan JH.** Protocol optimization for long-term liquid storage of goat semen in achemically defined extender. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.865-872, 2009.
-