

## Critérios e metodologias para produzir sêmen de caprinos e ovinos em nível de fazenda

*The criteria and methodologies used to produce ram and goat semen on the farm*

Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>1</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>1</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>1</sup> e Eduardo de Oliveira Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil

### Resumo

A criopreservação de sêmen é uma importante estratégia para o armazenamento de material genético de reprodutores ovinos e caprinos, considerados superiores do ponto de vista fenotípico, mas especialmente, pelos seus méritos genéticos. Hoje no Brasil apenas uma central regulamentada pelo MAPA está em atividade, o que significa que existe pouca dose de sêmen comercial à disposição para programas de melhoramento genético. Programas de banco de sêmen podem ser realizado nas fazendas, entretanto, tem seu uso limitado a propriedade onde está o reprodutor. Neste caso, apesar de maiores limitações de estrutura e equipamentos para a execução do serviço, o domínio das variações da técnica de congelamento de sêmen e o cuidado com as questões sanitárias dos reprodutores possibilitará ao Médico-Veterinário a execução do serviço com níveis adequados de segurança e qualidade das doses de sêmen produzidas. O objetivo deste estudo é apresentar e discutir critérios e metodologias para congelamento de sêmen de pequenos ruminantes em diferentes condições, fruto de diversas experiências e trabalhos desenvolvidos por nosso grupo e outros, nos últimos vinte anos, e que tem possibilitado resultados satisfatórios.

**Palavras -chave:** Criopreservação espermática, ovinos, caprinos, banco de sêmen

### Abstract

*Sperm cryopreservation is an important strategy for the storage of genetic material from ovine and goat breeders, considered superior from the phenotypic point of view, but especially for their genetic merits. Today in Brazil only one center regulated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply is in operation, which means that there is little dose of commercial semen available for genetic improvement programs. Semen bank programs can be carried out on farms; however, their use is limited to the property where the breeder is located. In this case, despite greater limitations of structure and equipment for the execution of the service, mastering variations in the semen freezing technique and taking care of the health issues of the breeders will enable the Veterinarian to perform the service with adequate levels of safety and quality of semen doses produced. This study aims to present and discuss criteria and methodologies for freezing semen from small ruminants under different conditions, the result of several experiences and works carried out by our group and others, in the last twenty years, which have enabled satisfactory results.*

**Keywords:** Sperm cryopreservation, rams, goats, semen bank

### Introdução

Os dados mais recentes do IBGE (IBGE, 2021) mostram que o rebanho ovino no Brasil é de aproximadamente 20,5 milhões de cabeças e para os caprinos este número é de 11,9 milhões de animais. O Nordeste concentra 95,2% dos caprinos e 69,9% dos ovinos, tendo o estado da Bahia com os maiores rebanhos, respectivamente, 28,2% e 20,7%.

Fonte de proteína animal muito apreciada em diversos países no mundo, o consumo da carne ovina, quase que cultural no Brasil, especialmente nas regiões Sul e Nordeste. Apesar deste fato, o abate de ovinos no Brasil e estabelecimentos com serviço de inspeção Federal vem reduzindo nos últimos anos drasticamente, saindo de 266 mil cabeças abatidas em 2009 (ano de pico no número de abates) e em 2022 este número foi de 44,0 mil cabeças abatidas, em diferentes categorias (MAPA, 2022).

Em um universo em que consome-se 100% do que é produzido no Brasil, com consumo per capita ainda muito baixo se comparado com outras fontes de proteína animal (0,6Kg/pessoa/ano), que ainda demanda importações de carne ovina de outros países como o Uruguai, para abastecer mercado interno,

\*Correspondência: rfbvet1@gmail.com

Recebido: 10 de maio de 2023

Aceito: 20 de maio de 2023

salta-se aos olhos em frente a tanto potencial de crescimento, a desorganização e desestruturação em curso da cadeia produtiva de ovinos e caprinos, predominantemente composta por pequenos e médios produtores em sistemas de subsistência e de baixa eficiência, além da falta de subsídios e políticas de governo estruturantes que permitam o desenvolvimento da agroindústria e fortalecimento das cadeias produtivas (Sena et al., 2021).

Neste cenário de baixos índices de produtividade, tornam-se necessários avanços, com ajustes básicos de manejos, melhorias na nutrição, sanidade e reprodução. E neste último aspecto, a eficiência reprodutiva aliada à utilização do material genético superior proveniente de reprodutores melhoradores é uma estratégia que, assim como aconteceu com outras espécies, pode acelerar o melhoramento genético e ganho produtivo (Sena et al., 2021).

A partir de 2006 com a publicação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da IN 53/2006 que atualizou os termos preconizados pela Portaria 25 e 26 de 1996 que regulamentou o registro e fiscalização de Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), únicos locais autorizados a receber doadores de sêmen, para produção e distribuição de sêmen para todo o Brasil e exportação, os processos de registros dos CPPS foram se elevando, chegando a 31 CCPS registrados e autorizados a produzir sêmen, com maior número de CCPS registrados por ano em 2008 (4) e maior número de reprodutores registrados como doadores em 2009, segundo o sistema SIPEORAFLEX do MAPA. Estas 31 centrais, até 2019, registraram no MAPA, 526 reprodutores como doadores de sêmen, que produziram 618 mil doses de sêmen aptas à comercialização. Entretanto, a partir daí observa-se que, em resposta a desestruturação do mercado de genética dos caprinos e ovinos no Brasil, a partir de 2012 uma desaceleração das atividades das Centrais, havendo cancelamento de boa parte dos CCPS até 2019 (16) e a partir da necessidade de recadastramento no novo sistema do MAPA (SIPEAGRO) em 2019, apenas quatro CCPS o fizeram, mantendo credenciamento (Ceará, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte). E ao consultar o SIPEAGRO, verifica-se que apenas um CPPS no Brasil, localizado no estado do Ceará (CPPS CE-7122 - Michel Nogueira de Medeiros ME), manteve suas atividades a partir de 2016, registrando 13 animais entre 2021 e 2022 (MAPA, 2023). Ou seja, apesar da grande demanda do mercado consumidor e necessidade de melhoria nos índices produtivos, não há no mercado sêmen à disposição para programas em massa de melhoramento genético no Brasil, refletindo de forma enfática a completa desestruturação da cadeia produtiva dos caprinos e ovinos no Brasil. Ao mesmo tempo, sabemos que há trabalhos pontuais de melhoramento genético em rebanhos controlados, de entes públicos e privados, e o comércio com trânsito irregular do sêmen produzido em uma fazenda, para outra. O que, sem os cuidados sanitários e testagens, potencialmente promove a disseminação de enfermidades que comprometem os índices produtivos e algumas, por serem zoonoses, impactam negativamente sobre os aspectos da saúde única.

Assim, este trabalho ao tempo que chama a atenção para os fatos supracitados, por reconhecer a importância da conservação da genética de reprodutores com elevado padrão genético, comprovado em testes de progênie ou mesmo desempenho na fazenda, objetiva trazer informações a respeito dos critérios e metodologias para realização do banco de sêmen em nível das fazendas, que proporcione doses com boa fertilidade pós-descongelamento, reiterando que este material deve ser utilizado exclusivamente na propriedade de origem do reprodutor.

## Manejo dos animais

### *Sanidade dos reprodutores*

É importante que os reprodutores, assim como todo o rebanho sejam submetidos aos programas profiláticos de imunização, contra enfermidades de importância para a espécie e de acordo com a dados epidemiológicos da região, além de esquema de vermifugação atualizado. Como alguns reprodutores antes do programa de coleta de sêmen acabam viajando para exposições ou mesmo tem a propriedade compartilhada (muito comum), é altamente recomendado que além da avaliação clínica geral do reprodutor sejam feitas as sorologias para Artrite/Encefalite Caprina para os caprinos, pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), Maedi-visna e *Brucella ovis* para ovinos, ambas por IDGA e *Brucella abortus* para ambas as espécies pelo teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Estas são as sorologias recomendadas pelo IN 01/2014 do MAPA (MAPA, 2014), previamente ao início do banco de sêmen. E a recomendação dos status sanitário da região e do rebanho, abrir possibilidades para testagens para *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii*.

Estas análises sorológicas ganham importância ao observarmos estudos no Brasil como o realizado por Dorneles et al. (2020), verificou-se alguma frequência de anticorpos anti-Maedi Visna (3,08%) e

elevada soroprevalência de *Brucella ovis* (24,04%), *Leptospira spp.* (25,96%) e *Toxoplasma gondii* (10,46%), enquanto a soroprevalência nos rebanhos foi de 80,95%, 90,48%, 71,43% e 23,81%, respectivamente.

### Alimentação

O balanço energético afeta o normal funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, cuja subnutrição promove a redução da frequência de secreção de GnRH/LH, da libido e da qualitativa de sêmen. E, para que a suplementação ou correção nutricional tenha efeito sobre a produção espermática nos reprodutores, ela deve ser iniciada oito semanas antes da estação de monta (Blache et al., 2008). Durante as coletas, os reprodutores devem ser mantidos com fornecimento de água e sal mineral espécie-específico *ad libitum*, com pastagens de qualidade e adequadas para a espécie, ou no caso de regimes intensivos, sob fornecimento de feno com níveis de proteína de aproximadamente 18%.

É indicado que machos sob uso intensivo recebam suplementação energética. Neste caso, em que a suplementação com concentrado é empregada, esta deve ser limitada a 1% do peso vivo do animal ou no máximo 1,5% do peso vivo, caso haja a correção dos níveis de Ca e P que deve ser no mínimo 2:1, para prevenir a ocorrência da urolitíase, enfermidade de elevada letalidade. Para obter a relação de Ca/P adequada, sempre que os animais sejam alimentados com grãos ou seus subprodutos, deve ser agregado aos mesmos 1,5% de carbonato de cálcio (calcáreo calcitrício ou farinha de ostra). Devemos lembrar que os grãos devem ser suplementados com NaCl na quantidade de 0,25-0,5%. Como é comum em animais de exposição o fornecimento de mais de 1,5% de peso vivo de concentrado, é altamente recomendado, também, a utilização de cloreto de amônia a 1% na ração, que impede a formação do cálculo por diminuir o pH urinário e evitar a precipitação dos fosfatos (Riet-Correa et al., 2008).

Reprodutores em regime de coleta intensa, podem ser suplementados com nutracêuticos compostos por mix de microelementos e macroelementos, que proporcionem melhorias nas condições de espermatogênese refletidas na qualidade espermática, especialmente após a descongelamento na décima semana de uso do nutracêutico *Reproductive Garahões JCR*<sup>®</sup> (Vetnil, Brasil) (Porfirio et al., 2020). Em nossa experiência, enquanto gerente de produção de uma CCPS, adotava-se que todos os reprodutores ao entrarem no alojamento dos residentes em regime intenso de coletas diárias (dados não publicados), recebiam em ciclos de 15 dias o nutracêutico Promater<sup>®</sup> (Vetnil, Brasil), além do manejo nutricional e hídrico supracitado. Desta forma, possibilitava-se longevidade do regime de coletas diárias dos reprodutores, mantendo a qualidade e rendimento satisfatório de doses produzidas.

Animais de alto rendimento reprodutivo podem ter variações do rendimento em doses produzidas, menos pelo fotoperíodo e mais por mudanças nas características bromatológicas dos alimentos fornecidos. Isto ficou sugerido em estudo do nosso grupo (Menezes et al., 2017), que quando da avaliação de 1057 ejaculados coletados no estado da Bahia, de reprodutores ovinos das raças Santa Inês, Dorper e White Dorper ficou demonstrado que nesta região o fator fotoperíodo estacional não exerceu efeito sobre as características espermáticas, ao contrário, as amostras coletadas nas estações primavera/verão apresentaram melhores resultados em qualidade e rendimento de doses produzidas, provavelmente pela melhor qualidade da fonte de matéria seca fornecida, oriunda de feno produzido no período das águas.

### Saúde Geral e Reprodutiva

Todo reprodutor para entrar em regime de coleta como doador de sêmen deve estar hígido, com todos os sistemas em pleno funcionamento, além de terem ausência de alterações congênicas que poderão ser herdadas pelas futuras gerações. Cálculo da EMBRAPA cita que potencialmente um doador de sêmen, caso seja utilizado intensivamente em programas de inseminação artificial para melhoramento genético pode produzir até 12 mil produtos (Fonseca e Santos, 2023), o que demonstra a grande relevância do cuidado especial que deve ser dada à seleção dos reprodutores da cabana. Então, antes mesmo da avaliação específica do sistema genital, o exame criterioso da dentição para descartar portadores de prognatismo/retrognatismo deve ser realizado, assim como a verificação da existência de problemas diversos dos apurmos e certificação do adequado padrão da raça desejada.

Ao exame específico do sistema genital, deve-se verificar: ausência de tetos suplementares na base do testículo, bolsa testicular proporcional, com testículos soltos, simétricos e textura macia, boa libido, com apresentação do reflexo de Fleming quando em contato com as fêmeas, habilidade em executar uma monta completa e, em caprinos, evitar animais mochos (Brito e Sousa, 2021).

Dentre todas as avaliações do sistema genital masculino, o exame e biometria testicular devem ser

realizados criteriosamente, pela existência de correlações positivas entre tamanho do perímetro escrotal (PE) com a fertilidade, produção animal, com características produtivas e reprodutivas das gerações futuras, sejam eles machos ou fêmeas. Baseado em estudo com 415 machos ovinos da raça Santa Inês, de diferentes idades, nós sugerimos em 2003 uma tabela para PE de acordo com as 10 categorias de idade, utilizadas nas exposições (Bittencourt et al., 2003). Este estudo demonstrou correlações altamente positivas e significativas com o peso corporal, mesmo em fases pré-púberes, o que significa que mesmo em animais jovens, esta característica já apresenta relevância.

Resultados de levantamento feito com mais de 900 ejaculados (não publicados) demonstraram elevada correlação positiva do PE com a concentração espermática ( $r=0,81$ ,  $P<0,01$ ) e turbilhonamento ( $r=0,79$ ,  $P<0,01$ ), além de correlações positiva com motilidade espermática pós-descongelamento ( $r=0,18$ ,  $P<0,05$ ) e negativa com defeitos espermáticos ( $r=-0,99$ ,  $P<0,05$ ), reforçando a importância da sua mensuração pela correlação com produção espermática e também pela possibilidade de evitar na reprodução animais com hipoplasia testicular subclínica.

Medidas complementares de biometria testicular (altura, largura e espessura) devem ser feitas, pois possibilitam estimar o volume testicular e consequentemente a estimativa da capacidade de produção espermática (Penitente-Filho et al., 2018). É interessante também realizar a mensuração da cauda do epidídimo deve ser obtida, pois apresenta correlação positiva com capacidade de armazenamento espermático do reprodutor.

### *Comportamento Sexual*

No Brasil, o regime de monta natural é o predominante em ovinos e caprinos. Por este motivo é importante que os reprodutores de cabana ou mesmo os futuros doadores de sêmen, que serão submetidos a regimes intensos de coletas, devem apresentar elevada capacidade de serviço e libido, promovendo alto rendimento na produção de doses de sêmen. Sendo assim, é fundamental a avaliação conjunta das características seminais, da biometria testicular e do comportamento sexual (Pacheco e Quirino, 2010).

O comportamento sexual pode ser avaliado pelo teste de libido ou pelo teste de capacidade de serviço. A libido pode ser conceituada como a avidez do macho para montar e efetuar a cópula, sendo de fundamental importância para prever a real capacidade reprodutiva do animal (Chenoweth, 1981). A capacidade de serviço é o número de serviços realizados em uma situação favorável para a monta em um período específico (Blockey e Wilkins, 1984).

Existem diferentes testes de capacidade de serviço (Ibarra et al., 1999). Entretanto, temos sugerido o teste de capacidade de serviço (TCS) preconizado pelo consultor Souza et al. (2010), baseado na pontuação preconizada por Chenoweth (1984) para touros, porém adaptada com alguma modificação para carneiros. Neste teste os carneiros a serem testados são colocados individualmente em um pequeno piquete ou área confinada com 2 ou 3 ovelhas em estro (natural ou hormonalmente induzido) por um período de 20 minutos. Durante o teste, procura-se avaliar a libido (nível de interesse sexual, incluindo montas e serviços), o tempo de reação (intervalo de tempo entre a cognição masculina de um estímulo apropriado e o primeiro serviço), a capacidade de servir (número de serviços por teste) e a capacidade de cobertura (relação do número de montas sobre número de cópulas). Assim, para a classificação final da capacidade de serviço e considerando um teste de 20 minutos, uma pontuação igual ou inferior a 7 é considerada questionável, 8 - baixa, 9 - média, e 10 - alta, onde a nota zero representa ausência de interesse sexual e a nota máxima significa a realização de quatro ou mais montas com serviço completo. Carneiros que tenham obtido resultados questionáveis devem ser reavaliados sob condições diferentes ou em dias diferentes para assegurar que bons reprodutores não sejam descartados equivocadamente. É importante que os carneiros recebam estímulo prévio de 10 minutos e os machos mais velhos sejam mantidos durante o teste, afastados dos mais novos para eliminar fator dominância.

Uma outra possibilidade de avaliação do comportamento sexual é a observação durante a coleta de sêmen com vagina artificial. Souza et al. (2007) avaliaram o comportamento sexual (libido) de carneiros durante a coleta de sêmen com vagina artificial, utilizando-se fêmea contida e em cio. Os machos são classificados em escala de 1 a 5, em que 1 indica salto entre quatro e cinco minutos, e 5 representa a ocorrência do salto antes de um minuto.

### *Colheita de sêmen e avaliação pré-congelamento*

Previamente ao início do banco de sêmen, caso os animais estejam sem atividade reprodutiva, estes devem ter suas reservas epididimárias e extragonadais “esgotadas”, através de regimes de coletas

repetidas duas ou três vezes por dia durante dois a três dias e na sequência reavaliados. Para garantir boa qualidade pós-descongelamento é importante que o ejaculado a ser criopreservado tenha ao menos 70% de células móveis (Bittencourt et al., 2018) e de integridade de membrana plasmática, avaliada pela técnica supravital com eosina (SV) e baixo percentual de células com patologias, em especial os defeitos maiores (Henry e Neves, 2013). Temos adotado o SV para a avaliação da integridade estrutural da célula pré-congelamento e pós-descongelamento, em nível campo pelo baixo custo e praticidade, e pela sua elevada correlação positiva com análises de integridade estrutural por fluorescência, da membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (Lima et al., 2010), avaliações de maior acurácia e por limitação de equipamentos no campo, não são empregados.

De uma forma geral, o reprodutor para entrar no regime de coleta deve apresentar parâmetros espermáticos compatíveis ao recomendado pelo CBRA (Henry e Neves, 2013), ou até superiores, pois verifica-se que após a criopreservação há importante redução do percentual de células com potencial de fertilidade. Através de dados pessoais, obtidos de 1196 ejaculados de ovinos das raças Santa Inês e Dorper, obteve-se médias superiores aos parâmetros espermáticos preconizados pelo CBRA, e cujos resultados de motilidade total foram superiores ( $P < 0,005$ ) para os reprodutores da raça Dorper, em relação aos da raça Santa Inês (86,7 x 83,5%).

Imediatamente após a coleta do sêmen, este deve ser avaliado para o processamento. Caso a temperatura do ambiente esteja muito fria, a amostra recém-colhida deve ser mantida em um banho maria aquecido a 35 °C e o volume, coloração e aspectos devem ser avaliados. Algo que temos recomendado quando o reprodutor já está em coleta e se conhece os parâmetros espermáticos médios é que, após a retirada das alíquotas de sêmen para as avaliações de rotina, em especial, morfologia e concentração, realize-se diluição prévia de uma parte de sêmen para uma parte ou duas de meio diluidor, promovendo proteção/nutrição celular antecipada e pré-estabilização das células no meio enriquecido, enquanto as avaliações e cálculos para dose inseminante são realizados.

Existem meios diluidores comerciais de diferentes empresas, empregados para criopreservação do sêmen de ruminantes de uma forma geral, com adequados resultados para pequenos ruminantes. Temos experiências de campo positivas com o Botubov (Butupharma, Botucatu - Brasil), Andromed (Minitub do Brasil, Rio Grande do Sul - Brasil), OptixCell (IMV, São Paulo - Brasil). Pela disponibilidade de ambiente propício para confecção dos meios diluidores temos utilizado o meio que produzimos (Bittencourt et al., 2008). Este diluidor é fruto de uma série de estudos e pesquisas (Bittencourt et al., 2013) e tem proporcionado resultados de fertilidade interessantes, que podem variar de acordo com as condições obtidas na inseminação artificial em tempo fixo, com 57,8% (Fucks et al, 2017), 50,3% (Reis et al, 2017), 72,2% (Neri et al, 2017), 31,5% (Bittencourt et al., 2018), 36,6% (Menezes et al., 2020).

Após o cálculo da concentração espermática e cálculo das doses inseminantes preconizadas pelo CBRA (Henry e Neves, 2013), com mínimo de 40 milhões de células móveis pós-descongelamento por palheta, deve ser feita a diluição final da amostra. Nota-se que taxas de diluição abaixo de 1:2 apresentam resultados insatisfatórios de viabilidade pós-descongelamento.

### *Curva de refrigeração*

Taxas rápidas de refrigeração do espermatozoide da temperatura ambiente até 5°C induzem a ocorrência de danos parcialmente irreversíveis, caracterizados por padrão anormal de motilidade (circular ou retrógrado), rápida queda do percentual de motilidade, danos acrossomais, lesão da membrana plasmática, metabolismo reduzido e perda de componentes intracelulares (Squires et al., 1999).

Com isso, diversos experimentos demonstraram a importância da curva de refrigeração para a prevenção da ocorrência de lesões espermáticas ocorridas no processo de criopreservação. Wurgau e Leidl (1989), trabalhando com diversas espécies (bovinos, caprinos, ovinos, suínos e equinos), observaram a influência da velocidade de refrigeração do sêmen até a temperatura de 4°C sobre a viabilidade espermática após a congelamento. Esses autores concluíram que a curva mais lenta promoveu melhores índices de motilidade pós-descongelamento, quando comparada com a refrigeração mais acelerado. Enquanto Deka e Rao (1987), comparando três curvas de refrigeração para o sêmen caprino, verificaram que quanto mais lenta a curva de refrigeração, menor era a incidência de lesões acrossomais após a descongelamento.

### **Refrigeração em sistema Convencional**

Pela facilidade nas propriedades rurais, um refrigerador convencional pode ser utilizado em condições de campo para a curva positiva de refrigeração, quando outra condição não pode ser



disponibilizada e o banco de sêmen precisa ser realizado. É extremamente importante que o refrigerador a ser utilizado, seja disponibilizado apenas para esta função, permitindo adequada higienização e evitando-se aberturas da porta, e que apresente adequado funcionamento do termostato, com reduzida variação da temperatura interna.

Neste sentido, com o objetivo de avaliar a velocidade da curva de refrigeração sobre a congelabilidade de espermatozoides caprinos, comparamos (Bittencourt et al., 2007) uma curva de refrigeração lenta ( $-0,46^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) com uma curva de refrigeração rápido ( $-1,07^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), realizada em um refrigerador convencional. A curva de refrigeração rápida pode ser obtida colocando-se as palhetas horizontalmente sobre plataformas com 3-6 cm de altura, metálicas ou de isopor, dentro de um refrigerador de 260L, com temperatura interna estabilizada em  $5^{\circ}\text{C}$ . Para a curva de refrigeração lento do sêmen, as amostras foram resfriadas a uma taxa média de  $0,46^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingirem a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ . A redução da velocidade da curva de refrigeração foi obtida, colocando as palhetas em recipiente contendo água ou álcool, com a devida separação entre as palhetas e o líquido. Este estudo verificou que ambas as curvas de refrigeração foram eficientes e as temos utilizadas na rotina, com bons resultados, a depender da disponibilidade. Nota-se, eventualmente, que alguns reprodutores demandam curvas de refrigeração mais lentas, neste caso, adota-se curvas reduzidas. Nestes casos, uma outra técnica para desacelerar a curva de refrigeração do sêmen que também pode ser usada é a colocação das palhetas com sêmen entre bolsas plásticas contendo água aquecida a  $+32^{\circ}\text{C}$ . Desta maneira a curva de refrigeração reduz de  $-1,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para  $-0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (LIMA et al., 2010).

### Refrigeração em sistemas próprios

Comercialmente são vendidos refrigeradores próprios para a curva positiva de refrigeração do sêmen ( $5^{\circ}\text{C}$ ), muito empregado no Brasil para sêmen equino, por proporcionarem elevada estabilidade da temperatura interna, o que é essencial para o processo. Em nossos testes com controle de temperatura dentro da palheta (não publicados), estes refrigeradores, por utilizarem motores de alta potência proporcionam curvas ultrarrápidas, que chegam a  $5,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , o que para ruminantes é muito, ocasionando alterações importantes pelo choque térmico. Assim, ao utilizar este equipamento para a refrigeração de sêmen de ruminantes, esta curva deve ser desacelerada, utilizando estratégias como a mencionada acima.

### Refrigeração em sistema automatizado

Existem no mercado brasileiro, diferentes sistemas automatizados que realizam a curva de refrigeração e congelamento de sêmen. A diferença destes sistemas, em relação aos sistemas manuais de congelamento é que proporcionam curvas lineares de refrigeração, elevada estabilidade, o que potencialmente possibilita melhores resultados pós-descongelamento.

Trabalho anterior com caprinos (DEKA e RAO, 1987) já demonstrava que não há diferença entre as médias de motilidade espermática para o sêmen descongelado, após taxas de refrigeração que variam entre  $1,00$  a  $0,21^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , indicando assim, que estas são faixas seguras para curvas positivas de refrigeração (até  $5^{\circ}\text{C}$ ). E já na era dos sistemas automatizados de congelamento de sêmen, Azevedo et al. (2005) ao compararam a utilização de dois protocolos de refrigeração do sêmen de carneiros não verificaram a influência da velocidade da curva de refrigeração ( $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  versus  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) até a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ , sobre a viabilidade do sêmen ovino descongelado, sendo estas as duas curvas de refrigeração majoritariamente empregadas na rotina, quando se empregam sistemas automatizado para pequenos ruminantes.

### Refrigeração em sistemas móveis

Assim como os sistemas automatizados, existem diferentes modelos e marcas de caixa de transporte do sêmen. Estas caixas de transporte, por proporcionarem curvas lentas, inferiores a  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , podem ser estratégias interessantes para serem empregadas como sistema móvel de refrigeração do sêmen em propriedades que não tenham luz, ou que o Médico-Veterinário precise transportar até o laboratório para processamento final e congelamento. Com objetivo de testar diferentes sistemas de refrigeração (refrigerador convencional x sistema automatizado x sistema móvel), Gomes Bergstein-Galan et al. (2016) verificaram que os três métodos de refrigeração foram, de forma semelhante ( $P>0,05$ ), eficientes em manter os parâmetros *in vitro* de qualidade espermática, inclusive com resultados similares ao sêmen *in natura*,

após 24 horas de refrigeração e manutenção a 5°C. O que ratifica que todas as possibilidades apresentadas são factíveis em nível de fazenda e podem ser empregadas a depender das condições encontradas.

### *Tempo de equilíbrio*

O tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com o glicerol e todos os demais componentes do diluidor, previamente à congelação. Durante esse período ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e o extracelular formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no meio diluidor (Salamon e Maxwell, 2000). Segundo Oettlé (1986) um apropriado período de equilíbrio, assim como, adequadas taxas de diluição e refrigeração celular, são fatores fundamentais para a prevenção do surgimento de alterações espermáticas durante o processo criopreservação espermática.

Em virtude da importância desta etapa e dos dados discordantes na época, realizamos estudo para identificar tempos de equilíbrio adequados pré-congelação (Bittencourt et al., 2006), que possibilitassem melhores índices pós-descongelação. Foram testados tempos de equilíbrio a 5°C de 1h, 2h, 3h e 4h e através dos parâmetros espermáticos estudados, o tempo de equilíbrio de 2h foi o que obteve os melhores índices de viabilidade espermática após o processo de congelação-descongelação, quando comparado com os demais grupos avaliados. Este estudo verificou que os tempos de equilíbrio superiores (3 e 4h) proporcionou maiores ( $P>0,05$ ) índices de defeitos maiores quando comparado ao sêmen submetido à tempos de equilíbrio inferiores (1h e 2h). Estes achados nos fazem concluir que o sêmen caprino, possivelmente, demanda de um tempo de equilíbrio que varia de 1 a 2h, e tempos superiores a estes são desnecessários e podem influenciar negativamente a viabilidade espermática pós-descongelação. Desde então, temos adotado este tempo de equilíbrio para congelação do sêmen de pequenos ruminantes como padrão, com resultados satisfatórios de fertilidade para caprinos e ovinos (taxas de fertilidade apresentados no item 3.2).

Em estudo posterior (Bittencourt et al., 2007), objetivando verificar relação entre curva de refrigeração e tempo de equilíbrio, observou-se que potencialmente uma curva mais rápida de refrigeração (1°C/min) demanda de um maior tempo de equilíbrio ( $P=0,06$ ), comparado às curvas mais lentas de refrigeração (0,46°C/min). Este potencial efeito tem nos levado a adotar tempos de equilíbrio maiores quando empregadas curvas de refrigeração mais rápidas.

### *Curva de congelação (negativa)*

Quando o sêmen é resfriado sob temperaturas abaixo de 0°C, ocorre a formação de gelo no meio extracelular, com aumento na concentração de sais, o que provoca a saída da água do meio intracelular para o extracelular, a favor do gradiente osmótico, levando o espermatozoide a uma desidratação progressiva e lesão celular (Amann e Pickett, 1987). Também é importante enfatizar que a curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta, para permitir que os espermatozoides se desidratem e, rápida o bastante para evitar que os espermatozoides fiquem expostos, por muito tempo, as altas concentrações de soluto (Snoeck, 2003).

### *Curva de congelação manual*

A velocidade de congelação dos espermatozoides com esta técnica, será regulada pela distância a que são colocadas as palhetas do nível do nitrogênio líquido e pelo tamanho da palheta: fina (0,25mL) ou média (0,5mL). Na forma mais comum, as palhetas contendo o sêmen são colocadas horizontalmente no vapor do nitrogênio líquido, a 4 ou 5cm de altura da lâmina do nitrogênio líquido e posteriormente as palhetas são derrubadas no nitrogênio líquido (Leboeuf et al., 2000).

Apesar de cada vez mais acessíveis pela redução dos valores, nem sempre há a disposição do Médico-Veterinário uma máquina de congelação de sêmen na fazenda, nem por isso, deixará de ser realizado o banco de sêmen de doador que se julga importante geneticamente. No sistema manual de curva negativa para congelação de sêmen, as palhetas são colocadas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido a 5cm de altura da lâmina líquida, por 10 a 20min, dentro de um recipiente térmico, usualmente uma caixa de poliestireno expandido (EPS) com 40cm de comprimento por 32cm de altura e 20cm de largura, contendo 4cm de nitrogênio em seu interior. Após os 20min em vapor, as palhetas então mergulhadas no nitrogênio líquido e colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico até o momento da descongelação (Bittencourt et al., 2018; Bittencourt et al., 2006; Bittencourt et al., 2007, 2008; Menezes et al., 2014)

### *Curva de congelação automatizada*

A maioria das lesões nos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação, ocorrem entre -10°C e -25°C, faixa de temperatura em que ocorre a cristalização do gelo. Byrne et al. (2000) compararam uma curva de congelação mais rápida (5°C/min) com uma lenta (-0.5°C/min), durante a faixa crítica de temperatura (0°C até 25°C). Os autores verificaram que a curva rápida possibilitou melhores taxas de fertilidade *in vivo* e *in vitro*, demonstrando a importância do controle da curva de congelação nesta faixa de temperatura.

Quanto ao método mais eficiente para curva de congelação, automatizada ou caixa com vapor de nitrogênio, estudo de Anel et al. (2003) controlou as curvas de temperatura de 0 a -100°C, verificando que ambos os protocolos proporcionam curva de congelação entre 20°C/min e 30°C/min. Entretanto, a congelação em vapor de nitrogênio proporcionou uma maior variação de temperatura durante o fenômeno do calor latente de fusão, que para este sistema ocorre aos 12 segundos, dentro da faixa crítica, quando as células atingem temperatura próxima dos 15°C e reaquece até próximo dos 0°C, para depois voltar a decrescer de forma linear até os -100°C. Já no sistema automatizado, o reaquecimento durante o calor latente de fusão é mais brando, o que em combinação com outros fatores pode promover melhores índices de viabilidade celular pós-descongelação. Entretanto, estudos com ovinos (Rodello, 2006), bovinos (Forero-Gonzalez et al., 2012), equinos (Vita et al., 2019) não obtiveram diferença entre a técnica convencional de congelação (vapor de nitrogênio) e o sistema automatizado, o que significa que a curva de congelação obtida com o sistema convencional, desde que controlados outros fatores, possibilita resultados satisfatórios pós-descongelação.

### **Considerações Finais**

O banco de sêmen a ser realizado em nível das fazendas, em cumprimento as leis vigentes, deve ser empregado apenas para uso na propriedade. E nestes casos, a qualidade fenotípica do animal aliada ao mérito genética devem justificar a escolha do doador de sêmen. Para assegurar que as doses de sêmen produzidas não sejam disseminadoras de doenças, é imprescindível o adequado controle sanitário e sorologias prévias à realização do banco de sêmen. E, apesar das limitações estruturais e até de equipamentos quando o serviço é realizado em nível de fazenda, o domínio de todas as etapas do processo, com o conhecimento das diferentes possibilidades e estratégias, permite que, mesmo nessas condições, produza-se doses de sêmen com adequado controle microbiológico e parâmetros espermáticos qualitativos que gerem bons índices de fertilidade na inseminação artificial.

### **Referências**

- Amann RP, Pickett, BW.** Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Veterinary Science, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- Anel L, De Paz P, Álvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E.** Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. Theriogenology, v.60, n.7, p.1293-1308, 2003.
- Bittencourt RF, Oba E, de Almeida Biscarde CE, Azevedo HC, Bittencourt MV, de Menezes GFO, da Silva Lima A, da Mata Fuchs K, de Lisboa Ribeiro Filho A.** Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. Cryobiology, v.85, p.1-6, 2018.
- Bittencourt RF, Oba E, Lisboa Ribeiro Filho A DE, Chalhoub M, Costa Azevedo H, Dimas Bicudo S.** Advances in cryopreservation of ram semen I: extenders and cryoprotectants. Ciência Animal Brasileira, v.14, p.522-536, 2013.
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho ADL, Lima MCC, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LDS, Oba E.** Effects of a calcium chelator, a detergent and the soybean lecithin on the quality of the frozen-thawed goat semen. Braz J Vet Res Anim Sci, 45(4):305, 2008.
- Bittencourt Rf, Ribeiro Filho A De L, Alves; Sidney Gonzales Gonçalves, Biscarde Ce, Vasconcelos Mf, Oba E.** The effect of equilibration time on the quality of cryopreserved goat semen. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. v.17, n.2, p.75-82, 2007
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho A de L, Gonçalves Gonzalez Alves S, Biscarde CE, Freitas Vasconcelos M, Oba E.** Cryopreservation of goat semen: the effect of cooling rate and equilibration time. Ciência Animal. 2007.
- Bittencourt RF; Ribeiro Filho AL, Almeida AK; Lima MCC, Alves SGG, Portela APM, Guerra RD,**



- Tinoco AAC.** Evaluation of rams of the Santa Inês breed based on the Circumference scrotal. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.197-199, 2003.
- Blockey MAB, Wilkins JF.** Field application of the ram service capacity test. In: Lindsay DR, Pearce DT (Ed.). *Reproduction in sheep*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984. p.53-58.
- Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP.** Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*. v.62, n. 4, p.265-275, 2000.
- Chenoweth PJ.** Examination of bulls for libido and breeding ability. *Vet. Clin. North Am.: Anim. Pract.*, v.5, p.59-74, 1984.
- Chenoweth PJ.** Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review. *Theriogenology*. v.16, n.2, p.155-177, 1981.
- Claro dos Reis LPZ, Bittencourt RF, Carvalho JVGS, Carôso BSS, Vasconcelos IC, Alves AS, Antônio de Ribeiro Filho AL, Santos ES, Felix MD.** Conception rate in sheep submitted to FTAI with different time intervals between the artificial insemination and the progesterone source removal time and the eCG administration. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.487, jan./mar. 2017.
- Deka BC, Rao AR.** Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. *Indian Journal of Animal Reproduction*, v.8, n.1, p.25-27, 1987.
- Dorneles EMS, Guimarães A de S, Gouveia AMG, Coura FM, Carmo FB Do, Pauletti RB, Azevedo V, Lilienbaum W, Vitor RW de A, Pinheiro RR, Ferreira ACR, Dasso MG, Lage AP, Heinemann MB.** Seroprevalence of brucella ovis-epididymitis, smooth-brucella, leptospirosis, toxoplasmosis, and maedi-visna in sheep slaughtered in minas gerais State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.57, n.2, p.1-12, 2020.
- Fonseca JF, Santos DO.** 10 passos essenciais para a Inseminação Artificial em caprinos e ovinos. 2011.
- Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Bressan FF, Arruda RP.** Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, v.44, p.154-159, 2012.
- Fuchs KM, Ribeiro Filho AL, Bittencourt RF, Silva MAA, Santos ES, Brandão TO, Santana LR, Neri FS, Fernandes MP, Xavier GM, Lima AS.** Has the time spent on artificial insemination by laparoscopy in sheep influenced the pregnancy rate?. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.480, jan./mar. 2017.
- Gomes Bergstein-Galan T, Romualdo Weiss R, F Bertol MA, Claudia R Abreu AM, Wesolovsky A.** Comparação De Três Métodos De Refrigeração Do Sêmen Ovino Pelo Período De 24 E 48 Horas. *Archives of Veterinary Science*, v.21, n.4, 2016.
- Ibarra D, Laborde D, Olivera J, Van Lier e, Burgueño J.** Comparación de tres pruebas para medir la capacidad de servicio en carneros adultos. *Arch Med Vet*. v.31, n.2, p.189-196, 1999.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.** Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros). 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em 04 de maio de 2023
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.** Rebanho de Caprinos (Bodes e Cabras). 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em 04 de maio de 2023
- Lima LF de, Moura P, Passos PIB, Leal DR, Rumpf R, Neves JP.** Influence of cooling systems on the quality of ovine semen cryopreserved in straws. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.4, p.835-844, 2010.
- Lima AS, Bittencourt RF, Lima MCC, Silva MAA, Menezes GFOO, Xavier GM, Neri FS, Fuchs KM.** Correlation of in vitro sperm viability and in vivo fertility in sheep submitted to artificial insemination with cryopreserved semen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.463, jan./mar. 2017.
- Menezes ADL, Bittencourt RF, Araujo EAB, Loiola MVG, Santos ESS, Brito, LS, Barreto RO, Ribeiro-Filho AL.** Effect of the period of the year of the seminal profile of ovine breeding animals reared in tropical climate. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.480, jan./mar. 2017.
- Menezes GFO de, Bittencourt RF, de Lima Cardoso F, Lents MP, dos Santos ES, Barreto RO, de Jesus EO, Valverde MM, Filho ADLR.** Dimethylacetamide alone or in combination with glycerol can be used for cryopreservation of ovine semen. *Anim Reprod*. v.17, 2021.
- Menezes GFO de, Bittencourt RF, Ribeiro Filho A de L, Chalhoub M, Bittencourt MF, Oba E, Bicudo SD.** Utilization of the osmotic shock to assess the frozen ram semen viability. *Braz J Vet Res Anim Sci*. v.50, n.5, p.396-405, 2013.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA.** Instrução Normativa 1/2014 Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/mma/index.htm>. Acesso em 06 de maio de 2023 (1).
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA.** Instrução Normativa 1/2014. Disponível

em:

<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&cave=1372028774#:~:text=O%20MAPA%2C%20a%20qualquer%20momento,na%20data%20de%20sua%20publica%C3%A7%C3%A3o.> Acesso em 02 de maio de 2023 (2).

**Neri FS, Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Silva MAA, Xavier GM, Lima AS, Fernandes MP, Fuchs KM.** Evaluation of fertility in laparoscopic artificial insemination by unilateral and bilateral deposition of ovine sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.459, jan./mar. 2017.

**Oetlé EE.** Changes in acrossome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science*, v.12, p.145-150, 1986.

**Pacheco A, Quirino CR.** Comportamento sexual em ovinos Sexual. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.34, n.2, p.87-97, 2010.

**Penitente-Filho JM, Silva FF e, Facioni Guimarães S, Waddington B, da Costa EP, Gomez León V, Siqueira JB, Silva Okano D, Piccolo Maitan P, Guimarães JD.** Relationship of testicular biometry with semen variables in breeding soundness evaluation of Nellore bulls. *Anim Reprod Sci*. v.196, p.168-175, 2018.

**Porfírio K, Marafon A, Teixeira L, Braga C, Oliveira M, Furtado L, Costa S, Cardoso J, Paula N.** Influência De Nutracêutico Comercial Sobre Os Parâmetros Espermáticos De Sêmen Fresco E Descongelado Em Ovinos. *Revista da Academia de Ciências do Piauí*, v.1, n.1, 2020.

**Riet-Correa F, Simões S V.D., Vasconcelos JS.** Urolitíase em caprinos e ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, p.319-322, 2008.

**Rodello L.** Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. [Tese Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. *Botucatu*: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

**Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

**Sena LS, Da L, Borges S, Rocha AO, Castro GC, Sarmiento JL.** Avanços no melhoramento genético de ovinos da raça Santa Inês. v.23, n.1, p.37-45, 2021.

**Snoeck PPN.** Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

**Souza T.** Testes de capacidade de serviço em reprodutores ovinos. 25 maio 2010. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/testes-de-capacidade-de-servico-em-reprodutores-ovinos-63026n.aspx?acao=a4c60680-3299-4419-adf9-bb44a71c94da>. Acesso em 08 março 2023.

**Souza JAT, Campelo JEG, Leal TM, Sousa Júnior A, Medeiros RM, Macedo RC.** Biometria testicular, características seminais, libido e concentrações de testosterona em ovino da raça Santa Inês, na Microrregião de Campo Maior, PI. *Ciênc Vet Trop*, v.10, p.21-28, 2007. Disponível em :[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-veterinaria-nos-tropicos/10-\(2007\)-1/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/ciencia-veterinaria-nos-tropicos/10-(2007)-1/). Acesso em 08 março 2023.

**Squires EL, Pickett BW, Vanderwall DK, Mc Cue PM, Bruemmer J.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. n.9).

**Vita B, Monteiro GA, Melo CM, Maziero RR, Carmo MT, Alvarenga MA, Dutra PA, Sancler-Silva YFR, Papa FO.** Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. *Arq Bras Med Vet Zootec*. v.71, p.770-776, 2019.

**Wurgau T, Leidl W.** The significance of tertiary anomalies for the evaluation of sperm morphology. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, v.76, n.2, p.48-50, 1989.