

# Conservação de sêmen em pequenos ruminantes

João Pedro Barbas, Maria da Conceição Baptista, Sandra Cavaco-Gonçalves, Jorge Andrade Pimenta, Carla Cruz Marques, António Horta e Rosa Lino Neto Pereira . INIAV, I.P.



**A conservação de sêmen e a inseminação artificial (IA) em pequenos ruminantes são biotecnologias reprodutivas em franca expansão em Portugal. A qualidade dos ejaculados é avaliada ao longo do ano, sendo a sua conservação conseguida com sucesso. Têm sido desenvolvidas diversas metodologias para melhorar a conservação do sêmen (por refrigeração ou criopreservação), assim como a sua capacidade fertilizante.**

## Requisitos e treino dos machos

Para a obtenção de ejaculados de qualidade, deverão ser recrutados animais de elevado mérito genético e estatuto sanitário. O treino dos machos destinados à recolha de sêmen deverá ter início próximo da puberdade. Para facilitar o treino dos machos é necessário uma fêmea em estro natural ou induzido (Barbas e Mascarenhas, 2009). Os reprodutores deverão manifestar vigor sexual e boa aptidão para o salto na presença do operador.

## Recolha e avaliação do sêmen

Os ejaculados são recolhidos pelo método da vagina artificial (Figura 1). Recomenda-se fazer 1-2 dias de descanso entre recolhas no mesmo animal, pois uma frequência excessiva prejudica a qualidade do sêmen. No laboratório procede-se à avaliação macroscópica e microscópica dos ejaculados. Macroscopicamente são avaliados o volume (mL), a cor (branco, branco leitosa), a viscosidade e o cheiro (Evans e Maxwell, 1990). Relativamente às avaliações microscópicas, determinam-se a mobilidade massal (0-5), a mobilidade individual (0-100%), a concentração espermática, o número de espermatozoides (spz) totais, a vitalidade espermática (% de spz vivos) e a % de spz normais. Na tabela 1 estão representados os parâmetros espermáticos médios para ovinos e caprinos. Foram detetadas variações individuais e sazonais no sêmen fresco para o volume, percentagem de spz vivos, normais e percentagem de anomalias em bodes e em carneiros de raças autóctones (Barbas e Mascarenhas, 2009).

## Conservação por refrigeração: Sêmen Refrigeração (SR)

A refrigeração (4-15 °C nos caprinos e 10-15 °C nos ovinos) permite a conservação do sêmen durante 6 a 8 horas, sem diminuição significativa da sua capacidade fertilizante. Alguns diluidores permitem a manutenção da motilidade em valores razoáveis durante 48 h, a 4 °C, embora se verifique uma diminuição de 10-15% na capacidade fertilizante (Leboeuf *et al.*, 2003).



Figura 1 – Recolha de sêmen com vagina artificial

Os diluidores para refrigeração de sêmen de pequenos ruminantes podem ser totalmente sintéticos ou orgânicos, sendo mais usuais os diluidores à base de leite de vaca desnatado e/ou gema de ovo, ou mistos. Os diluidores de criopreservação têm, habitualmente, componentes tais como frutose, glucose, ácido cítrico, Tris e antibióticos (Anel *et al.*, 2006).

A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) é uma consequência do metabolismo oxidativo espermático e os seus efeitos negativos traduzem-se por um decréscimo da qualidade do sêmen durante o processo de refrigeração, com redução da motilidade, vitalidade e capacidade fertilizante e aumento das morfoanomalias espermáticas, implicando diminuição da fertilidade *in vivo* (Barbas e Mascarenhas, 2009). Assim, a adição aos diluidores de refrigeração de substâncias antioxidantes que diminuem a formação de ROS, melhoram a motilidade e a fertilidade do sêmen refrigerado ao fim de 72 horas (Leboeuf *et al.*, 2003).



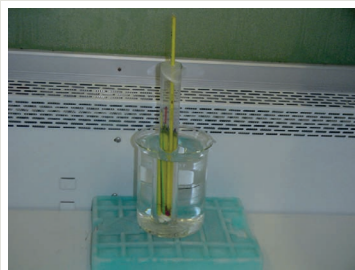
TABELA 1 – VALORES MÉDIOS DOS PARÂMETROS SEMINAIS EM EJACULADOS DE PEQUENOS RUMINANTES

Parâmetros Seminais	Carneiro	Bode
Volume (mL)	1-1,5	0,5-1,5
Concentração spz (x 10 <sup>9</sup> )/mL	2,0-6,0	1,5-6,0
Total spz/Ejaculado (x 10 <sup>9</sup> )	2,0-9,0	0,75-7,5
% de spz por Ejaculado (por volume)	30	25
% de spz Móveis	60-90	60-80
% de spz Normais	80-95	80-95

spz: espermatozoides

## Conservação por criopreservação: Sêmen Congelado (SC)

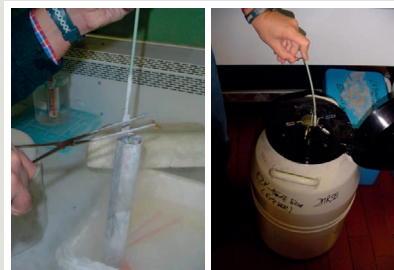
O SC tem múltiplas utilizações, designadamente para a conservação das raças autóctones no Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA), em programas de melhoramento genético e em investigação e desenvolvimento experimental (avaliação e melhoria da capacidade fertilizante) (Cavaco-Gonçalves *et al.*, 2017). A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia reprodutiva essencial nos programas de melhoramento genético das raças autóctones



**Figura 2A** – Refrigeração de sêmen a uma temperatura de 4 °C durante 3,5 horas



**Figura 2B** – Floating Freezing Rack – Criopreservação de sêmen



**Figura 2C** – Armazenamento de palhinhas de sêmen (0,25 mL) em contentores com azoto líquido

de pequenos ruminantes, a maioria das quais em perigo de extinção e com índices reprodutivos e produtivos que têm de ser melhorados para aumentar a rentabilidade das explorações. A criopreservação de sêmen é uma metodologia complexa, que requer pessoal e equipamento especializado, devendo-se utilizar apenas os ejaculados com mobilidade individual e viabilidade  $\geq 50\%$ . Existem múltiplos fatores que influenciam este processo, designadamente a espécie animal, raça, época do ano, fatores individuais, qualidade dos ejaculados, composição dos diluidores e os protocolos de criopreservação.

O número de spz totais e o número de doses produzidas por ejaculado são determinados pela concentração espermática e pelo respetivo volume. A concentração espermática utilizada por dose de sêmen varia com a espécie animal, o método conservação de sêmen e com o objetivo pretendido, nomeadamente conservação do património genético (BPGA), fertilização *in vitro* ou *in vivo* (Barbas e Mascarenhas, 2009). Atualmente, existe uma multiplicidade de diluidores de criopreservação comerciais com diferentes formulações (Barbas e Mascarenhas, 2009). Os diluidores de criopreservação utilizados no nosso laboratório têm como componentes principais o tris ou citrato de sódio (para controlo do pH e osmolaridade), a glucose e ou frutose (como fontes de energia), gema de ovo (para proteção da integridade da membrana plasmática), o glicerol (crioprotetor penetrante) e antibióticos (inibição do desenvolvimento microbiano).

Os diluidores e os protocolos utilizados na criopreservação de sêmen de ovinos e caprinos são diferentes, nomeadamente na percentagem de gema de ovo no diluidor, bem como na remoção do plasma seminal caprino por centrifugação (lavagem) do sêmen, antes da adição do diluidor de criopreservação. De facto, o plasma seminal de caprino interfere na capacidade dos espermatozoides em suportar a congelação ao interagir com os diluidores ricos em fosfolípidos (gema de ovo e leite de vaca desnatado) (Barbas e Mascarenhas, 2009). A qualidade e capacidade fertilizante do SC é significativamente inferior comparativamente ao sêmen fresco e ou refrigerado (Barbas e Mascarenhas, 2009). A membrana plasmática

dos spz tem uma proporção elevada de ácidos gordos insaturados/saturados que, associada à sua diminuta capacidade antioxidante, condicionam a aptidão à congelação do sêmen de pequenos ruminantes. Assim, a criopreservação do sêmen provoca danos irreversíveis na estrutura do spz. Para minorar estes efeitos traumáticos, são implementadas estratégias que aumentam a crio-resistência dos spz, nomeadamente a redução da formação de cristais de gelo e a diminuição das lesões das membranas plasmáticas e organelos intracelulares (Barbas e Mascarenhas, 2009). Existe também uma variação sazonal na congelabilidade do sêmen, mais evidente nas raças Serra da Estrela e Merino do que na raça Saloia.

Para a criopreservação as palhinhas de sêmen (0,25 mL) são submetidas a uma descida gradual da temperatura, cerca de 0,2 °C/minuto até aos 4 °C (Figura 2A), seguidas de um tempo de refrigeração de 3,5 horas, período que é designado por tempo de equilíbrio do sêmen com o diluidor, e depois colocadas horizontalmente numa “floating freezing rack”, 4 cm acima do nível de azoto líquido a uma temperatura média de -115 a -120 °C (Figura 2B) durante 20 minutos. Seguidamente, são submergidas em azoto líquido (-196 °C) e posteriormente armazenadas em contentores (Figura 2C) com azoto líquido (Barbas e Mascarenhas, 2009). O SC assim armazenado (isto, é submerso em azoto líquido) tem uma capacidade de conservação ilimitada sem diminuição do seu poder fecundante, podendo ser utilizado em qualquer época e/ou em qualquer local para a inseminação artificial (IA) ou a fertilização *in vitro* (FIV) (Barbas e Mascarenhas, 2009).

### Inseminação Artificial com SR e SC

A IA em rebanhos comerciais é realizada geralmente a tempo fixo, conforme os protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação utilizados, tanto com SR como com SC. Como referido, a fertilidade após a IA é influenciada pelo método de conservação do sêmen (SR vs. SC), pelo número de spz por dose de IA, pela espécie animal, pela raça, pela época do ano e pelo protocolo de sincronização do estro e indução da ovulação (Evans e Maxwell, 1990). Em trabalhos realizados pela nossa equi-

pa, foram inseminadas por via cervical 116 ovelhas, sendo a fertilidade obtida com SR (48,51-66,7%) significativamente superior à obtida com SC (13,4-32,5%). Em caprinos de raças autóctones, foi de 51,3-75,7% com SR, comparativamente a 46,4-65,5% com SC (Mascarenhas *et al.*, 2011; Barbas *et al.*, 2013).

A investigação de novas metodologias de criopreservação do sêmen é primordial para incrementar a qualidade e resistência à congelação/descongelação dos spz e a sua capacidade fertilizante de forma a aumentar o número de crias nascidas pós-IA e o rendimento dos produtores. A refinação dos protocolos de sincronização do estro na espécie ovina, de modo a permitir “flanquear” o cervix ovino, é também essencial no melhoramento da fertilidade utilizando a IA. 🐐

### Agradecimentos

Suportado pelo projeto ALT20-03-0246-FEDER-000021 AltBiotech RepGen Recursos genéticos animais: projeção para o futuro. (Alentejo2020, Portugal2020 e UE).

### Bibliografia

- Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Anel, E. e Paz, P. (2006). Improvement strategies in ovine AI. *Reprod Dom Anim*, 41 (Suppl. 2), 30-42.
- Barbas, J.; Horta, A.; Marques, C.; Baptista, M.; Mascarenhas, R.; Martins, D.; Vasques, M.; Pereira, R. e Cavaco-Gonçalves, S. (2013). The fertility increase after misoprostol administration is differently expressed when sheep are inseminated with chilled or frozen-thawed semen. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 398-401.
- Barbas, J. e Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domes anim sperm cells. *Cell Tissue Banking* 10, 1: 49-62.
- Cavaco-Gonçalves, S.; Baptista, M. e Barbas, J. (2017). Controlo da Reprodução como Instrumento de Rentabilidade das Explorações de Pequenos Ruminantes. *Vida Rural*, 1829, 30-32.
- Evans, G. e Maxwell, W. (1990). *Inseminación artificial de ovelhas e cabras*. Editorial Acibria, S.A., pp 192.
- Leboeuf, B.; Guillouet, P.; Battellier, F.; Bernellas, D.; Bonne, J.; Forgerit, Y.; Renaud, G. e Magistrini, M. (2003). Effect of native phosphocaseinate on the *in vitro* preservation of fresh semen. *Therio*, 60, 867-877.
- Mascarenhas, R.; Baptista, M.; Cavaco-Gonçalves, S. e Barbas, J. (2011). Caracterização da actividade reprodutiva e utilização da IA em pequenos ruminantes. *Agrorural*, Ed. INRB e IN, 1071-1082.