

Biotechnologias avançadas em pequenos ruminantes

Advanced biotechnologies in small ruminants

Lúcia Cristina Pereira Arruda^{1*}, Aline Saraiva de Oliveira², Gustavo de Oliveira Alves Pinto³,
Gustavo Ferrer Carneiro³

¹Médica Veterinária – Autônoma; ²Centro Universitário Maurício de Nassau – UNINASSAU, Maceió-AL, Brasil

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE -Recife-PE, Brasil

*E-mail: luciacpa@hotmail.com

Resumo

A caprinocultura e a ovinocultura apresentam relevante importância socioeconômica, impulsionando o uso de biotecnologias reprodutivas voltadas ao melhoramento genético dos rebanhos. Esta revisão aborda avanços recentes na criopreservação de sêmen, com ênfase no desenvolvimento de novos diluentes e aditivos antioxidantes, no processamento de sêmen dentro da fazenda e no uso de tecnologias portáteis de análise seminal. Dessa forma, a integração de novos protocolos de preservação do sêmen com métodos de avaliação mais precisos contribui para otimização da eficiência reprodutiva de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: caprino, ovino, sistema CASA, criobiologia, sêmen

Abstract

Goat and sheep production hold significant socioeconomic importance, driving the adoption of reproductive biotechnologies for genetic improvement. This review addresses recent advances in semen cryopreservation, with an emphasis on the development of new extenders and antioxidant additives, in-farm semen processing, and the use of portable technologies for semen analysis. Therefore, the integration of new semen preservation protocols with more precise evaluation methods contributes to optimizing the reproductive efficiency of small ruminants.

Keywords: goat, sheep, CASA system, cryobiology, semen

Introdução

O avanço das biotécnicas reprodutivas em pequenos ruminantes tem sido impulsionado pela necessidade de maximizar o potencial genético de reprodutores de alto valor zootécnico. Embora a criopreservação de sêmen associada à inseminação artificial (IA) seja a estratégia mais amplamente difundida, o sêmen de caprinos e ovinos apresenta desafios específicos relacionados à criotolerância, que podem comprometer a viabilidade e a funcionalidade espermática (Lv et al., 2019). Vale ressaltar que a espécie ovina apresenta desafios adicionais, como a maior sensibilidade espermática ao estresse oxidativo e a anatomia cervical complexa, que limita a eficiência da IA convencional quando comparada aos caprinos (Langerová et al., 2026).

Nesse contexto, investigações no campo da criobiologia, focadas em novos métodos de congelamento, no uso de crioprotetores alternativos e aditivos antioxidantes aos diluentes, têm demonstrado perspectivas promissoras para mitigar os danos celulares e elevar os índices de fertilidade (Sharafi et al., 2022). Paralelamente às inovações no processamento, os protocolos de avaliação também têm apresentado evoluções significativas.

Historicamente, a análise espermática restringia-se à microscopia subjetiva realizada em centros laboratoriais especializados. No entanto, a dinâmica atual do setor exige que a produção de doses também ocorra de maneira descentralizada, diretamente nas propriedades onde os animais estão alojados (Bittencourt et al., 2023), demandando tecnologias portáteis e precisas que garantam a qualidade do material sem a necessidade de infraestruturas complexas.

Considerando os desafios na manutenção da viabilidade espermática e na precisão da análise de sêmen a campo, a presente revisão objetiva abordar as recentes inovações na criopreservação e os avanços das ferramentas de análise seminal de pequenos ruminantes em condições de campo.

Avanços na criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen em pequenos ruminantes evoluiu significativamente, impulsionada pela necessidade de superar a sensibilidade dos espermatozoides de caprinos e ovinos ao congelamento (Lv et al., 2019). Devido à composição lipídica de suas membranas, essas células são particularmente vulneráveis ao estresse térmico, choque osmótico e formação de cristais de gelo (Lv et al., 2019; Peris-Frau et al., 2020). Nesse contexto, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de mitigar os danos ocasionados pelo processo de criopreservação, com destaque para os crioprotetores, a adição de antioxidantes e a otimização de protocolos de congelamento/descongelamento.

Inovações nos diluentes e crioprotetores e a mitigação do estresse oxidativo

A sensibilidade das membranas espermáticas e o estresse oxidativo representam alguns dos principais desafios para a criopreservação de sêmen em pequenos ruminantes (Holt, 2000). Em caprinos, devido a presença da enzima fosfolipase A2 no plasma seminal, a sensibilidade é aumentada, uma vez que pode ocorrer a reação desse composto com os lipídios da gema de ovo, presente nos diluidores comerciais, resultando em subprodutos tóxicos que comprometem a viabilidade celular (Pellicer-Rubio e Combarrous, 1998).

Para minimizar esses danos, a substituição de componentes de origem animal por substâncias de origem vegetal vem sendo investigada. A utilização da lecitina de soja em concentrações de 0,04% a 0,16%, demonstrou resultados promissores no sêmen caprino descongelado, eliminando potenciais riscos sanitários e aumentando a viabilidade espermática (Vidal et al., 2013).

No âmbito da crioproteção, embora o glicerol permaneça como o crioprotetor permeável padrão, sua toxicidade tem levado à exploração de combinações com agentes não penetrantes, como a trealose e a sacarose (Quan et al., 2012). Esses açúcares atuam na estabilização da bicamada lipídica e favorecem a vitrificação do meio extracelular, preservando a funcionalidade das mitocôndrias e a integridade acrossomal durante os ciclos de resfriamento (Isachenko et al., 2008; Ahmad et al., 2015).

Complementarmente à proteção física, a mitigação do estresse oxidativo tornou-se um pilar central, visto que o congelamento induz a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocasionam peroxidação lipídica nas membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados de espermatozoides de ovinos e caprinos (Maia et al., 2010).

Para combater esse desequilíbrio, a suplementação de diluentes com aditivos antioxidantes tem sido amplamente investigada. A utilização de compostos enzimáticos, como a superóxido dismutase e a catalase vem demonstrando resultados satisfatórios (Shafiei et al., 2015), assim como os antioxidantes não enzimáticos, incluindo as vitaminas E e C (Dewry et al., 2015; Lukusa, 2019), aminoácidos como L-glutamina e L-prolina (Sangeeta et al., 2015), extratos vegetais como o de *Moringa oleifera* (Gangwar et al., 2024) e hormônios como a melatonina (Cardenas-Padilla et al., 2024).

Somado aos avanços na composição dos diluentes, a aplicação da nanotecnologia tem se mostrado uma importante ferramenta que pode auxiliar na andrologia de pequenos ruminantes, assim como o uso de polifenóis (Arruda et al., 2021; Arruda et al., 2022). A nanotecnologia auxilia na liberação controlada de antioxidantes o que pode potencializar a proteção celular, oferecendo uma barreira mais eficiente contra crioinjúrias em comparação aos métodos convencionais, permitindo que menores concentrações alcancem efeitos protetores superiores, minimizando possíveis toxicidades associadas a dosagens excessivas (Oliveira et al., 2025).

Essa abordagem multifatorial, combinando antioxidantes potentes e sistemas de entrega modernos (liberação gradual de substâncias), representa um caminho atual para elevar os índices de fertilidade na inseminação artificial de ovinos e caprinos.

Novas Fronteiras: Vitrificação e Liofilização

A vitrificação e a liofilização surgem como alternativas promissoras ao congelamento convencional do sêmen de pequenos ruminantes, que demanda equilíbrio térmico lento e armazenamento em nitrogênio líquido (Lv et al., 2019). A vitrificação baseia-se na solidificação da amostra em um estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo intracelulares, utilizando elevadas concentrações de crioprotetores e taxas de resfriamento ultrarrápidas através do contato direto com nitrogênio líquido (Carvalho et al., 2011). Por outro lado, a liofilização, ou secagem por sublimação, envolve a remoção da água da amostra sob vácuo após o congelamento primário, permitindo que os espermatozoides sejam armazenados em estado seco a temperaturas positivas ou em condições de refrigeração convencional (Lv

et al., 2019).

As vantagens dessas técnicas residem, primordialmente, na biossegurança e na redução de custos operacionais a longo prazo. A vitrificação, por dispensar o uso de congeladores programáveis de alto custo, torna o processo mais ágil no campo (Matias et al., 2019). No caso da liofilização, o maior benefício é a eliminação da necessidade de nitrogênio líquido para o transporte e armazenamento, o que facilita a troca de material genético entre regiões remotas (Rajska, 2021).

Comparativamente ao método convencional, a liofilização preserva a integridade do DNA de forma satisfatória, embora cause danos severos à motilidade e às membranas plasmáticas, tornando o uso de tecnologias de reprodução assistida, como a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), praticamente obrigatório para obtenção da fertilização (Wakayama e Yanagimachi, 1998).

Apesar do potencial, os gargalos para a implementação rotineira dessas tecnologias ainda são significativos. Na vitrificação, a alta concentração dos crioprotetores necessários para evitar a formação de cristais de gelo pode resultar em efeitos citotóxicos, comprometendo a viabilidade celular pós-descongelamento e exigindo protocolos rigorosos de diluição (Jiménez-Rabadán et al., 2015). No caso da liofilização, o principal desafio é a perda total da motilidade espermática, o que inviabiliza o uso em IA convencional ou mesmo em fertilização *in vitro* (FIV) padrão, onde a movimentação flagelar é essencial (Wakayama e Yanagimachi, 1998). Além disso, a padronização de diluidores que protejam as estruturas celulares durante a liofilização ainda é objeto de estudos, com o uso de açúcares como trealose sendo testados para estabilizar as membranas (Shahmoradi et al., 2022).

Em suma, a transição do congelamento convencional para métodos como a vitrificação e a liofilização representa um salto qualitativo na conservação de recursos genéticos de ovinos e caprinos. No entanto, o sucesso dessas inovações depende da superação das barreiras relacionadas à toxicidade química e aos danos estruturais permanentes ao flagelo e as membranas plasmática e acrossomal, além de desorganização das mitocôndrias. O futuro da preservação de sêmen de pequenos ruminantes parece caminhar para uma integração onde a liofilização servirá como um "banco de genes" para ICSI, enquanto o aperfeiçoamento da vitrificação poderá, eventualmente, oferecer uma alternativa viável e de baixo custo para a IA de campo.

Sistemas Portáteis de Avaliação de Sêmen – Avanços da Análise a Campo

A avaliação da qualidade seminal em pequenos ruminantes tem passado por uma transformação tecnológica significativa, impulsionada pela necessidade de descentralizar as análises e levar precisão ao campo (Hassanine et al., 2026). Tradicionalmente, o exame andrológico a campo dependia da microscopia óptica convencional e da avaliação visual subjetiva, técnica que apresenta variações de até 60% entre avaliadores (Matos et al., 2008). Os sistemas de Análise Seminal Computadorizada (CASA) eram restritos a laboratórios devido ao elevado custo e porte dos equipamentos. Contudo, a emergência de sistemas CASA portáteis, como o iSperm® e o AndroScope®, permite a realização de avaliações objetivas diretamente nas fazendas, eliminando a latência entre a coleta e o resultado (Dini et al., 2019; Brito, 2025; Hackerova et al., 2025).

Tecnologias baseadas em tablets e smartphones, como o iSperm®, revolucionaram a avaliação andrológica. Estudos mostram que o iSperm® e AndroScope® apresentam alta correlação com sistemas CASA laboratoriais, considerados o padrão-ouro, para concentração e motilidade espermática total (Dini et al., 2019; Brito, 2025). Em pequenos ruminantes, essa tecnologia permite ao médico veterinário decidir, em tempo real, se um ejaculado possui os requisitos mínimos para a criopreservação e pós-descongelamento.

A principal vantagem da descentralização das análises é a democratização do acesso à biotecnologia de ponta em regiões remotas (Kanakasabapathy et al., 2017). O processamento dentro da fazenda minimiza o estresse de transporte dos animais e permite a formação de bancos de germoplasma privados (Bittencourt et al., 2023). O uso de dispositivos portáteis elimina o erro humano na contagem de espermatozoides e na estimativa da motilidade progressiva, fatores que afetam diretamente o cálculo da dose de inseminação (Arifantini et al., 2025).

Por outro lado, as desvantagens incluem a sensibilidade desses dispositivos à temperatura ambiente e à concentração da amostra, que se for muito elevada ou muito diluída, pode comprometer a precisão do software (Garcia et al., 2026). Assim, embora os sistemas portáteis ofereçam uma confiabilidade superior à avaliação visual, a padronização do preparo das amostras e a calibração dos algoritmos continuam sendo desafios críticos para a sua plena implementação (Belala et al., 2024).

Considerações Finais

As biotecnologias avançadas têm transformado a reprodução de pequenos ruminantes em uma

atividade de precisão. Nesse sentido, novos aditivos de diluentes elevam o patamar de qualidade do sêmen criopreservado, enquanto o aprimoramento de métodos de processamento, como a vitrificação e a liofilização, surgem como alternativas à congelação convencional para superar danos criogênicos. Aliado a esses avanços, a implementação de sistemas de análise seminal portátil possibilita que o monitoramento da qualidade espermática ocorra de forma imediata e objetiva. O futuro da área reside na personalização dos protocolos de congelação para cada reprodutor, com a identificação da variabilidade individual na resistência ao resfriamento e congelação, possibilitando o ajuste específico dos protocolos de criopreservação para machos que apresentam baixa tolerância aos métodos convencionais, otimizando assim o aproveitamento máximo de animais de alto valor genético.

Referências

- Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Küçük N, Uçan U, Serin I, Ceylan A.** Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine induced acrosome reaction in ram spermatozoon. *Andrologia*, v.47, p.786–792, 2015.
- Arifiantini RI, Gusman KT, Agil M, Karja NWK.** Comparative assessment of bull sperm motility and concentration: Conventional methods versus portable AndroScope CASA system. *J Bioteknologi Biosains Indones*, v.12, n.2, p.286-292, 2025.
- Arruda LCP, Tobal LFM, Carneiro GF, Guerra MMP.** Zinc oxide nanoparticles alter the membrane potential of mitochondria from post-thawed ram spermatozoa. *Small Ruminant Res*, v.202, p.106466, 2021.
- Arruda LCP, Araújo Silva RAJ, Mergulhão FCC, Monteiro MM, Batista AM, Monteiro Jr PLJ, Seal DCM, Guerra MMP.** Quality parameters of ram semen cryopreserved in egg yolk extender supplemented with myricetin. *S Afr J Anim Sci*, v.52, p.77-89, 2022.
- Belala R, Bourahmoune D, Mimoune N.** The use of Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) in domestic animal reproduction: A review. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, v.30, n.6, p.741-751, 2024.
- Bittencourt RF, Xavier GM, Carneiro IMB, Costa EO.** Critérios e metodologias para produzir sêmen de caprinos e ovinos em nível de fazenda. *Rev Bras Reprod Anim*, v.47, p.514-523, 2023.
- Brito LFC.** Sperm motility evaluation in stallion fresh, cooled and frozen semen using a portable computer-assisted sperm analysis system. *Reprod Domest Anim*, v.60, p.e70052, 2025.
- Cardenas-Padilla AJ, Jimenez-Trejo F, Cerbon M, Chavez-Garcia A, Cruz-Cano NB, Martinez-Torres M, Medrano A.** Sperm melatonin receptors, seminal plasma melatonin and semen freezability in goats. *Theriogenology*, v.24, p.98-106, 2024.
- Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet Bras*, v.5, n.3 p.236-248, 2011.
- Dewry RK, Deka BC, Bhuyan D, Biswas RK, Sinha S, Hussain Z, Hazarika SB.** Effect of vitamin E on the quality of frozen buck semen. *Indian J Small Ruminants*, v.21, n.2, p.343-346, 2015.
- Dini P, Troch L, Lemahieu I, Deblende P, Daels P.** Validation of a portable device (iSperm®) for the assessment of stallion sperm motility and concentration. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.12, p.1507-1513, 2019.
- García P, Sevilla F, Araya-Zúñiga I, Cervantes-Acosta P, Hernández-Beltrán A, Domínguez-Mancera B, Molina-Montero R, Barrientos-Morales M, Rodríguez JM, Salamanca-Carreño A, Valverde A.** Cold-storage temperature and dilution effects on kinematics of Brahman bull sperm patterns assessed with a Computer-Assisted Semen Analysis portable device. *Anim Open Space*, v.5, p.100117, 2026.
- Gangwar C, Kumar A, Gururaj K, Mishra AK, Ranjan R, Kumar M, Mittal N.** Impact of varying doses of *Moringa* leaf extract supplementation in the cryopreservation media on sperm quality, antioxidant capacity and antimicrobial activity of frozen-thawed buck spermatozoa. *Indian J Anim Sci*, v.94, n.4, p.362-368, 2024.
- Hackerova L, Pilsova A, Pilsova Z, Zelenkova N, Tymich Hegrova P, Klusackova B, Chmelikova E, Sedmikova M, Simonik O, Postlerova P.** Boar sperm motility assessment using computer-assisted sperm analysis: Current practices limitations and methodological challenges. *Animals*, v.15, p.305, 2025.
- Hassanine NNAM, Ibrahim NA, Basher NS, Saleh AA, Elnesr SS, Essa MOA, Husien HM, Wang M.** A Comparative Review of Fertility and Semen Assessment Techniques in Farm Animals. *Animals*, v.16, p.854, 2026.
- Holt WW.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3–22, 2000.
- Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat AG, Risopatrón M J, Sánchez R.** Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose.

Reproduction, v.136, p.167–173, 2008.

Jiménez-Rabadán P, García-Álvarez O, Vidal A, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Ramón M, del Olmo E, Fernández-Santos R, Garde JJ, Soler A J. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, v.71, n.1, p.85-90, 2015.

Kanakasabapathy MK, Sadasivam M, Singh A, Preston C, Thirumalaraju P, Venkataraman M, Bormann CL, Draz MS, Petrozza JC, Shafiee H. An automated smartphone-based diagnostic assay for point-of-care semen analysis. *Sci Transl Med*, v.9, n.382, 2017.

Langerová L, Savvulidi FG, Ptáček M, LeBrun C, Abadjieva D, Magaiya A, Makhanbetova A, Kenzhebaev T, Kulataev B, Malmakov N. Sheep Artificial Insemination: History, Current Practices, Limitations, and Methodological Challenges. *Agriculture*, v.16, n.2, p.160, 2026.

Lukusa K. Dietary supplementation of selenium and addition of vitamin C and E in extender to enhance semen cryopreservation and reproductive performance of Saanen goats (Doctoral dissertation). University of Pretoria, South Africa. 2019.

Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreserv Bioban*, v.17, n.2, p.171-182, 2019.

Maia MS, Bicudo SD, Sicherle CC, Rodello L, Gallego IC. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozenthawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.118–123, 2010.

Matias MC, Melo MMS, Mendonça MSB, Sousa CWC, Costa Neto LF, Câmara DR. Vitrificação de espermatozoides em pequenos ruminantes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.105-110, 2019.

Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

Oliveira AS, Arruda LCP, Pinto GOA, Magnabosco ARDS, Andrade ALC, Cadena PG, Guerra MMP. Nanoemulsions of Sicilian lemon and wild orange essential oils, using soy lecithin as a surfactant, preserve the acrosome of ram sperm post-thawing. *Anim Reprod*, v.22, n.4, p.e20240110, 2025.

Pellicer-Rubio MT, Combarous Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J Reprod. Fert*, v.112, p.95-105, 1998.

Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Fernández-Santos MR, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Montoro V, Garde JJ. Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. *Int J Mol Sci*, v.21, n.8, p.2781, 2020.

Quan GB, Hong QH, Hong Q, Yang HY, Wu SS. The effects of trehalose and sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non-mating season. *Cryo Letters*, v.33, p.307–317, 2012.

Rajska I. Freeze drying as a method of long-term conservation of mammalian semen – a review. *Ann Anim Sci*, v.21, n.4, p.1209–1234, 2021.

Sangeeta S, Kulkarni S, Arangasamy A, Selvaraju, S. Effect of amino acids on sperm motility, velocity parameters, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at cooled and post-thawed ram epididymal semen. *Indian J Anim Sci*, v.85, n.7, p.729–735, 2015.

Shafiei M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Esfahani MH. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of post-thawed goat semen. *Theriogenology*, v.83, n.8, p.1321-1327, 2015.

Shahmoradi E, Baheiraei N, Halvaei I. Trehalose Attenuates Detrimental Effects of Freeze-Drying on Human Sperm Parameters. *Biopreserv Bioban*, v.20, n.1, p.31-37, 2022.

Sharafi M, Borghei-Rad SM, Hezavehei M, Shahverdi A, Benson JD. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, v.12, n.23, p.3271, 2022.

Vidal AH, Batista AM, Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res*, v.109, p.47–51, 2013.

Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, v.16, p.639–641, 1998.