

DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS E QUALIDADE DO SÊMEN SUÍNO CRIOPRESERVADO

(Different types of packaging and quality of cryopreserved swine semen)

Ricardo TONIOLLI^{*}; Luciana de Souza TONIOLLI; Lina Raquel Santos ARAÚJO; Ludymila Furtado CANTANHÊDE; Daianny Barboza GUIMARÃES; Tatyane Bandeira BARROS

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000. *E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

Devido à alta sensibilidade do espermatozoide suíno à criopreservação, torna-se importante o estudo acerca dos danos provocados à célula, pela agressão térmica ocasionada durante este processo. Sendo assim, avaliou-se neste trabalho, a influência de diferentes embalagens, utilizadas para o armazenamento de sêmen suíno, sobre a qualidade do espermatozoide criopreservado. Foram utilizados animais híbridos, a coleta do sêmen foi feita pela técnica da mão enluvada. Foram analisados o vigor (0 a 5), a motilidade (0 a 100%), a taxa de degradação da motilidade e a integridade acrossomal. O sêmen foi congelado em palhetas de 0,5mL, criotubos de 2,0mL e macrotubos de 4 e 5mL. As amostras de sêmen suíno congelado em palhetas apresentaram os melhores resultados de vigor espermático (2,3), de motilidade (45,4%), de taxa de degradação da motilidade (56,5%) e de integridade acrossomal (60,6%), quando comparadas às amostras criopreservadas nos demais tipos de embalagens avaliadas ($p < 0,05$). Somente para o parâmetro taxa de degradação da motilidade, o sêmen conservado em palhetas apresentou resultados similares ao conservado em macrotubo de 4mL (54,1%). Os resultados pós-descongelamento indicaram que o sêmen envasado nas palhetas foi o que apresentou características condizentes com a possibilidade de serem utilizados nos protocolos de inseminação artificial, com possibilidades de bons resultados de fertilidade. Concluiu-se que embalagens que permitam uma maior velocidade de trocas de temperatura entre as células encontradas no bordo e no centro, favorecem a uma melhor qualidade do sêmen descongelado.

Palavras chave: Congelamento, motilidade espermática, termorresistência, varrão.

ABSTRACT

Due to high sensitivity of the swine spermatozoa to cryopreservation, it is important to study the damage caused to the cell by thermal aggression during this process. Thus, this study evaluated the influence of different packages used for the storage of swine semen on the quality of cryopreserved spermatozoa. Hybrid animals were used, and semen collection was made by the gloved hand technique. The vigor (0 the 5), motility (0 the 100%), rate of motility degradation and acrosome integrity were analyzed. The semen was frozen in straws of 0.5mL, cryotubes of 2.0mL and macrotubes of 4 and 5mL. The swine semen samples frozen in straws showed the best results in sperm vigor (2.3), motility (45.4%), motility degradation rate (56.5%) and acrosomal integrity (60.6%), when compared to the cryopreserved samples in the other types of packaging evaluated ($p < 0.05$). Only for the motility degradation rate parameter, the semen preserved in straws showed results similar to the one conserved in a 4 mL macrotube (54.1%). The results after thawing indicated that the semen packed in straws was the one that presented consistent characteristics with the possibility of being used in artificial insemination protocols with possibilities of good fertility results. It was concluded that packages that allow a higher speed of temperature changes between the cells found on the edge and in the center of them, favor a better quality of the thawed semen.

Key words: Freezing, sperm motility, thermoresistance, boar.

INTRODUÇÃO

O sêmen suíno criopreservado tem sido alvo de vários estudos, porém, seu uso ainda é muito limitado, pois necessita de melhorias das técnicas de criopreservação (CÓRDOVA *et al.*, 2002; PYLES, 2013; DAVOODIAN *et al.*, 2017; YESTE *et al.*, 2017). Os primeiros resultados positivos de fertilidade, com a utilização de sêmen suíno congelado, foram obtidos no início da década de 1970, através da inseminação artificial cervical. Bons resultados de fertilidade foram obtidos através de inseminações feitas por via cirúrgica, diretamente no oviduto de marrãs no estro (BERNARDI *et al.*, 2005).

O maior problema da criopreservação não reside na inviabilidade espermática à temperatura de -196 °C, e sim em se conseguir uma boa sobrevivência celular aos danos resultantes do processo de congelação, na faixa de temperaturas entre -15 a -60 °C (MOURA *et al.*, 2013). O espermatozoide suíno apresenta alta sensibilidade ao processo de criopreservação (YESTE, 2017), sendo de grande importância o conhecimento acerca dos danos provocados a esta célula durante todo o processo. Diferentes protocolos de congelação para o sêmen suíno vêm sendo estudados há vários anos, na tentativa de se aprimorar a técnica de criopreservação (CÓRDOVA *et al.*, 2002; TONIOLLI *et al.*, 2017). Vários fatores concorrem para o sucesso da técnica, tais como: a complexidade bioquímica do espermatozoide, os períodos de incubação para equilíbrio da célula espermática, a interação de seus componentes e a influência da curva de resfriamento, além da congelação e descongelação propriamente ditas (GUIMARÃES *et al.*, 2018; TONIOLLI *et al.*, 2018).

O tipo de embalagem utilizada para envase e armazenamento do sêmen é outro fator que concorre para os bons resultados da técnica. Existem vários tipos de embalagens empregadas para esta finalidade, tais como: ampolas, palhetas, macrotubos, criotubos e blister (ERIKSSON e RODRIGUES-MARTINEZ, 2000; LI *et al.*, 2019; SICHSTAR *et al.*, 2019). A congelação, sob a forma de pellets, também é utilizada (ZANIBONI *et al.*, 2014; ABDEL-KHALEK *et al.*, 2018), entretanto, devido às limitações de armazenamento e de manipulação, além dos riscos de ordem sanitária para o sêmen, este método não tem sido empregado. Vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de se encontrar embalagens adequadas para a congelação do sêmen suíno, as quais devem propiciar velocidades de congelação e descongelação uniformes (LI *et al.*, 2019).

A dose de sêmen a ser aplicada está diretamente relacionada às características de motilidade e morfologia, além da quantidade de espermatozoides viáveis por dose. Para a utilização do sêmen suíno congelado, na inseminação artificial, também deve ser levado em consideração a forma de embalagem do sêmen, pois alguns autores têm encontrado resultados melhores em determinados tipos de embalagens, quando comparados a outras (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Diante do acima exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes tipos de embalagens sobre a qualidade do sêmen suíno descongelado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e coleta de sêmen

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 31 de agosto de 2012, segundo processo nº 12.236.467-8, por ter atendido aos critérios

solicitados pelo CEUA/UECE. Foram utilizados 5 reprodutores suínos adultos, entre 18 e 24 meses de idade, pertencentes ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen (LRSTS), da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, os quais foram submetidos à rotina semanal de coleta de sêmen. Os animais selecionados apresentavam caracteres sexuais bem definidos, órgãos genitais íntegros, bons aprumos, sendo treinados para monta em manequim. Os reprodutores recebiam ração balanceada (3.200 Kcal/Kg e 14% de PB, 2,0 a 3,0 Kg/dia) em 2 arraçoamentos diários.

A coleta foi realizada pela técnica da mão enluvada, em manequim, após lavagem externa do prepúcio com água tratada, sendo enxuto com toalha de papel descartável. O sêmen foi coletado em frasco plástico, com capacidade para 500mL, previamente aquecido a 37 °C e protegido por copo isotérmico. A fração gelatinosa do ejaculado foi separada por uma gaze especial, sendo desprezada após a coleta.

Análise do sêmen *in natura*

A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada através do volume (mL), em balança digital, da concentração ($\times 10^9$ spz/mL) em espectrofotômetro, do total de células ($\times 10^9$ spz), do vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e da motilidade espermática (0 a 100% - MARTIN RILLO *et al.*, 1996). Para a análise do vigor e da motilidade, uma amostra do sêmen (15 μ L) foi colocada entre lâmina e lamínula e foi feita a leitura em microscopia óptica, com um aumento de 200 vezes. Somente os ejaculados que apresentavam valores de vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 80\%$ foram utilizados nos protocolos experimentais.

Formatos e volumes das embalagens

Foram testadas diferentes embalagens, visando o envase e a congelação do sêmen, sendo elas: 01) Palheta de 0,5mL = embalagem de menor volume e menor diâmetro; 02) Criotubo de 2,0mL = embalagem de maior diâmetro e volume intermediário; 03) Macrotubos de 4,0mL (240mm – Mac 4) e 5,0mL (280mm - Mac5) = embalagens de diâmetro igual e intermediário com os maiores volumes. Todas as embalagens eram feitas de PVC, não sendo esta característica levada em consideração para as avaliações. Todas apresentavam formato cilíndrico e as diferenças entre elas se referiam aos volumes de sêmen armazenado e aos diâmetros, sendo cada uma delas considerada como um dos tratamentos a serem testados.

Resfriamento, envase e congelação do sêmen

Após as análises do sêmen *in natura*, este foi refrigerado, envasado e congelado nos diferentes tipos de embalagens. O diluente de resfriamento foi constituído por 5,67g de glicose, 22,5% de gema de ovo e água destilada q.s.p. 100mL; já o de congelação, foi o mesmo de resfriamento adicionado de glicerol a 4% (concentração final = 2%). Visando a congelação do sêmen, utilizou-se a técnica de Paquignon *et al.* (1974).

De cada ejaculado, foi separado um total de $10,2 \times 10^9$ spz, em volumes variados de acordo com a concentração do sêmen. O plasma seminal foi separado do ejaculado logo após a coleta, através de centrifugação a 800g (2.600 rpm), por 15 minutos, a 30 °C, e, em seguida, foi armazenado em bisnagas plásticas (90mL) e criopreservado a -20 °C. Após a centrifugação, os espermatozoides (papa de spz com 2mL) foram submetidos a 1ª pré-

diluição, com a adição do diluente de resfriamento previamente aquecido a 30 °C: 2,0mL de papa de sptz + 9,0mL do diluente de resfriamento (módulos).

A partir desse ponto, a temperatura do módulo foi abaixada (em 1 hora) até 17 °C e mantida a este nível por 5 horas. Após este período, foi feita a 2ª pré-diluição (a 17 °C) adicionando-se a cada módulo mais 9,0mL do diluente de congelação. Dessa forma, obtém-se um volume final de 20mL, com um total de $10,2 \times 10^9$ sptz, em uma concentração fixa de 510×10^6 sptz/mL. Após a segunda pré-diluição, a temperatura do módulo foi diminuída, durante 1 hora, até alcançar 4 °C.

Em seguida, o sêmen foi envasado nas diferentes embalagens testadas, a uma concentração de 510×10^6 sptz totais/mL. As palhetas e os macrotubos foram vedados com esferas de vidro e o criotubo foi vedado com uma tampa rosqueada própria. Após o envase do sêmen, as embalagens foram submetidas ao vapor de nitrogênio em rampa de congelação a -70 °C, durante 15 minutos, a uma distância de 5cm da superfície do líquido (SUKHATO *et al.*, 2001). Em seguida, as amostras de sêmen congeladas foram mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C), conservadas dentro do botijão criogênico, por um período mínimo de 15 dias, para posterior descongelação e análises.

Descongelação e ressuspensão do sêmen

Para descongelação das amostras, foi utilizado um descongelador automático (Geysir, Minitub GmbH, Alemanha), sendo estabelecidos diferentes tempos e temperaturas, de acordo com o tipo de embalagem utilizada: a) Palhetas: 37 °C por 30 segundos; b) Macrotubos e Criotubos: 50 °C por 60 segundos. Imediatamente após a descongelação e antes da ressuspensão, o sêmen foi colocado em tubo de ensaio, sendo aferida a temperatura da amostra através de termômetro para essa finalidade.

As análises foram feitas 10 minutos após a descongelação/ressuspensão a 37 °C. Para as análises, o sêmen descongelado foi ressuspense no diluente de Beltsville Thawing Solution (BTS), de forma a se respeitar a mesma concentração de uma dose inseminante (102×10^6 sptz/mL). Foi adicionado 2mL de BTS ao volume de uma palheta (0,5mL) e, para as outras embalagens (macrotubos de 4 e 5mL e criotubo de 2mL), foram retiradas alíquotas de 0,5mL, às quais se adicionou os mesmos 2,0mL do diluente de ressuspensão.

ANÁLISES APÓS DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

Vigor e Motilidade Espermática:

Após a descongelação do sêmen, cada amostra foi avaliada quanto ao vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e à motilidade espermática (0 a 100% - MARTIN RILLO *et al.*, 1996). O sêmen descongelado e ressuspense foi colocado em banho-maria a 37 °C e as análises realizadas após 10 minutos de incubação. Foi colocado um volume de 15µL do sêmen, entre lâmina e lamínula, para análise a luz de microscopia óptica a um aumento de 200x.

Teste de Termorresistência

O sêmen foi incubado durante 120 minutos em banho-maria a 37 °C e o vigor espermático avaliado após 10 minutos e 2 horas de incubação (GRAHAM e MOCÉ, 2005). Para se calcular a taxa de degradação média da motilidade (TDM), aplicou-se a seguinte fórmula, com resultados expressos em porcentagem (%):

$$\text{TDM (\%)} = \frac{\text{vigor } 10' - \text{vigor } 2 \text{ h}}{\text{vigor } 10'} \times 100$$

Integridade acrossomal

Para análise da qualidade acrossomal de cada ejaculado e em cada tratamento, foi separada uma alíquota (palheta) de 0,5mL de sêmen, à qual foi adicionado 0,5mL de solução formol-salina (0,495mL de soro fisiológico e 0,005mL de formol), em tubos *ependorf*, para ser realizada a análise acrossomal (BORTOLOZZO *et al.*, 2005). Dessa solução, foi retirado um volume de 0,5mL, com o qual foi feito o esfregaço em lâmina e que foi secado à temperatura ambiente. A qualidade do acrossoma foi classificada em: 1) Acrossoma intacto; e 2) Acrossoma danificado. As análises foram feitas no sêmen *in natura* e após a descongelação, contando-se 200 células por amostra. Os exames foram realizados por meio da microscopia óptica com lente de imersão e contraste de fase, a um aumento de 1000x.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. A análise estatística foi processada através da avaliação das médias e dos desvios padrões, sendo que os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado, exceto para a variável vigor espermático, em que foi utilizado o teste de Mann-Witney a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen *in natura* apresentou valores de vigor, de motilidade e de células com acrossoma intacto acima dos requisitos mínimos (CBRA, 2013) necessários à possibilidade de ser processado visando sua criopreservação: $4,5 \pm 0,3$; $89,9 \pm 6,4\%$ e $89,9 \pm 10,4\%$, respectivamente. A inseminação artificial, com a utilização de sêmen congelado para a espécie suína, ainda não é uma realidade para o setor produtivo, particularmente em virtude de resultados divergentes, obtidos no campo na criopreservação do sêmen (YESTE *et al.*, 2017).

Danos funcionais e estruturais são vistos após os processos de resfriamento, congelamento e descongelação, sendo ainda um problema encontrado nos diferentes protocolos utilizados visando a criopreservação espermática. Entretanto, a influência da técnica utilizada sobre a qualidade espermática tem sido evidente, refletindo em uma melhor ou pior qualidade após todo processo (STORNELLI *et al.*, 2005). A criopreservação é uma biotécnica capaz de superar o limite temporal no uso do sêmen, mas, na espécie suína, sua utilização ainda apresenta problemas de redução da capacidade fertilizante do espermatozoide (TONIOLLI *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018).

O estresse osmótico sofrido pelas células, no momento da congelação da água extracelular, quando os solutos aumentam a pressão osmótica com saída de água do meio intracelular, pode causar desidratação celular. Na descongelação, acontece o efeito inverso, com influxo de água para o meio intracelular, podendo provocar inchaço e até ruptura da membrana plasmática (PEÑA *et al.*, 2006). Dessa forma, a criopreservação pode induzir danos ao espermatozoide, afetando a integridade funcional das células e reduzindo sua capacidade fertilizante (MOURA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2016).

De uma forma geral, os melhores resultados encontrados neste trabalho foram obtidos com o sêmen envasado em palhetas ($p < 0,05$), quando comparados aos das outras três embalagens, nas quais os resultados não diferiram entre si ($p > 0,05$). A temperatura, após a descongelação do sêmen conservado em palhetas, foi de 36 °C, já nas demais embalagens testadas foi de 34 °C. Provavelmente, este valor mais baixo foi influenciado pelo maior diâmetro das embalagens maiores, uma vez que a temperatura de descongelação se distribui de maneira mais uniforme da periferia para o centro da amostra nas embalagens com menor diâmetro (ERIKSSON *et al.*, 2001).

Todo material e diluente que tiveram contato com as amostras descongeladas encontravam-se a 37 °C. O sêmen proveniente das palhetas apresentou uma diferença de apenas 1 °C para o diluente de ressuspensão, enquanto nas outras embalagens esta diferença chegou a 3 °C. Este fato pode ter favorecido a ocorrência de choque térmico, justificando, em parte, os melhores resultados obtidos no sêmen armazenado nas palhetas (MOURA *et al.*, 2013; TONIOLLI *et al.*, 2015). Novas relações de tempo e temperatura devem ser avaliadas para a descongelação do sêmen envasado em macro e criotubos, de forma a se obter uma temperatura da amostra descongelada mais próxima possível de 37 °C, evitando-se, desta forma, um choque térmico.

Analisando-se os resultados do vigor espermático, no sêmen descongelado, verificou-se maior valor no sêmen envasado em palhetas (2,3 - $p < 0,05$), quando comparado ao das outras três embalagens, criotubo (1,4), Mac 4 (1,5) e Mac 5 (1,3), respectivamente. Os espermatozoides criopreservados nos criotubos e macrotubos, não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Fig. 01).

Os resultados similares de vigor ($p > 0,05$) entre os dois tipos de macrotubos devem-se provavelmente ao fato de apresentarem o mesmo diâmetro, apesar dos volumes diferentes. Dessa forma, possibilitou uma mesma velocidade de resfriamento, congelação e descongelação entre as células do bordo e do centro da coluna de sêmen dentro da embalagem. O diâmetro ainda maior do criotubo não favoreceu nem prejudicou os resultados de vigor espermático em relação aos resultados obtidos nos macrotubos ($p > 0,05$). Embora a relação superfície:volume interfira na qualidade espermática (BURANAAMNUAY *et al.*, 2009), aparentemente os diferentes volumes e alturas dos frascos de maior diâmetro não interferiram nos resultados.

Paquignon *et al.* (1988) relatam uma queda significativa do vigor e da motilidade espermática após a ressuspensão do sêmen, o que pode estar relacionada à diferença de temperatura entre o conteúdo das embalagens e o diluente de ressuspensão previamente aquecido a 37 °C. Os resultados desse trabalho mostraram uma temperatura interna média de 35 °C para as palhetas e de 33 °C para as outras embalagens pós-descongelação.

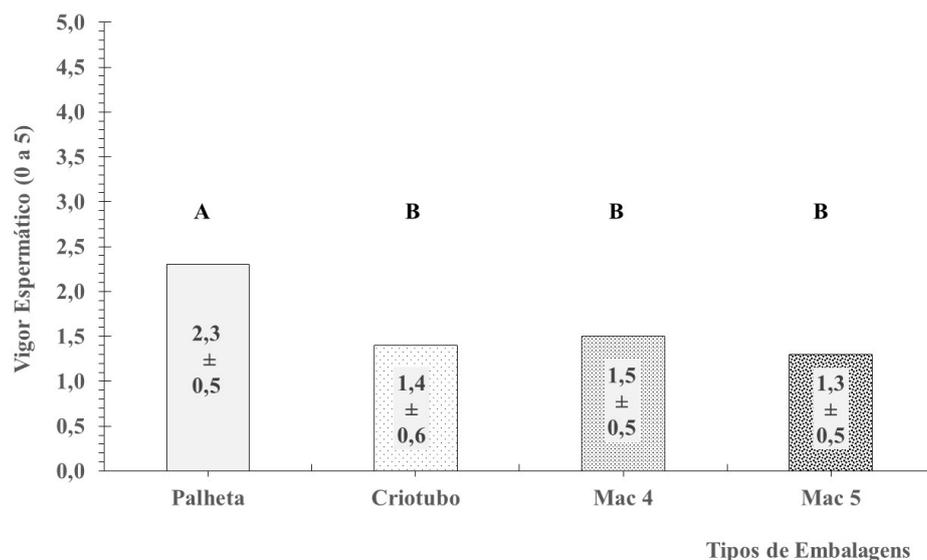


Figura 01: Vigor espermático (0 a 5) do sêmen suíno criopreservado, em diferentes tipos de embalagens, após descongelação, ressuspensão em BTS e incubação por 10 min. a 37 °C.

As diferenças de temperatura entre o sêmen descongelado e o diluente de ressuspensão acima de 1 °C podem ter influenciado negativamente os resultados de vigor espermático. Este fato poderia indicar a possibilidade de que a distribuição da temperatura, dentro da coluna de sêmen, durante a descongelação, teria uma maior influência na qualidade do sêmen pós-descongelação (ERIKSSON e RODRIGUES-MARTINEZ, 2002), tornando-se, assim, um fator mais importante a ser considerado para a escolha de embalagens visando a criopreservação do sêmen do varrão. Entretanto, em suínos, estudos confirmaram que, mesmo utilizando o sêmen de animais com excelentes resultados de motilidade e sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados provenientes de animais diferentes (TONIOLLI *et al.*, 2017).

Quanto aos resultados da motilidade espermática do sêmen descongelado, assim como observado para o vigor espermático, percebeu-se um melhor resultado no sêmen criopreservado em palhetas, quando comparado às outras embalagens ($p < 0,05$). No criotubo e nos macrotubos, as diferenças encontradas também não foram significativas entre si ($p > 0,05$) (Fig. 02).

Eriksson e Rodrigues-Martinez (2000) obtiveram melhores resultados de motilidade espermática em sêmen envasado em sacolas de PVC (5mL), quando comparados aos resultados do sêmen envasado em macrotubos (4mL). Apesar do maior volume, a forma achatada das sacolas apresenta uma menor distância entre as paredes internas, fato este que favorece uma maior homogeneidade e velocidade de descongelação. Essa mesma característica foi observada nos resultados do presente trabalho, quando o sêmen envasado nas palhetas, recipiente com o menor diâmetro, apresentou os melhores resultados de motilidade.

Neste trabalho, observou-se que as amostras congeladas em embalagens com diâmetros menores corroboraram com a teoria de que essa medida tem influência direta sobre a qualidade das células descongeladas. A velocidade de descongelação do centro da dose em macrotubos é 3,7 vezes menor do que a observada na periferia. Essa variação não ocorre no

macrotubo achatado (WEITZE *et al.*, 1991), o que explica, em parte, a melhor motilidade espermática com o uso deste tipo de embalagem.

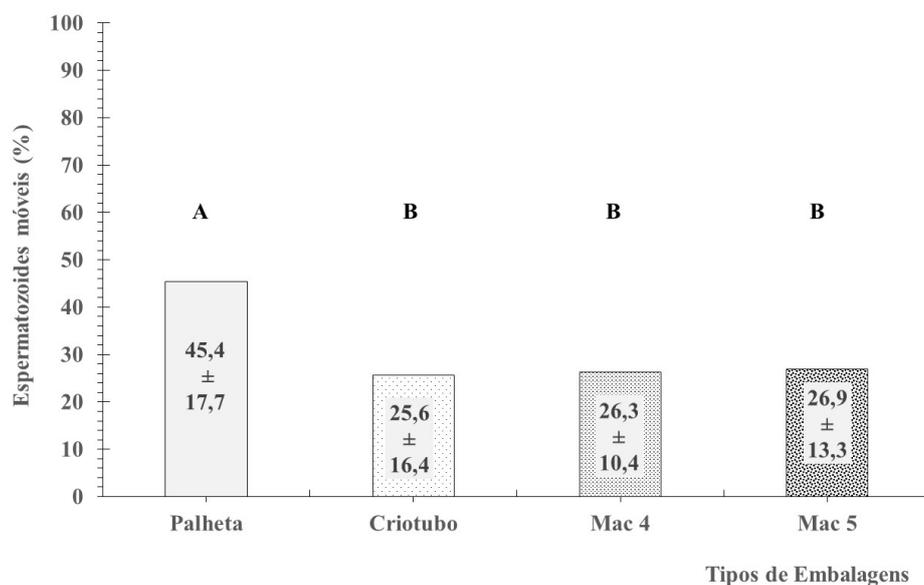


Figura 02: Motilidade espermática (%) do sêmen suíno criopreservado, em diferentes tipos de embalagens, após descongelação, ressuspensão em BTS e incubação por 10 min. a 37 °C.

As diferenças de temperatura entre o centro e periferia do recipiente permitem a formação de gelo intra e extracelular, que traz como consequência lesão de membranas (FISER e FAIRFULL, 1990) e formação de micro-cristais em mitocôndrias (COURTENS e PAQUIGNON, 1985), afetando a motilidade pós-descongelação (FISER e FAIRFULL, 1990). Baseado nos relatos de autores, pode-se explicar os melhores resultados obtidos no presente trabalho utilizando-se as palhetas para o envase do sêmen. A escolha de um determinado tipo de embalagem deve estar vinculada à facilidade de manejo, ao custo e aos resultados de congelação/dcongelação.

Li *et al.* (2019) observaram melhores resultados de cinética espermática em sêmen humano criopreservado em criotubos, comparado ao conservado em palhetas. Por outro lado, Leisinger *et al.* (2017) observaram maior motilidade e percentual de espermatozoides intactos em sêmen equino criopreservado em palhetas, em comparação com criotubos de 1,5mL, corroborando com o presente estudo. A criopreservação em frascos criogênicos (criotubo) oferece uma simplificação do protocolo de congelação, além de proporcionar um sistema mais seguro, mantendo melhor a identificação do sêmen e reduzindo significativamente o potencial de contaminação e desperdício, ou perda total da amostra, como pode ser visto nos cortes de palhetas após a descongelação (LEISINGER *et al.*, 2017). Desta forma, faz-se necessário estudos complementares para poder se entender de uma forma mais ampla a relação entre os resultados pós-descongelação de qualidade espermática e a contaminação e/ou perda de sêmen da amostra, bem como as diferenças entre o sêmen de diferentes espécies domésticas.

Segundo os resultados do teste de termorresistência, em todas as embalagens, houve uma redução nos valores do vigor espermático após o período de incubação (Fig. 03). Entretanto, constatou-se que o sêmen envasado e congelado nas palhetas e macrotubos de 240mm apresentaram os melhores resultados para esse tipo de teste. Desta forma, pode-se

dizer que essas são as embalagens que proporcionam ao espermatozoide suíno, após descongelamento, uma melhor possibilidade de fertilização, uma vez que o sêmen apresentou uma menor taxa de degradação da motilidade (56,5 e 54,1%, respectivamente), o que pode ser compreendido como uma maior quantidade de espermatozoides com bom vigor espermático.

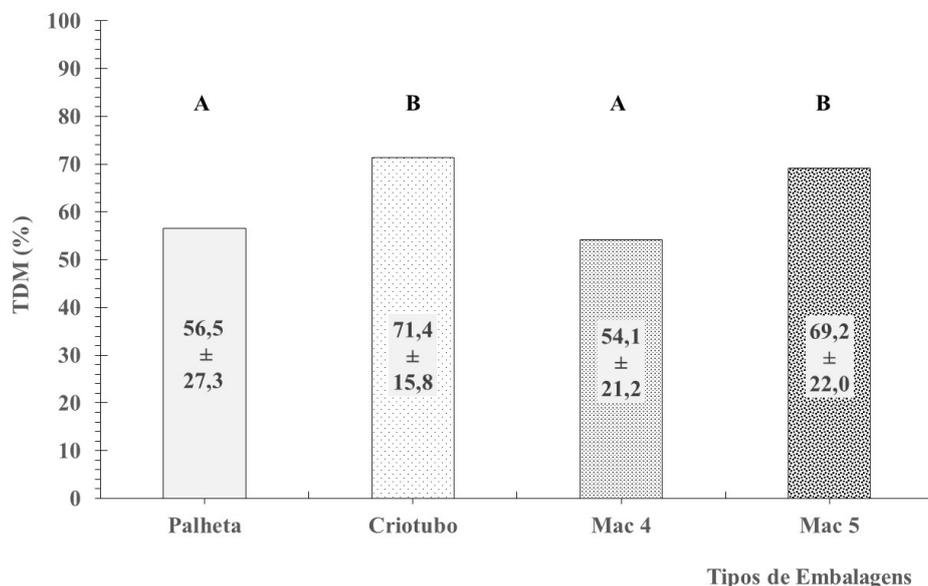


Figura 03: Taxa de degradação média da motilidade (TDM, %) no sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens após descongelamento, ressuspensão em BTS e incubação por 120 min. a 37 °C.

A queda no vigor espermático, observada ao fim do teste de termorresistência, pode ter sido devido à perda de componentes intracelulares ou a lesões estruturais na cauda dos espermatozoides (COSTA BARROS *et al.*, 2014). Durante o período de incubação, os valores do vigor espermático caíram significativamente se comparados ao vigor nas amostras em que não ocorreu diferença de temperatura entre o sêmen e o diluente, explicando assim os resultados obtidos por outros autores (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000) e representando um desafio para a pesquisa em definir protocolos de criopreservação adequados à célula espermática.

No processo de criopreservação das células espermáticas suínas, rotineiramente o plasma seminal é descartado. No entanto, têm-se evidenciado efeitos positivos dele sobre a fertilidade dos espermatozoides suínos. Uma vez que o plasma seminal é capaz de modular a função espermática e melhorar parâmetros de fertilidade de espermatozoides descongelados de varrões (RECUERO *et al.*, 2019), a sua inclusão junto ao sêmen descongelado, durante o período de incubação, poderia ter favorecido uma melhor manutenção dos valores do vigor espermático e diminuído as diferenças entre amostras onde ocorreu variações da temperatura.

Nos resultados da análise da integridade acrossomal (Fig. 04), as palhetas apresentaram as maiores porcentagens de espermatozoides com acrossoma íntegro (60,6%), em comparação aos demais tipos de embalagens ($p < 0,05$). Os resultados deste trabalho corroboram com o de outros autores (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2002; IZQUIERDO *et al.*, 2005; LEISINGER *et al.*, 2017) na afirmativa de que melhor motilidade e

morfologia espermática podem ser obtidos quando se utiliza embalagens de menor diâmetro para a criopreservação do sêmen.

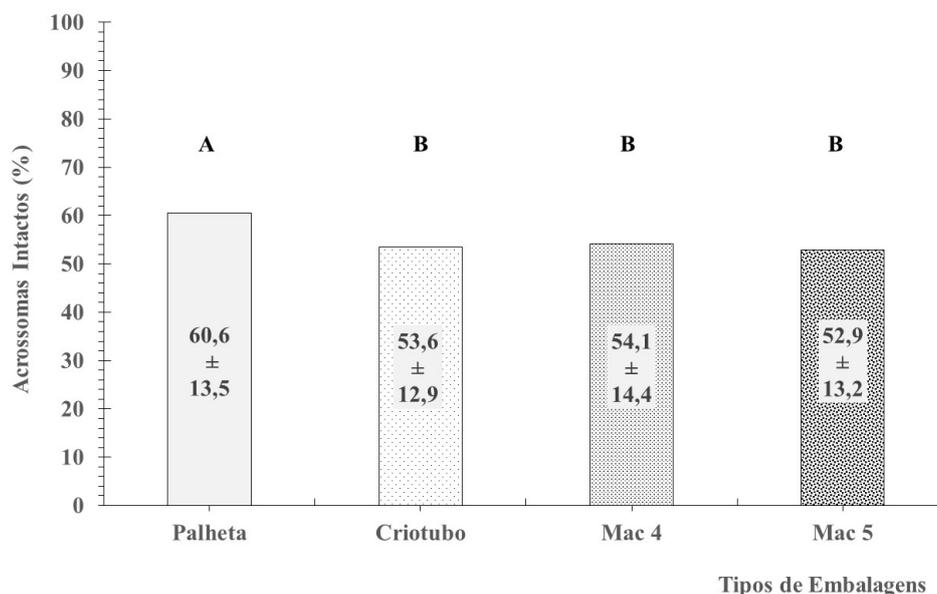


Figura 04: Acrossomas intactos (%) no sêmen suíno criopreservado em diferentes tipos de embalagens após descongelação, ressuspensão em BTS e incubação por 10 min. a 37 °C.

O tipo de embalagem utilizada na criopreservação do sêmen suíno interferiu na qualidade acrossomal avaliada depois (EKWALL *et al.*, 2009). O melhor resultado obtido com as palhetas foi devido, provavelmente, ao padrão de formação de cristais de gelo, devido a uma maior velocidade de congelamento. A ocorrência de choque térmico entre as células que se encontram nas regiões periféricas e centrais da embalagem pode induzir ao aparecimento de danos no acrossoma dos espermatozoides, durante o processo de congelamento (CÓRDOVA *et al.*, 2002; IZQUIERDO *et al.*, 2005). Além disso, existe a interação entre o diluente de criopreservação e o tipo de acondicionamento, que pode conferir melhores características físicas, morfológicas e funcionais ao sêmen (SICHTAR *et al.*, 2019; KHALIL *et al.*, 2020).

O dano acrossomal, provocado pela desestabilização das membranas plasmática e acrossômica externa, deve-se à perda de componentes da membrana espermática e pode estar associado ao processo de refrigeração entre temperaturas de 15 a 5 °C e ao estresse da criopreservação (CEROLINI *et al.*, 2001), podendo ser visto edema, ondulações, rupturas e vacuolizações (SILVA *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns autores relatam que mudanças sofridas pelo acrossoma, após a descongelação, estão associadas às mudanças semelhantes àquelas sofridas na capacitação, sendo comprovadas em experimentos com corantes vitais que se ligam ao conteúdo acrossomal e à membrana plasmática (BERNECIC *et al.*, 2019).

Os danos causados pela criopreservação à qualidade espermática podem ser influenciados pela forma e volume das embalagens utilizadas (IZQUIERDO *et al.*, 2005). As embalagens devem proporcionar velocidades uniformes de congelamento e descongelamento, de forma a minimizar o efeito deletério sobre o espermatozoide (LEISINGER *et al.*, 2017), sendo sugerido, para isto, uma maior relação superfície: volume (BURANAAMNUAY *et al.*, 2009), a qual só pode ser encontrada nas embalagens de menor volume e raio interno.

Outro fator que influencia a qualidade do resultado final da criopreservação do sêmen suíno é a variação individual de reprodutores ao processo e, conseqüentemente, à capacidade de fertilização, que pode ser influenciada por vários componentes do plasma seminal e do próprio espermatozoide (PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017). Contudo, muitos destes componentes e suas funções ainda são desconhecidos e as diferenças individuais no conteúdo destas substâncias estabilizadoras podem também explicar as diferenças na congelabilidade do ejaculado de cada reprodutor (VALENCIA *et al.*, 2020).

O formato e volume das embalagens utilizadas para o envase e a criopreservação do espermatozoide suíno são importantes e devem ser levadas em consideração no tocante à decisão de qual protocolo de congelamento será usado. Entretanto, outros fatores também influenciam no processo e no resultado final, no tocante a uma maior ou menor possibilidade de fertilização pelo sêmen conservado por essa técnica. O papel central das proteínas e suas interações na função celular (LAZARI *et al.*, 2019), que também sofrem influência sazonal (MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2020), também não podem ser negligenciados e precisam ser melhor estudados e compreendidos.

Neste trabalho, a queda da qualidade espermática foi mais acentuada no sêmen proveniente das embalagens com maior diâmetro (criotubo, Mac 4 e Mac 5), em relação à de menor diâmetro (palheta) ($p < 0,05$). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as células mais próximas da periferia da embalagem congelam mais rapidamente do que as da porção central. Durante a descongelação, isso se repete, sendo descongelada primeiramente a porção periférica e posteriormente a porção central (ERIKSON e RODRIGUES-MARTINEZ, 2000). Dessa forma, Bwanga *et al.* (1991) obtiveram uma melhor qualidade espermática pós-descongelação, usando macrotubos achatados (1,7mL) ou palhetas (0,5mL), em comparação aos macrotubos tradicionais (4 e 5mL), corroborando com os resultados deste estudo. Por causa do menor diâmetro, o conteúdo da palheta congelou e descongelou de forma mais homogênea, proporcionando uma melhor qualidade ao sêmen após a descongelação.

CONCLUSÕES

A palheta foi a embalagem mais adequada para criopreservação do sêmen suíno, pois possibilitou uma congelamento mais uniforme da amostra de sêmen contida no seu interior, proporcionando os melhores resultados após a descongelação do sêmen. A influência destes resultados *in vitro*, sobre a possibilidade de fertilização do espermatozoide suíno criopreservado, deve ser motivo de estudos suplementares mais detalhados.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KHALEK, A.E.; KHALIL, W.A.; EL-SAYDY, B.E.; YOUSIF, A.I.A. Effect of Some Alternative Components of Egg Yolk in Tris-Extender on Sperm Characteristics of Ram Semen Frozen with Two Methods of Packaging Semen. *Journal of Animal Poultry Production*, Article 6, v.9, n.1, p.33-40, 2018.

BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Emprego de sêmen congelado na IA de suíno. Suinocultura em ação. Inseminação Artificial em Suinocultura Tecnificada, p.159-179, 2005.

BERNECIC, N.C.; ZHANG, M.; GADELLA, B.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; JANSEN, J.W.A.; ARKESTEIJN, G.J.A.; GRAAF, S.P.; LEAHY, T. Bodipy-cholesterol can be reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian spermatozoa. Scientific Reports, v.9, article 9804, p.1-12, 2019.

BURANAAMNUAY, K.; TUMMARUK, P.; SINGLOR, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TECHAKUMPHU, M. Effects of Straw Volume and Equex-STM® on Boar Sperm Quality after Cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals, v.44, n.1, p.69-73, 2009.

BWANGA, C.O.; EKWALL, H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Cryopreservation of boar semen III. Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing. Acta Veterinaria Scandinavica, v.32, n.4, p.431-453, 1991.

BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Emprego de sêmen congelado na IA de suíno. Suinocultura em ação. Inseminação Artificial em Suinocultura Tecnificada, p.159-179, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. 1ª ed., Porto Alegre: Brasil; 2005. 185p.

CEROLINI, C.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M., Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Reproduction in Domestic Animals, v.121, n.2, p.395-401, 2001.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução animal. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep-frozen boar semen packaged in 0.5 and 5mL straws. Theriogenology, v.57, p.2119-2128, 2002.

COSTA BARROS, M.H.; SHIOMI, H.H.; AMO, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.O.; GUIMARÃES, J.D. Viabilidade espermática de sêmen congelado de suínos da raça Piau avaliada pelo teste de termorresistência. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.36, n.2, p.131-136, 2014.

COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A. Larson, K. Deep freezing of boar semen. Swedish University Agriculture Science, Uppsala, p.61-87, 1985.

DAVOODIAN, N.; KADIVA, A.; AHMADI, E.; MOHEBBI, A. Effects of Two Amino Acids on Motion Parameters and Enzymatic Antioxidant Activity of Freeze-Thawed Stallion Spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science, v.59, p.49-56, 2017.

EKWALL, H. Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar semen stored in large containers. Reproduction in Domestic Animals, v.44, n.1, p.62-68, 2009.

- ERIKSSON, B.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpaks and maxi-straws. *Animal Reproduction Science*, v.63, n.3-4, p.205-220, 2000.
- ERIKSSON, B.M.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, n.8, p.1593-1605, 2001.
- ERIKSSON, B.M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Deep-freezing of boar semen in plastic film 'Cochettes'. *Journal of Veterinary Medicine*, v.47, n.1, p.89-97, 2002.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Molecular Reproduction and Development*, v.25, n.2, p.123-129, 1990.
- GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; CANTANHÊDE, L.F.; FEUGANG, J.M.N.; SOUZA, L.P.; TONIOLLI, R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. *Ciência Animal Brasileira*, v.19, p.1-16, 2018.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, n.3, p.492-504, 2005.
- IZQUIERDO, A.C.; JIMÉNEZ, M.S.C.; JIMÉNEZ, C.A.L.; GUTIERRÉZ, J.P.; RILLO, S.M. Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides. *Ciencia Natural Agropecuária*, v.12, p.271-274, 2005.
- KHALIL, W.A.; ABDEL-KHALEK, E.; FALCHI, L.; EL-SAYDY, B.E.; YOUSIF, A. Effects of extender and packaging method on morphological and functional characteristics of cryopreserved Ossimi ram semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v.9, n.3, p.148-155, 2020.
- LAZARI, F.L.; SONTAG, E.R.; SCHNEIDER, A.; MOURA, A.A.A.; VASCONCELOS, F.R.; NAGANO, C.S.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Proteínas plasmáticas seminal e sua relação com a motilidade e morfologia do esperma em javalis. *Andrologia*, v.51, n.4, p.1-9, 2019.
- LEISINGER, C.A.; PINTO, C.R.F.; CRAMER, E.; LOVE, C.C.; PACCAMONTI, D.L. Effects of Repeated Partial Thaw and Refreeze on Post-Thaw Parameters of Stallion Semen Cryopreserved in Cryovials. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.49, p.19-24, 2017.
- LI, S.; AO, L.; YAN, Y.; JIANG, J.; CHEN, B.; DUAN, Y.; SHEN, F.; CHEN, J.; INGLIS, B.; NI, R.; JI, W.; SI, W. Differential motility parameters and identification of proteomic profiles of human sperm cryopreserved with cryostraw and cryovial. *Clinical Proteomics*, v.16, n.24, p1-14, 2019.
- MARTÍN-HIDALGO, D.; MACÍAS-GARCÍA, B.; GARCÍA-MARÍN, L.J.; BRAGADO, M.J.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L. Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Animal Reproduction Science*, v.219, p.1-10, article 106513, 2020.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, v.31, p.519-526, 1996.

MOURA, C.S.; NUNES, A.K.S.; SILVA, B.S.; PEIXOTO, C.A.; SILVA, A.R.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da temperatura de descongelação na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.4, p.1057-1064, 2013.

PAQUIGNON, A.; AERGOUMN, D.; COUROT, A.; DU MESNIL DU BUISSON, F. Technologie de la congélation de la semence de verret: etude in vitro. *Journée de Recherche Porcine en France*, v.6, p.71-76, 1974.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Efficacité des techniques de conservation de la semence de verrat. *INRA – Production Animal*, v.1, p.271-280, 1988.

PEÑA, F.J.; SARAIVA, F.; NÚÑES-MARTÍNEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science*, v.93, n.1-2, p.101–113, 2006.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; VILAGRAN, I.; MORATÓ, R.; ÁLAMO, M.M.R.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S.; YESTE, M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology*, v.5, n.6, p.1153-1164, 2017.

PYLES, E. Criopreservação de embriões e oócitos. Acesso: 19/08/2013. *Bio Embryo*; 2013. Disponível em: <<http://www.bioembryo.com.br/noticias.php?cat=1&subcat=2&id=188>>

RECUERO, S.; FERNANDEZ-FUERTE, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.137, n.1, p.36-42, 2019.

SICHTAR, J.; SIMONÍK, O.; BUBENÍCKOVÁ, F.; SVOBODOVÁ, J.; NEHASILOVÁ, A. Improvement in Semen Conservation of the Indigenous Czech Endangered Old Kladruber Horse: Special Focus on the Type of Extender and Packaging System. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.72, p.101-107, 2019.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.2, p.595-601, 2009.

SOUZA W.L.; MORAES E.A.; COSTA J.M.S.; SOUSA P.H.F.; LOPES JUNIOR E.S.; OLIVEIRA R.P.; TONIOLLI R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.7, p.657-664, 2016.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Análise Veterinária*, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

SUKHATO, P.; THONGSODSEANG, S.; UTHA, A.; SONGSASEN, N. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.67, n.1-2, p.69-77, 2001.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoides de verrat: amelioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Universite Francois Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN &cpsid=182303>.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G.H.; FRANCESCHINI, P.H.; MORATO, F.M.A.C. Uso do diluente BTS no processo de congelamento do sêmen suíno: II. Modificações na técnica. *Ciência Animal*, v.25, n.4, p.44-59, 2015.

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelamento em ejaculados de diferentes varrões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, n.1, p.297-311, 2017.

TONIOLLI, R.; MOREIRA, F.R.C.; TONIOLLI, L.S.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; ARAÚJO, L.R.S. Longevidade do espermatozoide suíno, incubado em diferentes tempos e temperaturas de equilíbrio. *Ciência Animal*, v.28, n.1, p.30-46, 2018.

VALENCIA, J.; YESTE, M.; QUINTERO-MORENO, A.; NIÑO-CARDENAS, C.P.; HENAO, F.J. Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, v.45, n.15, p.181-189, 2020.

WEITZE, K.F.; STAMPA, E.; RICHTER, L.; WILLMEN, T.; WABERSKI, D. Fertility of frozen boar semen: Influence of packaging number of inseminations and seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, Supplement.1, p.139-142, 1991.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, v.14, n.1, p.69-81, 2017.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction and Development*, v.84, n.9, p.802-813, 2017.

ZANIBONI, L.; CASSINELLI, C.; MAN GIAGALLI, M.G.; GLIOZZI, T.M.; CEROLINI, S. Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology*, v.82, n.2, p.251-258, 2014.