

Avanços na criopreservação de sêmen suíno

Advances in boar semen cryopreservation

José Victor Cardoso Braga¹, Ivan Bianchi¹, Mariana Groke Marques^{1,2*}

¹Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense, Brasil

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

*E-mail: mariana.marques@embrapa.br

Resumo

A criopreservação é a biotecnologia mais utilizada para a preservação de material genético e uma ferramenta indispensável para a disseminação de genética superior. Porém, o sêmen suíno apresenta características que resultam em maior sensibilidade às crioinjúrias decorrentes da criopreservação. A presente revisão visa atualizar o conhecimento geral sobre as principais estruturas do espermatozoide suíno afetadas pelo processo de congelamento e descongelamento, bem como elucidar as alternativas biotecnológicas atuais e seus potenciais, frente às melhorias no processo de criopreservação como um todo e à aplicação do sêmen suíno congelado.

Palavras-chave: crioinjúrias, sêmen suíno, criopreservação

Abstracts

Cryopreservation is the most widely used biotechnology for preserving genetic material and an indispensable tool for the dissemination of superior genetics. Still, swine semen has specificities that culminate in greater sensibility towards the cryoinjuries occurring in the cryopreservation process. The present review aims to update general knowledge on the main sperm structures affected by the freezing-thawing process, to elucidate the available biotechnological alternatives, and to assess their potential to enhance the cryopreservation field and the application of frozen swine semen.

Keywords: cryoinjury, swine semen, cryopreservation.

Introdução

A criopreservação de sêmen representa uma das estratégias mais utilizadas para a conservação de material genético a longo prazo em espécies domésticas, possibilitando a formação de bancos genéticos e o controle sanitário ao reduzir a movimentação de germoplasma entre países. Diferentemente do sêmen refrigerado, cuja viabilidade é limitada a poucos dias, o sêmen criopreservado pode ser armazenado por tempo indefinido, desde que respeitadas as boas práticas de conservação, o que permite maior flexibilidade logística e sanitária.

Apesar dessas vantagens, sua aplicação comercial da tecnologia de sêmen congelado na suinocultura ainda é extremamente limitada, sendo utilizado em uma fração muito restrita das inseminações artificiais (IA). Um dos fatores limitantes à adoção em maior escala desta tecnologia é seu impacto negativo sobre a funcionalidade espermática após o descongelamento, o que pode reduzir indicadores reprodutivos, tais como a taxa de parto e o total de nascidos. Esses efeitos decorrem devido as características intrínsecas do espermatozoide suíno e de sua sensibilidade a múltiplos estresses físicos, químicos e biológicos impostos durante o processo de criopreservação.

Nesse contexto, a melhor compreensão da fisiologia espermática torna-se necessária para o desenvolvimento de biotecnologias voltadas a mitigar os principais problemas da criopreservação de sêmen suíno, o que se reflete em melhorias no desempenho reprodutivo. Além disso, entende-se que, embora ainda não atenda plenamente às demandas produtivas isoladamente, há a possibilidade de sua integração a outras biotecnologias reprodutivas capazes de compensar, pelo menos em parte, suas limitações. Esta revisão tem como objetivo abordar a fisiologia espermática concomitante a estratégias de mitigação dos mecanismos de crioinjúria no espermatozoide suíno, bem como biotecnologias integradas que possam ampliar e viabilizar o uso de sêmen suíno congelado.

Criopreservação de sêmen

Descoberta em 1949 por Polge et al. (1949) a criopreservação espermática se baseia na redução

gradual da temperatura até o armazenamento do sêmen, geralmente em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ocorre que o processo de criopreservação induz várias mudanças físicas e químicas na célula espermática, que podem levar a danos mecânicos nas membranas celulares, recristalização no descongelamento e desnaturação de proteínas. Essas injúrias prejudicam, em graus variados, os parâmetros de qualidade espermática e, conseqüentemente, a capacidade fertilizante do espermatozoide.

Durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são expostos a diferentes faixas críticas de temperatura, cada uma associada a mecanismos específicos de dano celular. Na espécie suína, a faixa entre aproximadamente $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ é considerada particularmente sensível devido ao fenômeno de choque térmico (*cold shock*), que compromete a integridade estrutural da célula. Em seguida, durante a passagem por temperaturas negativas, especialmente entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorrem os principais danos associados ao congelamento, caracterizados pela formação de gelo extracelular, pelo aumento da osmolaridade do meio e pela conseqüente desidratação celular (Yeste, 2016).

Assim, a taxa de refrigeração desempenha um papel determinante na dinâmica do movimento da água através da membrana espermática. Em velocidades de resfriamento mais baixas, há tempo suficiente para a saída de água do meio intracelular, resultando em desidratação celular e na formação predominante de cristais de gelo no meio extracelular. Por outro lado, em velocidades elevadas, a água não consegue sair adequadamente da célula, permanecendo no citoplasma e favorecendo a formação de gelo intracelular, o que é altamente deletério à estrutura celular (Gao et al., 2000). Nesse contexto, a introdução e a diversificação de agentes crioprotetores, tanto intracelulares, como o glicerol, quanto extracelulares, como a gema de ovo, bem como a adição de compostos antioxidantes aos meios de criopreservação, representaram avanços importantes na mitigação dos danos induzidos pelo congelamento (Yeste, 2016; Sharafi et al., 2022).

Fisiologia espermática e consequência das injúrias causadas pela criopreservação

O espermatozoide suíno apresenta características estruturais (menor relação colesterol/fosfolípido) e bioquímicas (maior relação de ácidos graxos insaturados/saturados) que o tornam particularmente sensível à criopreservação. Essas particularidades explicam, em parte, sua sensibilidade ao choque térmico, sendo um dos principais fatores da baixa criotolerância do espermatozoide suíno.

Durante a criopreservação, os espermatozoides são expostos a uma combinação de estressores térmicos, osmóticos e oxidativos que atuam de forma sinérgica na indução de danos celulares. O estresse térmico ocorre devido à redução abrupta da temperatura, o que promove alterações na organização da membrana e na atividade enzimática. O estresse osmótico decorre das mudanças na concentração de solutos durante o congelamento e o descongelamento, levando à desidratação celular, seguida de reidratação, com variações volumétricas potencialmente letais. Já o estresse oxidativo está associado à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A interação desses estresses resulta em um cenário complexo de lesões estruturais e funcionais, comprometendo a viabilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides.

A seguir, serão discutidas as principais estruturas espermáticas afetadas pela criopreservação, bem como as estratégias para mitigar seus efeitos, com foco na preservação da funcionalidade espermática e, conseqüentemente, da fertilidade.

Membrana plasmática

Apesar de, durante o processo de espermatogênese, o espermatozoide ter perdido sua capacidade de expressão gênica, ele apresenta um elevado grau de especialização estrutural, particularmente na membrana plasmática, que contém uma diversidade de proteínas associadas às suas funções fecundantes (Briz et al., 2013). As membranas celulares não são homogêneas, podendo variar na composição lipídica, proteica e do glicocálix. A membrana plasmática do espermatozoide tem cinco domínios principais distintos, incluindo regiões específicas na cabeça, peça intermediária e na peça principal, cada uma associada a compartimentos subjacentes e envolvida em diferentes processos celulares (Briz et al., 2013; Delgado-Bermúdez, 2024). Essa compartimentalização reflete a elevada complexidade estrutural e funcional do espermatozoide.

As glicoproteínas de membrana desempenham papel fundamental na manutenção da estabilidade e da integridade da membrana plasmática, especialmente sob condições de estresse, situação que ocorre durante o processo de criopreservação (Delgado-Bermúdez, 2024). Essas moléculas estão envolvidas na proteção contra alterações osmóticas e estruturais induzidas pelos processos de congelamento e descongelamento. Glicoproteínas específicas, como as espermedesinas presentes na superfície espermática,

podem interagir com agentes crioprotetores externos, como dextrana e pentaisomaltose, contribuindo para a estabilização da membrana e, assim, para a redução dos danos criogênicos (Simonik et al., 2022).

A composição lipídica da membrana espermática em suínos apresenta características particulares, tais como baixa relação colesterol/fosfolipídios e alta relação de ácidos graxos insaturados/saturados, fatores diretamente associados à sensibilidade ao choque térmico durante a criopreservação. Os fosfolipídios constituem o principal componente estrutural da membrana plasmática espermática e desempenham um papel fundamental na sua organização e na sua funcionalidade. Na espécie suína, os principais fosfolipídios identificados incluem fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e esfingomielina (SM), distribuídos de forma assimétrica entre os folhetos da bicamada lipídica, com predominância de PC e SM na membrana externa e PE e PS na interna (Valencia et al., 2018).

Há significativa variação na composição dos ácidos graxos que compõem a membrana plasmática, podendo essa variação até mesmo ser utilizada na seleção de machos de maior criotolerância (Waterhouse et al., 2006). De acordo com análises quantitativas, a membrana plasmática dos espermatozoides suínos é altamente insaturada (Waterhouse et al., 2006). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) representam aproximadamente 50% da composição dos ácidos graxos; os saturados, cerca de 37%; e os monoinsaturados, entre 12 e 13%. Dentre os ácidos graxos saturados predominam o ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0), enquanto o principal monoinsaturado é o ácido oleico (18:1, n-9). Já entre os PUFAs, o ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5, n-6) e o ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6, n-3) destacam-se como os mais abundantes, representando 15,4 e 16,9% dos ácidos graxos totais, respectivamente. A notação estrutural (C:D, n-x) descreve o número de carbonos, o número de ligações duplas e a posição da primeira insaturação, contados a partir da extremidade ômega.

Essa composição lipídica confere elevada fluidez à membrana plasmática do espermatozoide suíno, característica essencial para a manutenção da funcionalidade espermática, incluindo motilidade, capacitação e interação com o oócito. Waterhouse et al. (2006) relataram que níveis mais elevados de DPA e DHA estão associados à maior integridade da membrana plasmática e à maior sobrevivência espermática após o congelamento e o descongelamento. Entretanto, esses mesmos ácidos graxos são alvos preferenciais das ROS, o que aumenta a suscetibilidade da membrana às alterações induzidas pelo estresse oxidativo, favorecendo a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Dessa forma, a composição dos fosfolipídios da membrana espermática suína desempenha um papel duplo na criotolerância, atuando simultaneamente como determinante da funcionalidade celular e como fator de vulnerabilidade aos danos criogênicos.

Além dos fosfolipídeos, o colesterol, principal esterol da membrana plasmática, desempenha um papel fundamental nas funções biológicas desta. No entanto, a relação molar colesterol:fosfolipídeo em suínos é relativamente baixa (0,26) quando comparada à de espécies mais criotolerantes, como bovinos (0,45) (Parks et al., 1992). Além disso, a distribuição assimétrica de colesterol na membrana contribui para alterações na manutenção da homeostase celular durante o processo de criopreservação (Delgado-Bermúdez, 2024).

A membrana plasmática é considerada o principal alvo das crioinjúrias em espermatozoides, sendo particularmente suscetível a alterações decorrentes do resfriamento. O frio induz alterações nos lipídios e nas proteínas das membranas, afetando o funcionamento dessas estruturas. À medida que a temperatura passa de 30 °C para 5 °C, a restrição do movimento lateral dos fosfolipídios aumenta e a membrana passa de uma fase cristalina líquida para uma fase gel (Yeste, 2016). Como já descrito, a membrana plasmática do espermatozoide suíno apresenta uma grande variedade de lipídios, o que resulta em diferentes temperaturas de transição de fase. Assim, alguns lipídios, geralmente os ácidos graxos saturados, tendem a gelificar mais cedo do que outros (Drobnis et al., 1993). Durante a transição da fase fluida para a fase gel, ocorrem a reorganização lipídica e a formação de domínios heterogêneos, o que compromete a integridade estrutural e a permeabilidade seletiva da membrana. Essa situação leva à desregulação do fluxo iônico e à disfunção celular podendo desencadear precocemente a capacitação espermática e a reação do acrossomo, resultando em danos irreversíveis (Delgado-Bermúdez, 2024).

Como consequência desses eventos ocorrem a saída de enzimas, íons, alterações no transporte de água, e maior entrada de crioprotetores, além do influxo de Ca^{2+} e HCO_3^- . A consequência é o desencadeamento de vias bioquímicas semelhantes às da capacitação, como a fosforilação de proteínas e o desenvolvimento de hipermotilidade, processo conhecido como criocapacitação (Valencia et al., 2018). A criocapacitação difere da capacitação fisiológica por envolver danos irreversíveis à membrana, como a perda permanente da organização lipídica, da funcionalidade proteica, do fluxo iônico desregulado e de padrões distintos de fosforilação proteica. Esses eventos comprometem a ligação do espermatozoide à zona pelúcida e a ocorrência adequada da reação acrossômica (Valencia et al., 2018).

Durante os processos de congelamento e descongelamento, os espermatozoides são expostos à redução do volume celular decorrente do fluxo de água através da membrana, devido ao meio hipertônico.

Esse processo é necessário a fim de diminuir a formação de cristais de gelo intracelular; por outro lado, contribui para alterações estruturais e funcionais da célula, comprometendo, em algum grau, a motilidade, a viabilidade e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (Sharafi et al., 2022).

Citoesqueleto

A regulação do volume celular é essencial para os espermatozoides e depende do equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelulares. Nesse processo, o citoesqueleto, especialmente os microfilamentos, são fundamentais para a resposta volumétrica, enquanto os microtúbulos desempenham papel secundário (Petrunikina et al., 2004). O citoesqueleto espermático está intimamente associado à organização estrutural da célula, especialmente na cabeça, onde a teca perinuclear (PT) constitui uma importante estrutura associada ao núcleo e à estabilidade da cromatina (Duma-Pauta et al., 2023). Essa região apresenta associação com proteínas do citoesqueleto, incluindo a actina, cuja organização é relevante para a manutenção da integridade estrutural da célula (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

A criopreservação reduz a detecção de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), um fosfolípido envolvido na organização do citoesqueleto e na geração de sinais intracelulares. Ademais, promove alterações no padrão de imunolocalização de proteínas associadas à dinâmica da actina e à sinalização celular como a gelsolina, tirosina quinase c-SRC (c-SRC) e a fosfolipase C zeta (PLC- ζ), esta última essencial para a ativação do óocito pelo espermatozoide (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

Como consequência, alterações na integridade do citoesqueleto estão diretamente relacionadas à manutenção da estrutura da cabeça espermática e da estabilidade nuclear, podendo comprometer a funcionalidade celular. Portanto, o citoesqueleto é um componente relevante na resposta espermática ao congelamento, uma vez que sua integridade está associada à preservação da estrutura e da funcionalidade dos espermatozoides.

Mitocôndrias

As mitocôndrias desempenham papel central na fisiologia espermática, envolvendo-se na produção de energia, na regulação metabólica, na sinalização celular e na homeostase de cálcio (Llavanera et al., 2024). Essas organelas concentram-se na peça intermediária, formando uma bainha mitocondrial altamente estruturada ao redor do axonema. Isso é determinante para sua estreita relação com o aparato flagelar e com a motilidade espermática (Briz et al., 2013). A motilidade espermática depende da produção de energia na forma de ATP, gerada principalmente pela fosforilação oxidativa, embora, na espécie suína, haja importante contribuição da glicólise, o que reflete uma particularidade metabólica dessa espécie. De forma complementar o ciclo do ácido tricarbóxico também contribui indiretamente para esse processo (Rodríguez-Gil et al., 2016; Du Plessis et al., 2015).

As mitocôndrias constituem a principal fonte de ROS, produzidas principalmente na cadeia transportadora de elétrons, desempenhando papel importante na regulação do estado redox celular (Peña et al., 2009). Quanto maiores os níveis de DNA mitocondrial, maior poderá ser o potencial mitocondrial; no entanto, maior será a produção de ROS o que, quando em excesso, pode reduzir a motilidade espermática e a fertilidade (Llavanera et al., 2024).

Durante a criopreservação, as mitocôndrias constituem um dos principais alvos de dano, sendo altamente sensíveis a alterações térmicas, osmóticas e oxidativas induzidas pelo congelamento e pelo descongelamento. O processo de congelamento e descongelamento da célula espermática pode levar ao aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais, à perda do potencial de membrana, ao desequilíbrio da homeostase de cálcio, ao aumento da produção de ROS e à geração de estresse oxidativo, condição em que a produção de ROS supera a capacidade antioxidante da célula. Seja na forma de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), de hidroxila ($\bullet OH$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as ROS possuem meia-vida curta (menos de 1 ms) e uma alta capacidade de reação com várias organelas e substâncias dentro da célula (Brouwers et al., 2005). Isto implica que, com o esgotamento dos antioxidantes endógenos, os níveis de oxidação passam de um estado normal para um estado causador de estresses celulares, parte deles acarretando lesões físicas nas organelas, membranas e até mesmo no DNA (Sies et al., 2017; Peña et al., 2009).

Apesar de alterações metabólicas e mudanças nos perfis bioenergéticos espermáticos terem sido descritas após a criopreservação, refletindo comprometimento da função mitocondrial, a produção de ROS também pode reduzir a motilidade, por atuar em outras estruturas espermáticas. Por exemplo, embora um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tenha sido associado à redução da motilidade espermática, esse efeito não parece ser diretamente mediado pela disfunção mitocondrial, sugerindo a

participação de outros componentes celulares nesse processo, como o citoesqueleto (Delgado-Bermúdez, 2024). O aumento do estresse oxidativo e a perda da integridade mitocondrial estão associados à liberação de fatores pró-apoptóticos e à indução de mecanismos semelhantes aos do envelhecimento celular precoce. Esse fenômeno é frequentemente observado em espermatozoides criopreservados, sugerindo que os sobreviventes após o descongelamento sofrem envelhecimento prematuro, e não apenas a criocapacitação (Peña et al., 2009).

DNA e cromatina

O estado da cromatina é crucial para a fertilidade dos espermatozoides e reflete o sucesso da espermatogênese (Lacalle et al., 2024). O DNA espermático passa por um intenso processo de reorganização estrutural durante a espermatogênese, no qual a maioria das histonas é substituída por protaminas, o que promove a compactação da cromatina e protege o material genético. Este processo é posteriormente reforçado durante a maturação epididimária pela formação de pontes dissulfeto entre protaminas, resultando em uma estrutura altamente condensada e estável (Lacalle et al., 2024). Na espécie suína, essa compactação apresenta características particulares, com elevada formação de ligações dissulfeto, o que contribui para que a cromatina permaneça extremamente condensada (Gosálvez et al., 2011).

Em humanos, a criopreservação e o tempo de armazenamento em nitrogênio líquido podem alterar diversos parâmetros espermáticos, incluindo a compactação da cromatina (Tamburrino et al., 2025). Já na espécie suína, Mateo-Otero et al. (2022) demonstraram que danos ao DNA espermático influenciam a fertilidade, indicando que quebras de fita simples (SSB) e de fita dupla (DSB) exercem efeitos distintos sobre a qualidade espermática. Embora o dano ao DNA não pareça interferir diretamente na capacidade de fertilização dos oócitos, observou-se que as SSB estão associadas ao número de embriões no sexto dia de desenvolvimento, enquanto as DSB afetam negativamente a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto.

Os efeitos da criopreservação sobre o dano ao DNA espermático em suínos ainda são variáveis. Evidências demonstram que o aumento do dano ao DNA está associado a maior peroxidação lipídica (LPO) em espermatozoides congelados e descongelados, indicando uma relação entre o estresse oxidativo e a integridade nuclear (Fraser et al., 2017). Por outro lado, o nível de dano ao DNA pode permanecer relativamente baixo após a criopreservação, não sendo influenciado por intervenções antioxidantes, como a suplementação com L-cisteína, e que o efeito individual do macho é um dos principais fatores determinantes dessa variação (Chanapiwat et al., 2010).

A variação individual impacta não apenas a fragmentação do DNA, mas também outras organelas espermáticas. Há ampla variabilidade entre machos e ejaculados quanto à resiliência ao congelamento, permitindo a classificação em “bons” e “maus congeladores” (Yeste et al., 2013). Estas diferenças estão associadas a fatores genéticos, bioquímicos e estruturais, incluindo a composição da membrana e o perfil proteico, além de outras características que têm sido investigadas na busca por marcadores dessa característica.

O que há de novo para mitigar os problemas da criopreservação?

Conforme apresentado, o processo de criopreservação altera a estrutura celular do espermatozoide como um todo. A compreensão do processo e dos efeitos da criopreservação na célula espermática é fundamental para o estudo de alternativas que minimizem as crioinjúrias e, assim, melhorem os indicadores reprodutivos no uso de sêmen suíno criopreservado. Em estudo realizado por Yeste et al. (2013), observou-se que há diferenças na criosensibilidade entre machos e mesmo entre ejaculados, fato que ocorre independentemente do valor genético e zootécnico do macho. A pergunta que permanece é: como mitigar os danos decorrentes da criopreservação e assegurar um volume maior de material genético viável, seja para a inseminação artificial, seja para a formação de um banco genético?

É importante entender os efeitos da criopreservação sobre a biologia espermática a fim de compreender como os danos ocorrem. Em suínos, o crioprotetor intracelular de eleição tem sido o glicerol, cuja concentração final, que proporciona os melhores resultados, encontra-se entre 2 e 3%. Quanto ao crioprotetor extracelular, a gema de ovo é o constituinte mais frequente, devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Assim, o diluidor mais utilizado na criopreservação de sêmen suíno é o LEYGO (do inglês *Lactose-Egg-Yolk-Glycerol-Orvus-ES-Paste*). O uso de LDL ao invés da gema foi capaz de reduzir o dano ao DNA de espermatozoides suínos durante a criopreservação e o descongelamento (Yáñez-Ortiz et al., 2021). Porém, o processo de purificação do LDL é laborioso, o que dificulta seu uso na rotina.

A substituição de LEYGO por um crioprotetor contendo 3% de glicerol e 0,25% de DMGA-PLL (3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine) demonstrou benefícios na motilidade pós-descongelamento, na taxa de blastocistos produzidos *in vitro*, além do número de leitões após IA similar ao uso de sêmen refrigerado (Jin et al., 2023).

Resultados como estes demonstram o potencial de novas abordagens e de melhorias nos diluentes para o congelamento. No processo de congelamento, o ejaculado suíno normalmente é centrifugado para remover o plasma seminal e concentrar os espermatozoides. Portanto, desde a coleta até a diluição final, os espermatozoides são expostos a meios de resfriamento e congelamento que já não possuem a riqueza de moléculas antioxidantes do plasma seminal (Gómez-Fernández et al., 2013). Ainda assim, os espermatozoides mantêm sua capacidade metabólica e a geração de ROS até atingirem a criopreservação (Delgado-Bermúdez, 2024). Isto expõe os espermatozoides aos efeitos da queda de temperatura e à própria produção de ROS (Yáñez-Ortiz et al., 2021). Portanto, o uso de antioxidantes tornou-se um ingrediente importante para combater o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica que ocorrem durante o processo de criopreservação (Hungerford et al., 2023). Os antioxidantes possuem mecanismos de ação distintos. Os antioxidantes enzimáticos, tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, atuam sobre metabólitos oxidados, transformando-os gradualmente em H₂O₂ e água; já os antioxidantes não-enzimáticos possuem outras formas de ação, diretas ou indiretas (Silva et al., 2023).

A riboflavina (vitamina B2) é uma coenzima envolvida em várias funções espermáticas. Seu uso demonstrou benefícios no potencial de membrana e na integridade do acrossomo, da membrana plasmática e do DNA, além de reduzir a peroxidação lipídica quando adicionada ao diluente de criopreservação (Dong et al., 2022). Por outro lado, compostos naturais, como mel, também apresentaram possibilidade de uso a fim de substituir detergentes, como a pasta Equex, com impacto na motilidade e na porcentagem de espermatozoides normais com acrossoma íntegro (Balogun et al., 2023).

O resveratrol é outro antioxidante não-enzimático amplamente estudado como suplemento para a preservação do sêmen suíno, embora com resultados variados (Prastiya et al., 2025). Seu uso por meio de nanopartículas foi capaz de alterar positivamente os parâmetros de cinética espermática e reduzir a peroxidação lipídica, mesmo que a motilidade total não tenha sido afetada (Soares et al., 2021).

Já o uso combinado de espermidina e fosfocreatina aumentou as taxas de viabilidade celular após o descongelamento, sendo observadas melhorias na velocidade de movimento dos espermatozoides e na atividade de antioxidantes como superóxido dismutase e glutathione peroxidase, embora os efeitos sobre a fertilidade não tenham sido avaliados (Junwei Li et al., 2018). Efeitos similares foram encontrados com o uso de L-prolina, porém maximizados na concentração de 10 mM e prejudiciais acima deste valor (Liu et al., 2023).

Outras abordagens focam na compreensão da fisiologia espermática, incluindo o uso de plasma seminal. Reguladores mitocondriais, como SIRT5 e IDH2, apresentam baixa expressão durante a criopreservação. O *knockout* desses genes reduziu os níveis de L-metionina, que, quando utilizada como suplemento durante a criopreservação de espermatozoides não editados, melhorou os parâmetros de motilidade e viabilidade (Ali et al., 2026). De forma semelhante, MitoQ, um antioxidante cuja ação se concentra na mitocôndria, atuou sobre os transportadores de glicose (GLUT3 e GLUT8), aumentando a motilidade e a cinética dos espermatozoides após o descongelamento. Também foi observado que a suplementação excessiva desregulou tais transportadores e reduziu os efeitos de MitoQ em comparação ao controle (Shi et al., 2022).

Conforme apresentado anteriormente, existem populações de animais e de ejaculados com boa ou má criopreservação. Yeste (2016) demonstrou que ejaculados de baixa criopreservação podem ser recuperados com a suplementação de plasma seminal daqueles que apresentam boa criopreservação, fato que leva à busca por marcadores de “bons congeladores” importante em diferentes raças suínas (Sui et al., 2023). Como o plasma é retirado durante o processo de criopreservação, sua suplementação ainda gera controvérsias devido à variabilidade entre machos, entre ejaculados e entre frações de cada ejaculado (Yeste et al., 2013; Jingchun Li et al., 2024; Rodriguez-Martinez et al., 2024; Andrade et al., 2022).

Alguns procedimentos podem selecionar melhores espermatozoides pré-criopreservação ou melhorar seus parâmetros pós-descongelamento. Um exemplo é o uso da migração por sedimentação gravitacional, que evita os danos físicos causados pela centrifugação em gradientes de densidade, apresentando melhora na fertilização *in vitro* com espermatozoides criopreservados (Nguyen et al., 2024). Uma alternativa peculiar é induzir o estresse oxidativo. Essa ideia surgiu de Wang et al. (2024) e demonstra que a adição de H₂O₂ ao sêmen refrigerado apresenta efeitos negativos semelhantes aos da criopreservação, podendo essa correlação ser utilizada como ferramenta para a seleção dos ejaculados a serem criopreservados (Wang et al., 2024). Também foi demonstrado que a magnetização da água utilizada nos diluidores de congelamento é capaz de enfraquecer as ligações de hidrogênio e formar cristais de gelo

menores durante a criopreservação (Lee et al., 2023). Seus efeitos sobre a viabilidade espermática e a formação de blastocistos *in vitro* foram positivos; porém, ao conhecimento dos autores, apenas um estudo foi realizado nesse sentido.

Por último, o descongelamento do sêmen também causa danos e, portanto, otimizações do meio de descongelamento são tão necessárias quanto as dos meios de congelamento. A redução dos efeitos deletérios foi observada quando o sêmen foi descongelado na presença de silimarina (Yue et al., 2023), de albumina sérica bovina (Álvarez-Rodríguez et al., 2024) e de resveratrol (Gadani et al., 2017). Dados do nosso grupo indicam que a presença de etossulfato de fenazina (PES), um receptor de elétrons, reduz os níveis de ROS no sêmen descongelado, sem afetar o potencial mitocondrial nem as taxas de motilidade espermática (Braga et al., 2025). Também há relatos de que o aumento da alcalinidade do meio de descongelamento, até pH 9, pelo uso de cafeína, possibilita maior e mais duradoura motilidade espermática após o descongelamento (de Mercado et al., 2020). Porém, conforme demonstrado por Martín-San Juan et al. (2025), alguns antioxidantes não apresentam melhoras quando utilizados no descongelamento, pelo menos em comparação aos seus próprios efeitos quando presentes no meio de criopreservação.

Uso combinado de biotecnologias reprodutivas

A integração de biotecnologias reprodutivas poderá ser o melhor caminho para a adoção do sêmen congelado na suinocultura. A inseminação artificial em tempo fixo permite sincronizar a ovulação, compensando a reduzida longevidade dos espermatozoides refrigerados. A inseminação intrauterina profunda reduz a dose de espermatozoides e pode melhorar a eficiência da fertilização. Já a inseminação laparoscópica permite a deposição direta no útero, o que pode aumentar a eficiência mesmo com doses de menor qualidade. Adicionalmente, técnicas como a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permitem o uso de sêmen criopreservado em ambientes controlados, superando as limitações ainda observadas *in vivo*.

Considerações finais

A criopreservação do sêmen suíno causa danos estruturais e funcionais às células espermáticas, o que limita seu uso em larga escala. A compreensão dos efeitos da criopreservação possibilita a busca por alternativas biotecnológicas capazes de aprimorar o processo e mitigar as crioinjúrias. Por outro lado, a integração com estratégias de mitigação e biotecnologias reprodutivas representa um caminho promissor para ampliar sua aplicação em determinados cenários do sistema de produção.

Referências

- Ali MA, Zhang Y, Yang W, Ni Q, Gao Q, Zeng C.** L-Methionine enhances cryosurvival and antioxidant activity of boar sperm. *Reproduction*, v. 171, n. 2, 5 fev. 2026. DOI: 10.1093/reprod/xaag017.
- Álvarez-Rodríguez M, Nieto-Cristobal H, Mercado E.** Bovine serum albumin inclusion in the thawing extender improves boar sperm membrane and acrosomal integrity. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, n. S3, 1 out. 2024. DOI: 10.1111/rda.14592.
- Andrade AFC, Knox, RV, Torres, MA, Pavaneli, APP.** What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective? *Animal Reproduction Science*, v. 246, p. 106946, nov. 2022. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.106946.
- Balogun KB, Nicholls G, Sokunbi OA, Stewart KR.** Cryoprotectant effects of natural honey on spermatozoa quality of pre-freezing and frozen-thawed boar semen. *Journal of Animal Science*, v. 101, 3 jan. 2023. DOI: 10.1093/jas/skac384.
- Braga JV, Camargo J, Boesing S, Silva M, Simões R, Mondadori RG, Lucia Júnior, T, Marques MG.** Estímulo da via de pentose fosfato reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio no sêmen suíno pós descongelamento. *XXVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba*, 9 maio 2025.
- Briz M, Fàbrega A.** The boar spermatozoon. In: *Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 3–47.
- Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM.** New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 458–469, 2005.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P.** The sperm DNA damage after cryopreservation of boar semen in relation to post-thawed semen qualities, antioxidant supplementation and boars effects. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, v. 40, n. 2, p. 187–193, 2010. DOI: 10.56808/2985-1130.2223.

- Delgado-Bermúdez A.** Insights into crucial molecules and protein channels involved in pig sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 1 out. 2024.
- Dong R, Luo L, Liu X, Yu G.** Effects of riboflavin on boar sperm motility, sperm quality, enzyme activity and antioxidant status during cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*, v. 8, n. 4, p. 1509–1518, 13 jul. 2022. DOI: 10.1002/vms3.833.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, v. 265, n. 4, p. 432–437, 1993. DOI: 10.1002/jez.1402650413.
- Duma-Pauta JM, Juárez-López NO, Gutiérrez-Pérez O, Córdova-Izquierdo A, Viguera-Villaseñor RM, Juárez-Mosqueda ML.** Cryopreservation, in addition to protein tyrosine phosphorylation, alters the distribution of phosphatidyl inositol bisphosphate and the localization of cytoskeletal and signaling proteins (gelsolin, tyrosine kinase c-SRC and phospholipase C- ζ) in the perinuclear theca of boar sperm. *Cryobiology*, v. 113, 1 dez. 2023. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2023.104589.
- Fraser L, Strzerek J, Wasilewska K, Pareek CS.** Sperm DNA damage in relation to lipid peroxidation following freezing-thawing of boar semen. *South African Journal of Animal Science*, v. 47, n. 2, p. 213–218, 2017. DOI: 10.4314/sajas.v47i2.13.
- Gadani B, Bucci D, Spinaci M, Tamanini C, Galeati G.** Resveratrol and epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. *Theriogenology*, v. 90, p. 88–93, mar. 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.020.
- Gao D, Critser JK.** Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, v. 41, n. 4, p. 187–196, 1 jan. 2000. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, Mercado, E. de.** Is sperm freezability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, n. 2, p. 177–182, abr. 2013. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02126.x.
- Gosalvez, J, López-Fernández, C, Fernández, J. L, Gouraud, A, Holt, W. V.** Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, n. 12, p. 951–961, dez. 2011. DOI: 10.1002/mrd.21394.
- Gutiérrez-Pérez, O, Juárez-Mosqueda, M. L, Mota, D, Trujillo, M. E.** The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology*, v. 62, n. 1, p. 32–39, fev. 2011. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2010.11.006.
- Hungerford A, Bakos HW, Aitken RJ, Martin G.** Sperm cryopreservation: current status and future developments. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 35, n. 3, p. 265–281, 2023. DOI: 10.1071/RD22219.
- Jin H, Choi W, Matsumura K, Hyon S, Gen Y, Hayashi M, Kawabata T, Ijiri M, Miyoshi K.** Improved fertility of frozen-thawed porcine spermatozoa with 3,3-dimethylglutaric anhydride poly-L-lysine as a novel cryoprotectant. *Animal Science Journal*, v. 94, n. 1, 3 jan. 2023. DOI: 10.1111/asj.13821.
- Lacalle E, Fernández-Alegre E, Gómez-Giménez B, Álvarez-Rodríguez M, Martín-Fernández B, Soriano-Úbeda C, Martínez-Pastor F.** Application of flow cytometry using advanced chromatin analyses for assessing changes in sperm structure and DNA integrity in a porcine model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 4, 1 fev. 2024. DOI: 10.3390/ijms25041953.
- Lee S, Kim YM, Cheong HT, Park CK, Lee SH.** Effect of magnetized freezing extender on membrane damages, motility, and fertility of boar sperm following cryopreservation. *Animals*, v. 13, n. 4, 1 fev. 2023. DOI: 10.3390/ani13040634.
- Li Jingchun, Wang H, Guo M, Guo Q, Li Y.** Combination of exogenous spermidine and phosphocreatine efficiently improved the quality and antioxidant capacity of cryopreserved boar sperm and reduced apoptosis-like changes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 91, n. 10, 24 out. 2024. DOI: 10.1002/mrd.70003.
- Li Junwei, Barranco I, Tvarijonavičiute A, Molina MF, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Parrilla I, Roca J.** Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, v. 107, p. 27–35, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.035.
- Liu C, Feng H, Han J, Zhou H, Yuan L, Pan H, Wang X, et al.** Effect of L-proline on sperm quality during cryopreservation of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v. 258, p. 107359, nov. 2023. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2023.107359.
- Llavanera M, Mateo-Otero Y, Viñolas-Vergés E, Bonet S, Yeste M.** Sperm function, mitochondrial activity and in vivo fertility are associated to their mitochondrial DNA content in pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.15, n.1, 1 dez. 2024. DOI: 10.1186/s40104-023-00988-0.

- Martín-San Juan A, Mercado E, Nieto-Cristóbal H, Cabero A, Silvestre MÁ, Morrell JM, Álvarez-Rodríguez M.** Protective effect of supplementation with water soluble β -carotene and α -tocopherol in boar sperm cooling-freezing extender, but not in the thawing extender. *Animal Reproduction Science*, v. 274, p. 107792, mar. 2025. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2025.107792.
- Mateo-Otero Y, Llavenera M, Recuero S, Delgado-Bermúdez A, Barranco I, Ribas-Maynou J, Yeste M.** Sperm DNA damage compromises embryo development, but not oocyte fertilisation in pigs. *Biological Research*, v. 55, n. 1, 1 dez. 2022. DOI: 10.1186/s40659-022-00386-2.
- Mercado E, Tomás-Almenar C, Gómez-Izquierdo E.** Improvement of the motility of boar sperm after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v. 222, p. 106610, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106610.
- Nguyen ST, Taniguchi M, Ono T, Takagi M, Lin Q, Torigoe N, Liu B, Namula Z, Nagahara M, Otoi T.** Quality and fertilizing ability of frozen-thawed porcine sperm separated using a migration sedimentation method. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, n. 6, 15 jun. 2024. DOI: 10.1111/rda.14648.
- Parks JE, Lynch DV.** Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 1992.
- Peña F J, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B.** Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, abr. 2009.
- Petrunkina AM, HebelM, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E.** Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction*, v. 127, n. 1, p. 105–115, 2004. DOI: 10.1530/rep.1.00047.
- Plessis SS Du, Agarwal A, Mohanty G, Linde M Van Der.** Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology*, 1 mar. 2015.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, n. 4172, p. 666–666, 15 out. 1949. DOI: 10.1038/164666a0.
- Prastiyá RA, Sardjito T, Saputro AL, Hayanti SY, Haryuni N, Sasi SM.** In vitro study of resveratrol as an antioxidant for boar semen preservation: a systematic review. *Veterinary World*, p. 85–94, 14 jan. 2025. DOI: 10.14202/vetworld.2025.85-94.
- Rodríguez-Gil JE, Bonet S.** Current knowledge on boar sperm metabolism: comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, v.85, n.1, p.4–11, 1 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.005.
- Rodríguez-Martínez H, Martínez-Serrano CA, Álvarez-Rodríguez, M, Martínez, E. A, Roca, J.** Reproductive physiology of the boar: what defines the potential fertility of an ejaculate? *Animal Reproduction Science*, v. 269, p. 107476, out. 2024. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2024.107476.
- 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*, 1 dez. 2022.
- Shi L, Zhang Y, Huang X, Shi M, Sun D, Zhang Y, Li W. et al.** Effects of mitoquinone (MitoQ) supplementation during boar semen cryopreservation on sperm quality, antioxidant status and mitochondrial proteomics. *Animal Reproduction Science*, v. 247, p. 107099, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107099.
- Sies H, Berndt C, Jones DP.** Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 2017. DOI: 10.1146/annurev-biochem.
- Silva BR, Silva JRV.** Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 1 fev. 2023.
- Simonik O, Bubenickova F, Tumova L, Frolikova M, Sur VP, Beran J, Havlikova K. et al.** Boar sperm cryopreservation improvement using semen extender modification by dextran and pentaisomaltose. *Animals*, v. 12, n. 7, 1 abr. 2022. DOI: 10.3390/ani12070868.
- Soares SL, Brito CRC, Anciuti AN, Gatti NC, Corcini CD, Varela AS, Marques MG, Fonseca FN, Komninou ER, Lucia T.** Nanocarried antioxidants in freezing extenders for boar spermatozoa. *Andrologia*, v. 53, n. 10, 14 nov. 2021. DOI: 10.1111/and.14199.
- Sui H, Sheng M, Luo H, Liu G, Meng F, Cao Z, Zhang Y.** Characterization of freezability-associated metabolites in boar semen. *Theriogenology*, v. 196, p. 88–96, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.013.
- Tamburrino L, Traini G, Ragosta ME, Dabizzi S, Vezzani S, Scarpa F, Vignozzi L, Baldi E, Marchiani S.** Semen cryopreservation and storage in liquid nitrogen: impact on chromatin compaction. *Andrology*, v. 13, n. 7, p. 1780–1796, 1 out. 2025. DOI: 10.1111/andr.13806.

Valencia J, Javier Henao F. Biological signals of sperm membrane resistance to cryoinjury in boars. In: *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. IntechOpen, 2018.

Wang S, Wu Y, Chen M. Predicting the cryotolerance of boar sperm through antioxidant stress. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, n. 4, 2 abr. 2024. DOI: 10.1111/rda.14554.

Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, v. 131, n. 5, p. 887–894, maio 2006. DOI: 10.1530/rep.1.01049.

Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904.

Yeste M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, n.1, p.47–64, 1 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047.

Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, v. 79, n. 6, p. 929–939, 1 abr. 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.008.

Yue S, Wang S, Liu X, Bian X, Ding C, Wu T, Li D, Zhou J. Ameliorative effect of silymarin on the quality of frozen–thawed boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 58, n. 2, p. 298–306, fev. 2023. DOI: 10.1111/rda.14286.
