DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2025.037

Anais da IX Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal
Londrina, PR, 12 a 14 de junho de 2025.

Estado da Arte na Criopreservação do Sêmen de Cachaços

State of the Art in Boar Semen Cryopreservation

André Furugen Cesar de Andrade[1]*, Ana Carolina Pedrosa[1], Simone Maria Massami Kitamura Martins[1,2], Guilherme Ferreira da Silva[1], Henricco Zapparoli e Silva[1], Luan Mendes de Oliveira Bezerra[1], Isadora Ribeiro de Martino[1]

[1]Núcleo de Pesquisa em Suínos – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Pirassununga, SP, Brasil
[2]Apís Serviços Veterinários, Pirassununga, SP, Brasil

Resumo

A criopreservação do sêmen de cachaços constitui uma ferramenta estratégica para programas de melhoramento genético, conservação de germoplasma e disseminação internacional de material genético. No entanto, os espermatozoides suínos apresentam alta sensibilidade ao estresse térmico e oxidativo, o que compromete a eficiência dos protocolos convencionais de congelação e descongelação. Este artigo apresenta uma revisão detalhada das etapas críticas que compõem o protocolo de criopreservação, incluindo coleta, seleção e preparo do ejaculado, uso de diluidores de refrigeração e congelação, centrifugação, holding time, tempo de equilíbrio, curvas de congelação, descongelação e ajustes pós-descongelação. São discutidos os avanços recentes no uso de aditivos antioxidantes, métodos de congelação em uma e duas etapas, e estratégias para maximizar a viabilidade e funcionalidade espermática após a descongelação. Ao consultar todas as informações já publicadas é possível identificar e indicar um protocolo de congelação do sêmen de cachaços. Este protocolo, pode ser alterado caso novas descobertas sobre a criotolerância do espermatozoide do cachaço sejam realizadas.

Palavras-chave: criotolerância, sêmen, espermatozoide, fertilidade, inseminação artificial, suíno.

Abstract

Boar semen cryopreservation represents a strategic tool for genetic improvement programs, germplasm conservation, and the international dissemination of genetic material. However, porcine spermatozoa exhibit a high susceptibility to thermal and oxidative stress, which significantly impairs the efficiency of conventional freezing and thawing protocols. This review provides a comprehensive analysis of the critical steps involved in the cryopreservation process, including semen collection, ejaculate selection and preparation, use of cooling and freezing extenders, centrifugation, holding time, equilibration period, freezing curves, thawing procedures, and post-thaw adjustments. Recent advances regarding the use of antioxidant additives, single- and two-step freezing methods, and strategies aimed at maximizing post-thaw sperm viability and functionality are discussed. Based on an extensive review of the literature, a cryopreservation protocol for boar semen is proposed. Nonetheless, this protocol may require future modifications as new insights into boar sperm cryotolerance are uncovered.

Keywords: *cryopreservation, boar semen, spermatozoa, fertility, artificial insemination, reproductive biotechnology.*

Introdução

A criopreservação do sêmen representa uma ferramenta biotecnológica fundamental na reprodução animal, sendo amplamente utilizada em programas de melhoramento genético, conservação de recursos zootécnicos e no comércio internacional de germoplasma (Knox, 2011). No entanto, entre as espécies domésticas, o suíno apresenta um dos maiores desafios em relação à tolerância ao congelamento, uma vez que os espermatozoides dessa espécie são particularmente sensíveis aos danos induzidos pelo processo de congelamento e descongelamento (Yeste, 2015).

A elevada suscetibilidade do espermatozoide suíno ao estresse térmico, osmótico e oxidativo está relacionada à composição lipídica de suas membranas (Waterhouse et al., 2006), ao conteúdo de água intracelular (Yeste, 2015) e à baixa atividade antioxidante (Li et al., 2018). Essas características tornam indispensável a adoção de protocolos refinados e multifásicos, que incluem desde a seleção do ejaculado

E-mail: * andrefc@usp.br
Recebido: 10 de abril de 2025
Aceito: 30 de abril de 2025

até estratégias específicas de diluição, centrifugação, equilíbrio térmico, congelação e descongelação (Bolarin et al., 2024; Zhang et al., 2022).

Diante da ampla variabilidade individual observada entre reprodutores quanto à resposta ao congelamento (Andrade et al., 2022), é fundamental que o processo de coleta e preparação do sêmen seja realizado com critérios rigorosos. Avaliações iniciais de qualidade espermática e testes de criotolerância permitem identificar os chamados "bons congeladores", cujos espermatozoides apresentam maior estabilidade mitocondrial, menor fragmentação de DNA e superior integridade de membranas após o processo de congelação/descongelação (Torres et al., 2021; Fraser et al., 2025).

Nos últimos anos, avanços importantes foram incorporados ao processo de criopreservação, como a utilização de diluidores de refrigeração de longa duração (Andrade et al., 2022), o estabelecimento do "holding time" a 17 °C (Torres et al., 2019), a otimização da centrifugação para remoção do plasma seminal (Carvajal et al., 2004) e a introdução de antioxidantes naturais em diluidores de congelação (Andrade et al., 2023a; Khophloiklang et al., 2024;). Essas estratégias têm contribuído para mitigar os efeitos deletérios da congelação e ampliar as taxas de viabilidade espermática pós-descongelação (Andrade et al., 2023b).

Adicionalmente, estudos recentes têm explorado o impacto de diferentes curvas de congelamento, protocolos de uma ou duas etapas e metodologias de descongelação sobre a funcionalidade espermática (Monteiro et al., 2022). A individualização desses parâmetros de acordo com o perfil do ejaculado tem se mostrado uma abordagem promissora para identificar os limites impostos pela fisiologia espermática suína, melhorando os índices de fertilização *in vitro* e os resultados em inseminação artificial (Shepherd et al., 2022).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo reunir e discutir criticamente o estado da arte sobre a criopreservação do sêmen de cachaços, abordando de forma integrada as etapas que compõem esse processo. Serão explorados os avanços recentes e os fatores determinantes para a manutenção da qualidade espermática, fornecendo subsídios técnicos e científicos que permitam o aprimoramento dos protocolos existentes e a adoção de práticas mais eficazes na rotina de centrais de inseminação e bancos de germoplasma.

Coleta e Qualidade Inicial do Sêmen

A coleta de sêmen em suínos pode ser realizada por diferentes métodos, sendo a técnica da "mão enluvada" a mais amplamente empregada em centrais de inseminação. Essa técnica consiste na simulação do reflexo da cópula por meio da manipulação manual do pênis do animal, geralmente sobre um manequim, até a emissão do sêmen. Durante a ejaculação, o sêmen é depositado em um copo coletor com sistema de filtragem que separa a fração gelatinosa, sendo coletada apenas a fração espermática rica. O procedimento deve ocorrer em ambiente limpo, com cuidados rigorosos de higiene para evitar contaminações que comprometam a qualidade do ejaculado (Sevilla et al., 2023; Goldberg et al., 2013).

Além do método tradicional, sistemas semiautomatizados vêm sendo utilizados com maior frequência. Nesses, o pênis do animal é introduzido em uma cérvix artificial acoplada a um sistema de coleta, o que diminui a manipulação humana e os riscos de contaminação. Estudos demonstram que ajustes na fixação do pênis, como o método proposto por Paschoal et al. (2021), que combina fixação manual seguida de inserção na cérvix artificial, resultam em menores índices de contaminação microbiana. Esses cuidados são particularmente relevantes considerando que a contaminação bacteriana pode interferir na qualidade do sêmen e impactar negativamente na viabilidade espermática, sobretudo em protocolos que envolvem armazenamento prolongado, como a criopreservação (Rodriguez et al., 2017; Paschoal et al., 2021).

No contexto da criopreservação espermática, a coleta de sêmen deve seguir padrões ainda mais rigorosos, uma vez que a qualidade inicial do ejaculado é um dos principais determinantes da sobrevivência dos espermatozoides ao processo de congelação e descongelação. Reprodutores suínos utilizados para essa finalidade devem ser previamente avaliados quanto à sua capacidade de criotolerância espermática, pois há alta variabilidade entre indivíduos, sendo alguns animais ou ejaculados classificados como "bons congeladores" (Bolarin et al., 2024). Tal avaliação pode incluir testes *in vitro* e a análise de componentes do plasma seminal e do espermatozoide, que influenciam diretamente na resposta destas células ao estresse térmico e oxidativo durante a criopreservação (Bolarin et al., 2024; Hernandez et al., 2007; Torres et al., 2021).

Durante a coleta para criopreservação, é essencial que o sêmen seja obtido com o menor grau possível de contaminação. Para isso, deve-se realizar uma adequada higienização do prepúcio antes da coleta e utilizar materiais estéreis e descartáveis. Além disso, a fração do ejaculado utilizada é preferencialmente a fração rica, que contém maior concentração e qualidade espermática, evitando a fração

gelatinosa e a fração final, rica em secreções prostáticas, que podem interferir negativamente no congelamento (Rodriguez et al., 2017; Goldberg et al., 2013). Sendo assim, a coleta para criopreservação deve considerar não apenas a qualidade do sêmen, mas também aspectos sanitários e de biossegurança. O uso do sêmen criopreservado permite a realização de exames sanitários nas amostras criopreservadas, reduzindo o risco de transmissão de agentes infecciosos, o que é crucial para programas de conservação genética e comércio internacional de germoplasma (Maes et al., 2016; Bolarin et al., 2024).

Holding Time

O holding time (HT) é uma etapa essencial nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno, definida como o período em que o ejaculado, após ser acrescido de diluidor de refrigeração, é mantido a 17 °C antes da centrifugação. Durante esse intervalo, que atualmente é indicado 24 horas, ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas fundamentais para aumentar a resistência dos espermatozoides ao estresse térmico e osmótico provocado pelo congelamento (Torres et al., 2019; Schäfer et al., 2017).

Estudos demonstraram que o HT permite uma interação prolongada entre os espermatozoides e os componentes do plasma seminal, promovendo adaptações importantes na membrana plasmática e no metabolismo celular. Essa interação é responsável por promover maior integridade das membranas e motilidade pós-descongelação (Torres et al., 2019). Além disso, evidências no metabolismo espermático revelam que o HT de 24 horas promove a ativação de vias bioenergéticas específicas, como as relacionadas à creatina fosfato, niacinamida e cadeia transportadora de elétrons, associadas ao aumento da criotolerância dos espermatozoides (Torres et al., 2021).

Na prática, o sêmen é coletado, diluído em meio como BTS (Beltsville Thawing Solution) ou em meios comerciais mais complexos (Andrade et al., 2022; Andrade et al., 2023) e mantido a 17 °C por 24 horas. Esse intervalo tem efeito estabilizante, permitindo o remodelamento das membranas celulares e a reorganização de proteínas e lipídios essenciais à tolerância ao congelamento (Torres et al., 2021; Hofer et al., 2020).

Contudo, o efeito do HT não é uniforme entre ejaculados. Torres et al. (2021) demonstraram que apenas espermatozoides classificados como “bons congeladores” apresentam mudanças metabólicas benéficas durante o HT. Esses animais mostraram redução de compostos oxidantes e maior ativação de vias energéticas antioxidantes. Por outro lado, em ejaculados com baixa tolerância ao congelamento, o HT promoveu acúmulo de metabólitos associados ao estresse oxidativo, como derivados de arginina e prolina. O tempo ideal de HT tem sido alvo de estudos experimentais. Torres et al. (2019) compararam diferentes durações (0, 4, 8, 12, 24, 28 e 32 h) e identificaram que o período de 24 horas promoveu os melhores resultados em termos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade das membranas plasmática e acrossomal. Esse tempo é hoje amplamente adotado em protocolos simplificados de criopreservação de sêmen suíno.

Ainda que o HT promova benefícios claros, sua extensão além de 24 horas pode comprometer a qualidade espermática (Torres et al., 2019). Schäfer et al. (2017) observaram que a extensão do HT para 44 horas, especialmente após transporte, reduziu significativamente a motilidade e o vigor espermático, provavelmente devido à exposição prolongada a microagitações, variações térmicas e ao próprio estresse de estocagem.

Deste modo, o holding time de 24 horas a 17 °C é considerado uma etapa essencial nos protocolos de criopreservação espermática em suínos, promovendo alterações bioquímicas que aumentam a tolerância dos espermatozoides à congelação. Essa prática deve ser rigidamente padronizada quanto à temperatura, tempo e qualidade do diluidor utilizado, garantindo melhores taxas de viabilidade pós-descongelação (Torres et al., 2021; Torres et al., 2019; Schäfer et al., 2017; Hofer et al., 2020).

Remoção do Plasma Seminal por Centrifugação

A centrifugação é uma etapa crítica no processamento do sêmen suíno para criopreservação (realizada após o HT), sendo empregada para remover o plasma seminal e concentrar os espermatozoides antes da adição do diluidor de congelamento. Essa remoção é fundamental, uma vez que componentes do plasma seminal podem interferir negativamente no congelamento, promovendo danos oxidativos e prejudicando a integridade espermática (Torres et al., 2016). Além disso, a centrifugação permite ajustar a concentração celular de forma padronizada, otimizando a eficácia dos crioprotetores na etapa seguinte do protocolo (Andrade et al., 2023a).

Contudo, esse processo também apresenta riscos, pois o estresse mecânico imposto pela centrifugação pode afetar a viabilidade espermática. Carvajal et al. (2004) compararam diferentes regimes

de centrifugação e demonstraram que a utilização de forças centrífugas mais elevadas por períodos mais curtos, como 2400 × g por 3 minutos, resultou em melhores taxas de recuperação espermática e preservação da motilidade e integridade do acrossomo após a descongelação, quando comparado a regimes convencionais como 800 × g por 10 minutos. Esses achados indicam que a otimização do protocolo de centrifugação é fundamental para evitar perdas celulares durante o preparo para a criopreservação. Além da força centrífuga e do tempo, o número de lavagens e o tipo de diluidor utilizado também impactam a eficiência do processo. A centrifugação inadequada pode provocar alterações nas membranas, disfunção mitocondrial e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), comprometendo a fertilidade espermática mesmo em células com aparência morfológica preservada (Carvajal et al., 2004).

Em protocolos experimentais recentes, como o descrito por Shepherd et al. (2022), observou-se a opção por não realizar a centrifugação em alguns testes para evitar interferências no modelo padronizado proposto. Contudo, os próprios autores reconhecem que a ausência dessa etapa pode resultar na manutenção de fatores deletérios presentes no plasma seminal, o que compromete a consistência da resposta ao congelamento. Além disso, Andrade et al. (2023) reforçam que a centrifugação para remoção do plasma seminal é considerada uma etapa obrigatória nos protocolos de criopreservação em suínos. Evidências mostram que a retirada do plasma seminal melhora a tolerância à congelação, embora a adição controlada de frações específicas de plasma seminal, especialmente após a descongelação, possa potencializar a fertilidade e a funcionalidade dos espermatozoides, dependendo da origem do ejaculado e das características do cachaço.

Deste modo, a centrifugação representa um equilíbrio entre remoção eficaz de componentes potencialmente deletérios e a preservação da integridade do espermatozoide. Sua realização de forma otimizada, com protocolos adaptados ao tipo de ejaculado e ao perfil do reprodutor, é essencial para garantir a qualidade do sêmen criopreservado.

Adição dos Diluidores de Congelação

Os diluidores de criopreservação de sêmen suíno têm como principal função proteger os espermatozoides contra os danos físicos e bioquímicos causados pelas baixas temperaturas, principalmente durante o processo de congelação e descongelação. Esses diluidores, também conhecidos como diluidores de congelação, devem garantir a estabilização das membranas celulares, prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares e reduzir o estresse oxidativo, mantendo a funcionalidade espermática após o descongelamento (Yeste, 2015).

A formulação clássica envolve o uso de uma base com açucares (lactose e glicose como fonte de energia), gema de ovo como fonte de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), glicerol como crioprotetor permeável, e detergentes como Equex-STM (sodium dodecyl sulfate, SDS) que atuam como crioprotetores não permeáveis. O sistema LEYGO (lactose + gema de ovo + glicerol + Equex) representa um dos principais exemplos dessa abordagem tradicional e segue sendo referência em protocolos de duas etapas (Yeste, 2015; Knox et al., 2015).

Diluidores comerciais modernos têm incorporado avanços tecnológicos importantes. Estudo conduzido por Andrade et al. (2022) comparou os diluidores Minitube Cryoguard e Androstar® CryoPlus, observando que o primeiro proporcionou melhores resultados em motilidade progressiva e integridade de membranas plasmática e acrossomal após a descongelação, principalmente quando utilizado em conjunto com seu diluidor de descongelação correspondente.

Mais recentemente, novas substâncias com propriedades antioxidantes vêm sendo testadas como aditivos nos diluidores de congelação. Entre elas, destaca-se a ε-polilisina carboxilada (CPLL), que, segundo Zhang et al. (2022), quando adicionada a 0,25% no diluidor de congelação, melhorou significativamente a motilidade, integridade da membrana mitocondrial e reduziu a apoptose espermática pós-descongelação.

Outros aditivos naturais também têm sido estudados. A incorporação de mel natural aos diluidores clássicos, como o LEY ou Androhep CryoGuard, tem mostrado potencial para substituir detergentes como o Equex, com resultados positivos na integridade acrossomal e na motilidade espermática (Balogun et al., 2023). Da mesma forma, antioxidantes como β-caroteno, α-tocoferol, melatonina e BHT, quando adicionados ao diluidor de congelação, aumentaram a estabilidade celular e reduziram danos por peroxidação lipídica (Juan et al., 2025; Pezo et al., 2021a). Já o uso de myo-inositol, outro composto antioxidante, demonstrou preservar o potencial mitocondrial e melhorar a motilidade progressiva dos espermatozoides pós-descongelação (Osman et al., 2023).

Além da composição, a eficácia dos diluidores também está relacionada ao perfil de criotolerância do ejaculado e à correta padronização dos protocolos. As respostas variam entre indivíduos, o que reforça

a necessidade de avaliação prévia dos reprodutores quanto à sua capacidade de congelamento (Knox et al., 2015; Andrade et al., 2022).

Assim, os diluidores de criopreservação vêm sendo continuamente aprimorados, passando de formulações básicas para sistemas complexos que incorporam antioxidantes naturais, crioprotetores (penetrantes e não penetrantes) mais eficientes (Pezo et. al., 2020) e estratégias que buscam otimizar a preservação da fertilidade espermática após a descongelação.

Métodos de Congelação (One e Two-steps)

Os protocolos de congelação do sêmen suíno podem ser classificados, principalmente, em dois tipos: o protocolo em uma etapa (one-step) e o protocolo em duas etapas (two-step), sendo este último o mais amplamente adotado em centrais de criopreservação. Ambos os métodos visam minimizar os danos celulares causados pelo estresse térmico, osmótico e mecânico característicos da congelação, mas se diferenciam na forma como os crioprotetores penetrantes são incorporados ao sêmen (Monteiro et al., 2022; Yeste, 2015).

No protocolo em duas etapas, os espermatozoides são inicialmente diluídos em um diluidor isento de crioprotetores penetrantes e refrigerado gradualmente até cerca de 5 °C. Após essa fase de adaptação térmica, adiciona-se uma segunda fração contendo agentes crioprotetores penetrantes, como o glicerol e a metilformamida, que são menos tóxicos em temperaturas mais baixas. Essa abordagem reduz os danos às membranas celulares e favorece a preservação da integridade acrossomal, mitocondrial e do DNA espermático após a descongelação (Monteiro et al., 2022; Yáñez-Ortiz et al., 2022).

Por outro lado, o protocolo em uma etapa propõe a adição direta dos crioprotetores ao sêmen a 17 °C, evitando a necessidade de fracionamento e refrigeração prévia. Embora operacionalmente mais simples e econômico, esse método pode expor os espermatozoides a maior toxicidade, especialmente em protocolos que utilizam glicerol em altas concentrações. Estudos indicam que o protocolo em duas etapas proporciona melhores resultados quanto à motilidade, integridade das membranas e potencial mitocondrial após a descongelação (Monteiro et al., 2022; Shepherd et al., 2022).

Sendo assim, o protocolo em duas etapas permanece como o padrão de referência para a técnica de criopreservação do sêmen suíno.

Refrigeração de 17ºC até 5º C e Tempo de Equilíbrio

Durante a criopreservação do sêmen suíno, a etapa de refrigeração dos 17 ºC até 5 °C e o tempo de equilíbrio são fundamentais para a adaptação dos espermatozoides às condições osmóticas e térmicas do meio de congelação. Essa fase antecede a adição final de crioprotetores como o glicerol e permite que as células reajam aos componentes do diluidor, estabilizando suas membranas e aumentando a tolerância à congelação (Passarelli et al., 2020; Schäfer et al., 2017).

A temperatura de 5 °C é amplamente adotada como padrão para ocorrer a adição da fração B do diluidor de congelação (Pezo et al., 2021; Andrade et al., 2022; Andrade et al., 2023), fração a qual contém o crioprotetor penetrante (Glicerol 6% v.v.). Esta temperatura proporciona uma temperatura segura, na qual tanto o crioprotetor penetrante quanto a água sejam transportados pelas membranas espermáticas sem induzir lesões severas aos espermatozoides (Woelders, 1997; Watson 2000).

Ao atingir 5 ºC (a queda de 17 ºC à 5 ºC leva em torno de 60 min/-0,2 ºC/min) é recomendado que deixar o sêmen à 5 ºC por um determinado tempo. Esta etapa é chamada “Tempo de Equilíbrio”. O tempo de equilíbrio ideal é variável entre as espécies, mas estudos apontam que o período de 2 a 4 horas de exposição a 5 °C é suficiente para promover os efeitos desejados sobre a célula espermática de suínos, sem provocar toxicidade adicional. Passarelli et al. (2020) demonstraram que o tempo de 2 horas foi o mais eficiente na preservação da integridade da membrana e do acrossomo em ejaculados com baixa e alta capacidade de congelamento, superando os resultados obtidos com 0 ou 4 horas de exposição. Além disso, observou-se menor desordem lipídica da membrana em espermatozoides equilibrados por 2 horas, reforçando o benefício funcional desse período.

Resultados semelhantes foram obtidos por Schäfer et al. (2017), que compararam equilíbrios de 2, 4, 24 e 48 horas a 5 °C e identificaram que o tempo de 4 horas apresentou os melhores valores de motilidade e frequência de batimento da cauda (BCF), enquanto a exposição prolongada por 48 horas comprometeu a motilidade pós-descongelamento. Esses dados sugerem que equilíbrios curtos, mas suficientes, são mais indicados para preservar a qualidade espermática. Adicionalmente, Yi et al. (2002) também observaram que a motilidade espermática pós-descongelação aumentava gradualmente com o tempo de equilíbrio, alcançando seu pico entre 2 e 4 horas. O mesmo estudo demonstrou que o uso de concentrações adequadas

de glicerol durante essa fase (entre 2% e 4%) é essencial para a manutenção da integridade acrossomal, com a ressalva de que a exposição prolongada ao glicerol pode ser deletéria.

Já Almlid e Johnson (1988) mostraram que o tempo de exposição ao glicerol variando entre 0,5 a 75 minutos não teve impacto significativo na viabilidade espermática pós-descongelação. No entanto, destacaram que a adição do glicerol a 5 °C – e não a temperaturas mais elevadas – resulta em melhor preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática.

Portanto, a refrigeração a 5 °C e o tempo de equilíbrio são etapas essenciais para o sucesso da criopreservação espermática em suínos. O equilíbrio de 2 a 4 horas a essa temperatura, especialmente em meio isento de glicerol, proporciona condições favoráveis à adaptação celular antes da exposição ao crioprotetor e ao congelamento propriamente dito, otimizando a viabilidade e a funcionalidade espermática pós-descongelação.

Passado o tempo de equilíbrio, deve-se adicionar a fração B com o crioprotetor penetrante, homogeneizar bem a amostra e proceder o envase das palhetas (Andrade et al., 2023c).

Curvas de Congelação

As curvas de congelação são fundamentais no processo de criopreservação espermática, pois determinam como a célula espermática será exposta à queda de temperatura até atingir os -196 °C do nitrogênio líquido. A taxa de refrigeração e os pontos de inflexão dessa curva influenciam diretamente a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, o equilíbrio osmótico e, consequentemente, a sobrevivência dos espermatozoides após a descongelação (Kumar et al., 2003; Shiomi et al., 2015).

De maneira geral, a curva mais utilizada para o sêmen suíno é aquela em duas etapas: uma refrigeração controlada até cerca de 5 °C (como descrito no tópico anterior), seguido da congelação propriamente dita. Nesta segunda fase, após a adição de crioprotetores como o glicerol, as amostras são submetidas a taxas rápidas de queda térmica que variam de -100 até -3 °C/min (Knox et al., 2015; Andrade et al., 2023c). O congelamento pode ser realizado com equipamentos automatizados ou em vapor de nitrogênio, sendo o controle preciso da curva um fator determinante para a qualidade final do sêmen (Monteiro et al., 2022; Andrade et al., 2023).

Estudos clássicos como o de Bwanga et al. (1991) mostraram que curvas com velocidade inicial de -3 °C/min até -6 °C, seguidas de platô de 1 minuto (para permitir a nucleação) e posterior queda rápida a -100 °C em -20 °C/min, resultaram em melhores taxas de motilidade e integridade acrossomal, especialmente quando utilizados recipientes menores como mini-palhetas. Esses achados reforçam a importância de controlar a velocidade de formação do gelo e o tempo de permanência no ponto de transição de fase da água.

Kumar et al. (2003) complementaram essa evidência ao mostrar que congeladores com controle direto sobre a temperatura interna da palheta (em contraste com o controle do ambiente externo) aumentaram a motilidade e a integridade espermática após o descongelamento. Além disso, observaram que a curva de resfriamento ideal para espermatozoides suínos envolve velocidades entre -20 °C/min e -40 °C/min após a indução do ponto de gelo, evitando tanto o superaquecimento quanto o super-resfriamento celular.

Shiomi et al. (2015) destacaram que curvas automatizadas, com taxas de -6 °C/min até -5 °C, seguidas de -40 °C/min até -80 °C e -70 °C/min até -100 °C, promovem melhores resultados do que curvas convencionais, justamente por reduzirem o estresse osmótico e a formação de gelo intracelular. Essas curvas favorecem uma melhor adaptação osmótica dos espermatozoides durante o congelamento, reduzindo danos estruturais nas organelas espermáticas.

Complementarmente, Almlid et al. (1988) padronizaram uma curva com um platô breve em -60 °C por 1 minuto, seguida de resfriamento a -20 °C/min até -130 °C, antes da imersão em nitrogênio líquido. Esse protocolo demonstrou ser altamente reprodutível e eficiente, especialmente quando os palitos foram posicionados em racks que assegurassem homogeneidade térmica entre as amostras.

Por fim, Andrade et al. (2023b) ressaltam que a combinação entre centrifugação, equilíbrio a 5 °C, adição de crioprotetores e curvas de congelação controladas são determinantes para a viabilidade do sêmen pós-descongelação. A abordagem integrada de cada etapa, especialmente da curva de refrigeração é o que garante a manutenção da funcionalidade espermática.

Descongelação e Preparação da Dose Inseminante

A etapa de descongelação representa um momento crítico no protocolo de criopreservação espermática em suínos, marcando a transição dos espermatozoides do estado metabólico inativo para um

ambiente reativado, sujeito a variações térmicas e osmóticas que podem comprometer sua viabilidade. A reativação rápida pode desencadear estresse oxidativo, perda de motilidade, desorganização do acrossomo e ruptura da membrana plasmática (Pezo et al., 2021; Gadani et al., 2017).

Para minimizar esses danos, é essencial realizar a descongelação em condições padronizadas. O procedimento mais amplamente recomendado para palhetas de 0,5 mL envolve a imersão em banho-maria a 50 °C por 12 a 60 segundos, dependendo da formulação do diluidor e do protocolo específico (Fraser et al., 2025; Zhang et al., 2022). Essa abordagem rápida impede a recristalização do gelo intracelular, protegendo a integridade estrutural da célula.

Imediatamente após a descongelação, realiza-se a diluição do sêmen com objetivo de ajustar a concentração espermática ao volume inseminante desejado. Esse volume, geralmente entre 1 e 3 bilhões de espermatozoides por dose, pode variar conforme a técnica utilizada (intrauterina ou convencional) e o protocolo do plantel. A diluição é feita com diluidores isotônicos aquecidos a 37–38 °C, como BTS ou Androhep, em proporções que variam de 1:3 a 1:10, permitindo o restabelecimento do equilíbrio osmótico e térmico (Andrade et al., 2022; Fraser et al., 2025).

O processo de diluição deve ser gradual, com adição lenta do diluidor ao sêmen descongelado, evitando choque osmótico e promovendo a readaptação fisiológica das células. Essa etapa também é estratégica para o preparo da dose inseminante, que será ajustada conforme o número de espermatozoides viáveis e a concentração do ejaculado (Monteiro et al., 2022).

Alguns estudos têm proposto a suplementação antioxidante do diluidor pós-descongelação, com o intuito de mitigar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio geradas durante o descongelamento. Gadani et al. (2017) demonstraram que compostos como o resveratrol (2 mM) e a epigalocatequina-3-galato (EGCG, 25–50 μM) melhoram a taxa de penetração em oócitos, mesmo sem alterar significativamente a viabilidade ou a integridade do acrossomo. De forma semelhante, Khophloiklang et al. (2024) observaram que a adição de óleo de camélia ao diluidor pós-descongelação proporcionou melhora significativa na motilidade espermática, na integridade mitocondrial e na preservação da estrutura da membrana plasmática após o descongelamento.

Além disso, a fração do ejaculado utilizada influencia diretamente os resultados pós-descongelação. Fraser et al. (2025) destacam que a fração rica em espermatozoides (SRF) apresenta desempenho superior à fração total, com maior motilidade, menor apoptose e melhor integridade funcional, tornando-se preferível para a formulação do volume inseminante em protocolos de alta exigência.

Portanto, a etapa de descongelação e diluição deve ser conduzida com rigor técnico, utilizando temperaturas e tempos padronizados, diluidores apropriados e, sempre que possível, estratégias suplementares que melhorem a resposta funcional dos espermatozoides. Essa etapa, apesar de final, é determinante para o sucesso da inseminação com sêmen criopreservado.

Considerações Finais e Perspectivas

Ao longo deste trabalho, foi possível demonstrar que a eficiência da criopreservação espermática depende de um conjunto de etapas técnicas que devem ser rigorosamente controladas, desde a coleta e diluição inicial do ejaculado até o equilíbrio térmico, escolha dos diluidores, centrifugação, protocolos de congelamento e descongelação. Cada uma dessas etapas exerce influência direta sobre a integridade funcional dos espermatozoides e sobre os resultados obtidos na inseminação artificial. Entretanto, apesar dos progressos obtidos, ainda persistem limitações importantes, como a variabilidade individual entre reprodutores, a ausência de um protocolo universalmente eficaz e a carência de padronização quanto à avaliação da funcionalidade espermática pós-descongelação. Dessa forma, é necessário que novas pesquisas aprofundem o conhecimento sobre os mecanismos moleculares associados à criotolerância, bem como o impacto de aditivos inovadores sobre a fertilidade in vivo. Perspectivas futuras incluem a aplicação de ferramentas ômicas, como metabolômica, proteômica e lipidômica, para o mapeamento de biomarcadores relacionados à resistência ao congelamento, além do uso de inteligência artificial para a predição da viabilidade espermática com base em características morfofuncionais. Essas abordagens podem ampliar a precisão na seleção de reprodutores e na escolha de protocolos individualizados.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/24690-4, 2019/15.668–3; 2022/09573-2; 2024/09891-3), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil (número da concessão 310486/2023-8) e CAPES (001).

Referências

ALMLID, T.; JOHNSON, L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and freezing method on cryopreservation of boar spermatozoa. Journal of Animal Science, v. 66, n. 1, p. 289–294, 1988.
ANDRADE, A. F. C. de et al. Importância do plasma seminal na qualidade e preservação do espermatozoide suíno. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 47, n. 3, p. 579–586, 2023a.
ANDRADE, A. F. C. de et al., Criopreservação do sêmen suíno: desafios a serem superados que auxiliam a identificação de espermatozoides mais férteis. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 47, n. 2, p. 164–170, 2023b.
ANDRADE, A. F. C. de et al. Effects of supplemental antioxidants on in vitro fertility measures for cryopreserved boar spermatozoa. Theriogenology, v. 200, p. 33-42, 2023c.
ANDRADE, A. F. C. de et al. In vitro effects of two different commercial freezing and thawing extenders on boar sperm quality. Animal Reproduction Science, v. 236, 106906, 2022.
BALOGUN, A. A. et al. Cryoprotectant effects of natural honey on spermatozoa quality of pre-freezing and frozen-thawed boar semen. Reproduction in Domestic Animals, v. 58, n. 5, p. 591–599, 2023.
BOLARIN, F. et al. Boar semen cryopreservation: State of the art, and international benchmarking for gene banking. Animal Reproduction Science, v. 257, 107343, 2024.
BWANGA, C. O. et al. Cryopreservation of boar semen. II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. Theriogenology, v. 36, n. 5, p. 879–890, 1991.
CARVAJAL, G. et al. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. Journal of Andrology, v. 25, n. 3, p. 389–396, 2004.
FRASER, L. et al. Boar-to-boar variations in quality characteristics of sperm from different ejaculates following freezing-thawing. Animals, v. 15, n. 3, 2025.
GADANI, B. R. et al. Resveratrol and epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. Cryobiology, v. 86, p. 33–38, 2017.
GOLDBERG, T. L. et al. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. Preventive Veterinary Medicine, v. 110, n. 3–4, p. 185–192, 2013.
HOFER, A. et al. Tolerance of stored boar spermatozoa to autologous seminal plasma: A proteomic and lipidomic approach. Journal of Proteomics, v. 231, 104010, 2020.
HURTADO DE LLERA, A. et al. Metformin blocks mitochondrial membrane potential and inhibits sperm motility through mitochondrial complex I inhibition in boar spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, v. 53, n. 5, p. 1111–1121, 2018.
JOFRÉ, V. H. M. et al. Antioxidant effect of a polyphenol-rich murtilla (Ugni molinae Turcz.) extract and its effect on the regulation of metabolism in refrigerated boar sperm. Animals, v. 9, n. 10, 2019.
KHOPHLOIKLANG, N. et al. Camellia oil with its rich in fatty acids enhances post-thawed boar sperm quality. Reproduction in Domestic Animals, v. 59, n. 1, p. 93–102, 2024.
KNOX, R. V. The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies. Reprod. Domest. Anim.,46:4-6, 2011.
KNOX, R. V. et al. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen–thawed boar sperm. Theriogenology, v. 84, n. 3, p. 407–412, 2015.
KUMAR, D. et al. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. Cryobiology, v. 47, n. 2, p. 318–325, 2003.
LI, J. et al. Seminal Plasma antioxidants are direct involved in boar sperm cryotolerance. Theriogenology, v. 107, p. 27-35, 2018.
MAES, D. et al. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. Theriogenology, v. 85, n. 1, p. 27–38, 2016.
MONTEIRO, M. S. et al. Impact of cryopreservation protocols (one- and two-step) on boar semen quality at 5 °C and post-thawing. Animal Reproduction Science, v. 247, 107093, 2022.
OSMAN, R. et al. Antioxidant effects of myo-inositol improve the function and fertility of cryopreserved boar semen. Antioxidants, v. 12, 1673, 2023.
PASCHOAL, A. F. L. et al. Adjusted method of penis fixation during boar semi-automatic semen collection. Reproduction in Domestic Animals, v. 56, n. 11, p. 1452–1457, 2021.
PASSARELLI, F. et al. Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. Cryobiology, v. 96, p. 77–84, 2020.
PEZO, F. et al. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: Effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. Cryobiology, v. 97, p. 5-11, 2020.

PEZO, F. et al. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. I: Protective effect of melatonin and butylhydroxytoluene on sperm function. Research in Veterinary Science, v. 136, p. 143-150, 2021a.
PEZO, F. et al. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. Antioxidants, v. 10, n. 9, 2021b.
PINART, E. et al. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: does the type of extender really matter? Reproduction in Domestic Animals, v. 50, p. 659–664, 2015.
RODRIGUEZ, A. et al. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. Theriogenology, v. 87, p. 221–228, 2017.
SCHÄFER, J. et al. Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. Reproduction in Domestic Animals, v. 52, n. 4, p. 603–610, 2017.
SEVILLA, E. et al. Are there differences between methods used for the objective estimation of boar sperm concentration and motility? Animals, v. 13, n. 1, 2023.
SHEPHERD, M. J.; HERICKHOFF, L. A. A novel experimental design for boar sperm cryopreservation. Journal of Animal Science, v. 100, n. 7, p. 1–6, 2022.
SHIOMI, M. et al. Cryopreservation of Piau-breed wild boar sperm: assessment of cooling curves and post-thawed viability. Reproduction in Domestic Animals, v. 50, n. 5, p. 821–827, 2015.
TORRES, M. A. et al. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? PLOSone, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160988
TORRES, M. A. A. et al. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. Biology of Reproduction, v. 104, n. 3, p. 640–652, 2021.
TORRES, M. A. A. et al. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. Cryobiology, v. 88, p. 8–14, 2019.
WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. Animal Reproduction Science, v. 185, p. 161–173, 2017.
WASILEWSKA, K. et al. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. Reproduction in Domestic Animals, v. 51, p. 781–788, 2016.
WATERHOUSE K. E. et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. Reproduction, v.131, p. 887-894, 2006.
YÁÑEZ-ORTIZ, I. et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Animal Reproduction Science, v. 246, 106904, 2022.
YESTE, M. Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. Reproduction in Domestic Animals, v. 50, supl. 2, p. 71–79, 2015.
YI, Y. J. et al. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. Theriogenology, v. 187, p. 17–23, 2002.
ZHANG, Q. et al. Carboxylated ε-Poly-L-Lysine supplementation of the freezing extender improves the post-thawing boar sperm quality. Cryobiology, v. 106, p. 54–61, 2022.