
IMPACTO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE ASININOS

Fernando Eiras de Barros Pinto¹

Vinicius Wagner Silva²

Myrian Megumy³

Pedro Victor de Luna Freire Oliveira⁴

Maria Isabel Mello Martins⁵

Camila Bortoliero Costa Giovannetti⁶

RESUMO

As biotecnologias de reprodução animal têm necessitado de avanços nas técnicas de criopreservação de sêmen para que os espermatozoides não sofram danos a ponto de prejudicar sobremaneira a sua capacidade de fecundação. Por isso, em inúmeras espécies animais vem sendo estudadas características espermáticas (morfologia e morfometria) do ejaculado para a busca de soluções para os efeitos prejudiciais gerados pela criopreservação. O objetivo deste estudo, portanto, é o de caracterizar parâmetros sobre a morfometria de espermatozoides ejaculados de asininos. Para isso, foram utilizados 6 asininos adultos com fertilidade comprovada. A colheita de sêmen foi realizada por meio de vagina artificial, o sêmen coletado foi diluído de acordo com a concentração do ejaculado e após as análises de concentração foi feita a criopreservação do sêmen para posterior avaliação. Por fim, as análises de morfometria foram comparadas à fresco e após a criopreservação por meio de uma câmera acoplada a um microscópio óptico. Os dados mostraram diferença estatísticas nas medidas de largura e área de cabeça, comprimento de cauda, comprimento total do espermatozoide, elipticidade e alongamento ($P < 0,001$), mas diferenças estatísticas não foram encontradas nas medidas comprimento de cabeça e peça intermediária ($P > 0,05$).

Palavras-chave: asininos; morfometria; sêmen.

ABSTRACT

Animal reproduction biotechnologies require advances in semen cryopreservation techniques so that sperm do not suffer damage to the point of greatly deficient their fertilization capacity. Therefore, sperm characteristics (morphology and morphometry) of the ejaculate have been studied in numerous animal species to search for solutions to the harmful effects generated by

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Filadélfia – UniFil, Londrina, Brasil. E-mail: feirasbp@edu.unifil.br

² Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida – LARAA-UEL, Londrina, Brasil

³ Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida – LARAA-UEL, Londrina, Brasil

⁴ Centro de Melhoramento Genético, Centro Universitário Filadélfia – UniFil, Londrina, Brasil

⁵ Docente, Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL, Londrina, Brasil

⁶ Docente do curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Filadélfia – UniFil, Londrina, Brasil.

cryopreservation. The objective of this study, therefore, is to characterize the parameters on the morphometry of spermatozoa ejaculated from donkeys. For this, 6 adult donkeys with proven fertility were used. Semen collection was carried out using an artificial vagina, the collected semen was diluted according to the concentration of the ejaculate and after concentration analysis, the semen was cryopreserved for later evaluation. Finally, morphometry analyzes were compared before and after cryopreservation using a camera attached to a specific optical device. The data showed statistical differences in measurements of head width and head area, tail length, total sperm length, ellipticity and elongation ($P < 0.001$), but no statistical differences were found in measurements of head length and mid piece length ($P > 0.05$).

Keywords: donkeys; morphometry; semen.

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre morfometria espermática têm buscado entender sobre o papel que ela assume na fertilidade dos machos, assim como discutir qual a sua relação com efeitos causados aos espermatozoides pela criopreservação. Conforme as técnicas de reprodução assistida (ART) se desenvolvem, tem-se buscado determinar quais são as melhores características espermáticas para a ART (Maroto-Morales *et al.*, 2016). Com isso, torna-se possível selecionar machos que apresentem maior proporção de um tipo relevante de espermatozoides que possam favorecer a ART e deixar mais descendentes (Maroto-Morales *et al.*, 2016). Assim, a identificação de machos que apresentem ejaculados mais adequados à criopreservação torna-se aspecto de grande importância na andrologia (Yániz *et al.*, 2015).

O procedimento de criopreservação produz efeitos danosos à membrana celular, citoesqueleto, sistema de locomoção e núcleo dos espermatozoides (García-Herreros *et al.*, 2007). Portanto, o estudo das mudanças morfológicas e morfométricas em resposta à criopreservação pode ser apresentada como uma oportunidade para que o desempenho reprodutivo dos animais seja melhorado (Maroto-Morales *et al.*, 2016). Além disso, o estudo da morfometria pode ser uma ferramenta bastante útil para revelar diferenças na congelabilidade entre ejaculados (Yániz *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo é o de caracterizar o sêmen de asininos quanto à morfometria espermática e avaliar os efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 6 jumentos da raça Pêga de fertilidade comprovada, com idades entre 5 e 15 anos. Os jumentos foram mantidos com 3,0 kg ração/dia, feno, água e sal mineral *ad libitum*. Para estabilização da reserva extra-gonadal, foram realizadas anteriormente à fase experimental, 8 colheitas seriadas em dias consecutivos.

2.2 Colheita de sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas de três ejaculados de cada um dos seis jumentos. O sêmen foi colhido com auxílio da vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu, Brasil), após estimulação dos machos pela presença de jumentas em estro. O manejo dos animais foi feito exclusivamente por veterinários capacitados e que possuem experiência prévia para a coleta. Além disso, os alunos envolvidos no projeto fizeram um treinamento anterior às coletas para o manejo e auxílio adequado. O sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e somente aqueles ejaculados que alcançaram motilidade igual ou superior a 70%, foram utilizados para o processo. Uma alíquota foi retirada para determinação da concentração espermática por meio de contagem em câmara de Neubauer.

2.3 Criopreservação do sêmen

Após a avaliação, o sêmen foi diluído em Botu-sêmen Special[®] (BS) na proporção 1:1 e mantido a 24°C, durante 10 minutos e centrifugado a 600x g por 10 minutos, na temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido com BotuCrio[®] (BC), na concentração de 200x10⁶ espermatozóides móveis/mL, e envasados em palhetas de 0,5 mL.

Após o envase as palhetas foram estabilizadas em geladeira automática digital, por 20 minutos a 5°C. Em seguida, as palhetas foram criopreservadas em sistema automatizado para congelamento de sêmen TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), a uma curva de -60°C/minuto (de 4°C a -140°C). Posteriormente, foram imersas em nitrogênio

líquido e finalmente estocadas em botijão criogênico. A descongelação foi realizada conforme Rota *et al.* (2012), em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

2.4 Análise morfométrica

Para avaliação da morfometria espermática foram analisados 100 espermatozoides de cada grupo com morfologia normal (Gago *et al.*, 1998; Hidalgo; Rodríguez; Dorado, 2006), presentes nas lâminas coradas em eosina-nigrosina. A mensuração das células espermáticas foi por meio da câmera QColor 3 Olympus, acoplada ao microscópio óptico Olympus, utilizando-se o software Olympus cellSens Standard. Por meio do software foram mensurados de maneira direta os seguintes parâmetros: comprimento de cabeça (H_L), largura de cabeça (H_W), peça intermediária (MP), comprimento de cauda (T_L) e área de cabeça (S_H). A partir dos parâmetros H_L e H_W realizou-se cálculos para atingir características derivadas das mensurações de cabeça espermática, como a elipticidade (Ellip) (comprimento de cabeça/largura de cabeça) e alongamento (Elong) ((comprimento de cabeça – largura de cabeça)/(comprimento de cabeça + largura de cabeça)) (Barbosa *et al.*, 2019; De Paz *et al.*, 2011) e pela soma de H_L , MP , T_L calculou-se o comprimento total do espermatozoide (ST_L).

4

2.5 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à sua normalidade. Como a distribuição foi não paramétrica utilizou-se o teste de Mann-Whitney, considerando o $P < 0,05$. Os resultados foram analisados no Software BioEstat 5.0.

3 RESULTADOS

Os dados quanto à morfometria do sêmen fresco e do sêmen congelado são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 — Morfometria espermática pré e pós-congelamento

Parâmetros avaliados	Sêmen fresco Mediana (1º; 3º)	Sêmen congelado Mediana (1º; 3º)	valor-P
H _L (µm)	6,08 (5,91;6,26)	6,08 (5,90;6,27)	0,6120
H _W (µm)	3,05 (2,90;3,20)	3,11 (2,97;3,25)	< 0,0001
MP (µm)	8,51 (8,21;8,86)	8,50 (8,19;8,83)	0,2455
T _L (µm)	41,39 (39,86;43,04)	40,63(39,05;42,26)	< 0,0001
S _H (µm ²)	15,15 (14,57;15,75)	15,35 (14,78;15,97)	< 0,0001
ST _L (µm)	55,90 (54,56;57,71)	55,25 (53,6;56,94)	< 0,0001
Ellip (µm)	1,99 (1,89;2,10)	1,95 (1,86;2,07)	< 0,0001
Elong (µm)	0,33 (0,31;0,36)	0,32 (0,30;0,35)	< 0,0001

Legenda: H_L - comprimento de cabeça, H_W - largura de cabeça, MP - peça intermediária, T_L - comprimento de cauda, S_H - área de cabeça, ST_L - comprimento total do espermatozoide, Ellip - elipticidade, Elong - alongamento.

Fonte: Próprio autor (2023).

A tabela mostra que houve diferenças estatísticas relacionadas a alguns parâmetros morfométricos avaliados pré e pós congelamento, dentre eles, H_W, T_L, S_H, ST_L, Ellip e Elong foram os que apresentaram tais diferenças (P<0,001). Porém, diferenças estatísticas não foram encontradas nas medidas H_L e MP (P>0,05).

5

4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi revelado que a criopreservação ocasiona alterações na morfometria espermática dos asininos. Os resultados mostraram, quanto às medidas de cabeça (H_L, H_W, S_H), que os efeitos da criopreservação não se assemelharam ao relatado na literatura para espermatozoides de touros (Gravance *et al.*, 1998), garanhões (Arruda *et al.*, 2002), cães (Rijsselaere *et al.*, 2004), bodes (Hidalgo *et al.*, 2006; Marco-Jiménez *et al.*, 2006) e cervos (Esteso *et al.*, 2006a). Tais trabalhos demonstraram que houve diferença estatística entre as três dimensões e que estas foram de menor tamanho em amostras congeladas.

De maneira geral, os trabalhos trazem como possíveis explicações para a diminuição da morfometria de cabeça a desidratação excessiva da célula associada à alterações osmóticas (Arruda *et al.*, 2002), alta proporção de espermatozoides com danos acrossomais (Rodríguez-MARTÍNEZ *et al.*, 1993) e super condensação da cromatina (Núñez-Martinez *et al.*, 2007). Porém, dados conflitantes entre estudos podem acontecer dado que diferentes efeitos nas características espermáticas após o descongelamento podem acontecer devido a alguma

sensibilidade espécie-específica ao processo de congelamento, ou ainda ao protocolo de criopreservação (Esteso *et al.*, 2006a).

Já, a redução do comprimento de cauda foi condizente com o resultado divulgado nos estudos de Rijsselaere *et al.* (2004) e Teixeira *et al.* (2022) realizado com cães. O flagelo apresenta grande fragilidade de suas estruturas internas e externas quando expostas ao processo de criopreservação (Teixeira *et al.*, 2022). Os mecanismos de desidratação e hidratação à que a célula está submetida durante as etapas de congelamento e descongelamento podem ser as causas na diminuição de dimensões morfométricas (Teixeira *et al.*, 2022). O processo de criopreservação leva a célula à uma instabilidade funcional mediada por alterações nos componentes intracelulares osmoticamente ativos, como a concentração de íons, além de mudanças na funcionalidade dos mecanismos reguladores de volume (García-Herreros *et al.*, 2007).

Quanto à elipticidade e alongamento, os dados que indicam redução significativa nas medidas desses parâmetros pós-descongelamento são reforçados pelo estudo de Urbano *et al.* (2017) realizado com cães, o qual demonstrou que a refrigeração dos espermatozoides por períodos superiores à 72 horas provoca o encolhimento nas dimensões de cabeça, inclusive Ellip e Elong. Portanto, esse encolhimento pode refletir efeitos causados pelos procedimentos de refrigeração e congelamento dos espermatozoides. Esteso *et al.* (2006b) observaram em um estudo com cervos que o formato de cabeça (Ellip e Elong) são indicativos de maior criorresistência, pois é possível que o formato influencie no volume total do espermatozoide e, assim, pode causar diferenças na troca de calor, nos movimentos de água, íons e crioprotetores entre os meios extra e intracelular, interferindo diretamente na capacidade de congelamento do esperma. Logo, são parâmetros importantes para se prever a congelabilidade de um ejaculado.

Por fim, os parâmetros de MP e ST_L foram mensurados com objetivo de criar referência de dados para futuras investigações na morfometria espermática de asininos, já que são informações que não constam na literatura.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir, portanto, que a criopreservação gera modificações na morfometria dos espermatozoides. As mudanças alteram a funcionalidade da célula, podendo revelar danos causados pelo processo de congelamento e descongelamento e indicar qual a resposta

apresentada por cada parâmetro morfométrico quando submetido ao processo de criopreservação. Além disso, resultados contrastantes na literatura podem indicar que os efeitos da criopreservação diferem conforme a espécie animal.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA R. P.; BALL B. A.; GRAVANCE C. G.; GARCIA A. R.; LIU I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v.58, p.253-256, 2002.
- BARBOSA, B. de S.; SILVA, H. V. R.; TABOSA, B. E. A.; NUNES, T. G. P.; de MAGALHÃES, F. F.; da SILVA, L. D. M. Morphological and morphometric characterization of domestic cat epididymal sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.12, p.1630-1636, 2019.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, p.104, 2013.
- ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; MONTORO, A. J.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J. J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.241–246 2006a.
- ESTESO, M. C.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; QUINTERO-MORENO, A. A.; GARDE, J. J. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. **Journal of Andrology**, v.27, n. 5, p.662-670, 2006b.
- PAZ, P.; MATA-CAMPUZANO, M.; TIZADO, E. J.; ÁLVAREZ, M.; ÁLVAREZ RODRÍGUEZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. **Theriogenology**, v.76, n.7, p.1313-1325, 2011.
- GAGO, C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; YEUNG, C. H.; TABLADO, L.; COOPER, T. G.; SOLER, C. Standardisation of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. **International Journal of Andrology**, v.21, n.3, p.169-176, 1998.
- GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F. J.; APARICIO, I. M.; SANTOS A. J.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. **International Journal of Andrology**, v.31, n.5, p.490-498, 2008.
- GRAVANCE, C. G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; CASEY, P. J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.704–709, 1998.

HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.996-1003, 2006.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J. M.; The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.61-72, 2007.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, M. A.; GOMEZ, E. A.; VICENTE, J. S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v.52, p.295–304, 2006.

MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; RÁMON, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. **Asian Journal of Andrology**, v.18, p.863-870, 2016.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J.; Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. **International Journal of Andrology**, v.30, n.3, p.182-189, 2007.

RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, HOFACK G, MAES D, KRUIF A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. **Theriogenology**. v.62, n.7, p.1292-1306, 2004.

8

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility: Supplements**, v.47, p.279–85, 1993.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI C.; CAMILO, F.; Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1846-1854, 2012.

TEIXEIRA, D. O.; SILVA, H. V. R.; BRITO, B. F.; BARBOSA, B. S.; TABOSA, B. E. A.; da SILVA, L. D. M. Sperm quality and morphometry characterization of cryopreserved canine sperm in ACP-106c or TRIS. **Animal Reproduction**, v.19, n.3, p. 1-10, 2022.

URBANO, M.; ORTIZ, I.; DORADO, J.; HIDALGO, M.; Identification of sperm morphometric subpopulations in cooled- stored canine sperm and its relation with sperm DNA integrity. **Reproduction in Domestic Animal**, v.52, n.3 p.468-476, 2017.

YÁNIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SÁNCHEZ-NADAL, J. A.; SANTOLARIA, P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, v.156, p.128-34, 2015.