

QUALIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CURVA DE RESFRIAMENTO DO SÊMEN SUÍNO UTILIZANDO *ALOE VERA* COMO CRIOPROTETOR

(Spermatic quality during the cooling curve of swine semen using aloe vera as a cryoprotector)

Ricardo TONIOLLI*; Raul Andrei de Assis DANTAS; Deborah Marrocos Sampaio VASCONCELOS; Lina Raquel Santos ARAÚJO

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

RESUMO

O sêmen congelado está associado a baixos índices produtivos. Estudos têm sido realizados para testar novos crioprotetores e avaliar momentos de estabilização durante a curva de resfriamento. Desta forma, este estudo teve como objetivo testar o *Aloe vera* como crioprotetor externo e avaliar a qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno. O sêmen de cinco reprodutores suínos foi coletado e incubado a 30 °C por quinze minutos, em seguida diluído e submetido a uma curva de resfriamento lenta, com análises, em momentos determinados, de vigor, motilidade, morfologia e funcionalidade de membrana. Foram avaliadas três diferentes concentrações de *Aloe vera* (10, 20 e 30%). Este crioprotetor foi adicionado aos diluentes de resfriamento e congelação em substituição à gema de ovo (GO), a qual foi utilizada como tratamento controle a 20%. A adição do *Aloe vera* no sêmen foi feita a 17 °C e a 5 °C. Os parâmetros seminais analisados decresceram com o abaixamento da temperatura, apresentando os piores resultados no sêmen diluído em meio contendo *Aloe vera* quando comparado ao controle contendo gema de ovo. Desta forma, concluiu-se que o extrato de *Aloe vera*, nas diferentes concentrações testadas, não apresentou efeito crioprotetor no sêmen suíno.

Palavras-chave: *Aloe vera*, curva de resfriamento, viabilidade espermática, sêmen suíno.

ABSTRACT

Frozen semen is associated with low production rates. Studies have been carried out to test new cryoprotectants and evaluate evaluating stabilization moments during the cooling curve. Thus, this study aimed to test Aloe vera as an external cryoprotectant and evaluate sperm quality during the cooling curve of swine semen. The semen of five boars was collected and incubated at 30 °C for fifteen minutes, then diluted and submitted to a slow cooling curve, with analyses, at determined times, of vigor, motility, morphology, and membrane functionality. Three different concentrations of Aloe vera (10, 20, and 30%) were evaluated. This cryoprotectant was added to the cooling and freezing diluents to replace the egg yolk (EY), which was used as a control treatment at 20%. The addition of Aloe vera in the semen was done at 17 °C and 5 °C. The analyzed semen parameters decreased with the lowering of the temperature, presenting worse results in the semen diluted in mediums containing Aloe vera when compared to the control containing egg yolk. Thus, it was concluded that the Aloe vera extract, at the different concentrations tested, did not have a cryoprotective effect on swine semen.

Keywords: *Aloe vera*, cooling curve, sperm viability, swine semen.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen suíno proporciona a conservação de ejaculados de animais de alto valor genético por tempo indeterminado, maximizando assim o poder reprodutivo do macho e permitindo o uso mesmo após a morte do animal. Ela também permite a redução de custos com manutenção de reprodutores, já que pode ser adquirido sêmen congelado com qualidade comprovada (CASTELO *et al.*, 2008).

Estudos realizados nas últimas três décadas sobre criopreservação de sêmen resultaram em avanços no tocante ao uso de diferentes crioprotetores, embalagens, diluentes e curvas de congelação (WIEBKE *et al.*, 2022). No entanto, o emprego de sêmen congelado na espécie suína ainda apresenta índices reprodutivos insatisfatórios e está associado à redução da taxa de parto e do número de leitões por leitegada (YESTE, 2017).

A diminuição da viabilidade espermática após a descongelação é uma característica bastante comum na espécie suína devido ao estresse térmico e osmótico impostos aos espermatozoides, especialmente à sua membrana plasmática. Se a congelação é lenta, há danos por excessiva desidratação da célula; no caso de ser muito rápida, os espermatozoides não perdem água suficiente, provocando a formação de cristais de gelo no citoplasma e danos irreversíveis, como a ruptura da membrana plasmática. A taxa de congelação deve ser então, suficientemente lenta para permitir a saída de água de dentro da célula por osmose, prevenindo o gelo intracelular, e suficientemente rápida para minimizar os danos pela exposição prolongada à altas concentrações de solutos (YESTE, 2017; NESCI *et al.*, 2020).

Para que o sêmen possa ser conservado, ele deve ser devidamente diluído, visando uma maior durabilidade e transporte. O diluente protege a membrana espermática contra o choque térmico e injúrias mecânicas causadas pelo transporte, além de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (VERSTEGEN *et al.*, 2005; WIEBKE *et al.*, 2022).

Na atualidade os diluentes oferecem uma boa proteção à integridade espermática em protocolos de refrigeração. Entretanto, a baixa fertilidade do sêmen congelado pode estar relacionada à composição dos diluentes, que por não ter substâncias capazes de proteger suficientemente a célula durante grandes reduções de temperatura, permitem modificações dos componentes de membrana espermática, provocando uma desestabilização, resultante de problemas na permeabilidade da mesma (SILVA, 2007).

A gema de ovo é um crioprotetor não penetrante, utilizado nos diluentes de criopreservação de sêmen. Ele tem a função de proteger os espermatozoides contra o choque térmico e lesões da membrana citoplasmática (MOUSSA *et al.*, 2002). Essa proteção se dá devido à presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que impedem o efluxo progressivo de fosfolipídios, colina e colesterol na membrana (BERGERON *et al.*, 2004).

Por outro lado, ela apresenta um potencial risco microbiológico para os espermatozoides (CRESPILO *et al.*, 2012) além de favorecer o aumento na peroxidação lipídica (FARSTAD, 2009). Na expectativa de sua substituição, diversos autores têm trabalhado visando encontrar substâncias de origem vegetal para serem utilizadas como crioprotetores (ANTUNES *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2014; MELO-MACIEL *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Estudos vem sendo desenvolvidos utilizando o *Aloe vera*, que é uma planta pertencente à família *Asphodelaceae*, e que já foi utilizado na conservação de espermatozoides refrigerados de carneiros, com bons resultados no tocante aos parâmetros cinéticos espermáticos (ANTUNES *et al.*, 2014). Vários testes já foram feitos utilizando diferentes concentrações do extrato da planta sem nenhum efeito deletério sobre os parâmetros espermáticos (BRITO *et al.*, 2014).

Pelo exposto acima, evidencia-se a necessidade de otimizar o protocolo de congelação, de modo a obter-se uma melhor viabilidade espermática na redução da temperatura até atingir 5 °C. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo testar o *Aloe vera*

(BARBOSA *et al.*, 2020), como crioprotetor externo e avaliar a qualidade espermática durante a curva de resfriamento lento do sêmen suíno.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 15 de janeiro de 2015, processo nº 7512525/2015. Foram utilizados varrões com idades entre 08 e 18 meses, em sistema rotineiro de trabalho, pertencentes ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen, da Faculdade de Veterinária, na Universidade Estadual do Ceará, e que se encontravam em sistema rotineiro de coleta semanal.

O sêmen de cinco reprodutores foi coletado uma vez por semana durante doze semanas, através da técnica da mão enluvada (HANCOCK e HOVELL, 1959) em recipiente com capacidade de 500mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta. Utilizou-se o ejaculado total de cada varrão, ou seja, o ejaculado com suas porções pobre e rica, descartando a porção gelatinosa através da utilização de gaze própria para essa finalidade.

Após a coleta, o ejaculado foi identificado e levado ao laboratório para o seu processamento. A qualidade do ejaculado foi estabelecida através do seu aspecto, temperatura, volume, concentração, total de células, vigor espermático e % de células móveis (motilidade) e a diluição do mesmo foi feita dentro da primeira meia hora após a coleta com sêmen e diluente na mesma temperatura. Os protocolos experimentais foram realizados nas dependências do LRSTS da FAVET/UECE.

O volume de sêmen foi avaliado pesando-se o ejaculado (subtraindo-se o peso do recipiente de coleta) em balança digital de precisão. A concentração espermática foi medida por espectrofotômetro. O número total de espermatozoides foi calculado multiplicando-se o valor da concentração ($\times 10^6/\text{mL}$) pelo volume do ejaculado (mL), e o resultado final expresso em $\times 10^9$ spz. Para o exame do vigor espermático (0 a 5) e da motilidade (%), uma amostra do sêmen *in natura* (puro – 15 μL) foi colocada entre lâmina e lamínula e processada a leitura com um aumento de 200 vezes em microscopia óptica. Foi avaliado, para cada característica, ao menos três campos de microscópio. Estes exames foram utilizados para a avaliação e controle de cada ejaculado durante o período experimental, sendo utilizado apenas aqueles com valores mínimos de vigor $\geq 3,5$ e de motilidade $\geq 85\%$. Para ser utilizado nos protocolos experimentais foi retirado um total de $2,5 \times 10^9$ spz/ejaculado.

Manejo nutricional dos reprodutores

Os reprodutores eram alimentados com ração de boa qualidade, com os níveis proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para a fase de reprodução (3.150 Kcal de energia metabolizável e 14% de PB). O consumo diário por reprodutor era de 2,5kg/dia, em dois arraçoamentos, enquanto a água potável era fornecida *ad libitum*.

Curva de resfriamento do sêmen

O sêmen coletado foi submetido a uma curva de resfriamento (Fig. 01). Após a coleta, o sêmen foi incubado por 15 minutos a 30 °C e diluído (diluição 1 = 3vol:1vol) no

diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS). Após a diluição o sêmen foi mantido a esta temperatura por mais 45 minutos. Em seguida, o sêmen diluído foi resfriado a 25 °C durante 30 minutos e após esse tempo, em seguida transferido para o escuro por 2 horas a 17 °C. Posteriormente, foi centrifugado a 800g/15min. a 17 °C. Após centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* (papa de espermatozoides) foi ressuspensão no diluyente de resfriamento (diluição 2 = 20% de gema de ovo e 34,23g de glicose em 100mL de água destilada / qsp – tratamento controle), que já se encontrava a 17 °C, perfazendo uma concentração inicial de 6×10^9 células/mL. Em seguida, o sêmen foi transferido para geladeira a 5 °C/60 minutos. Ao final desse tempo, foi adicionado o diluyente de congelamento (diluição 3 = volume a volume), com a mesma composição do diluyente de resfriamento acrescido do glicerol a 6% (2mL:2mL), perfazendo uma concentração final de 100×10^6 células/mL.

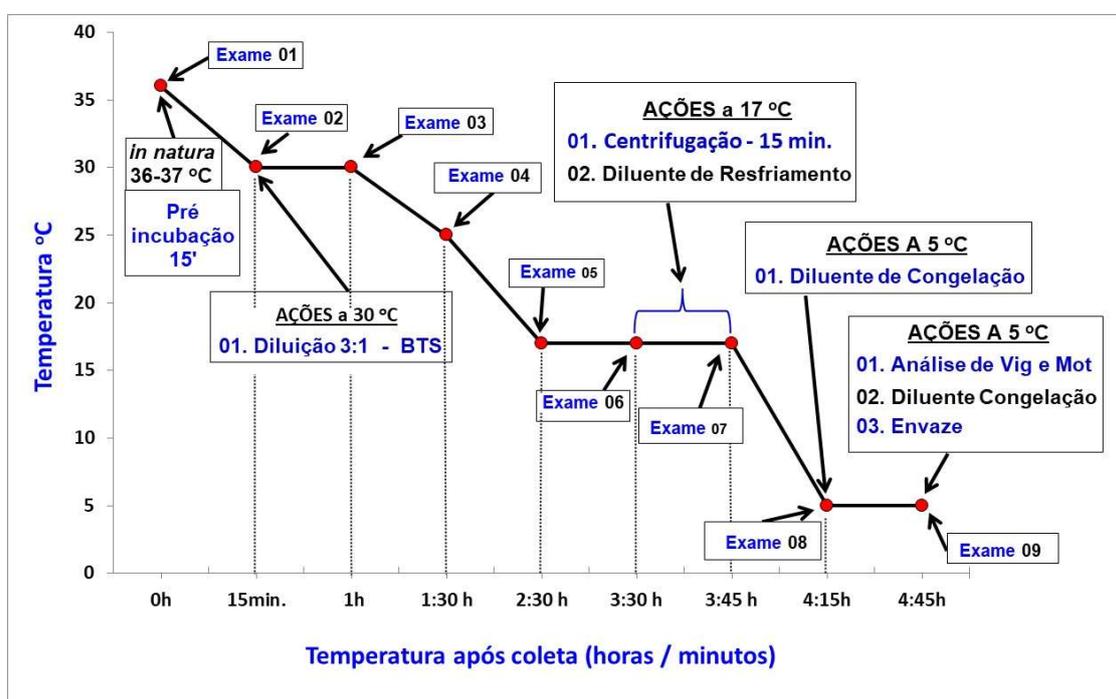


Figura 01: Curva de resfriamento do sêmen suíno com seus momentos de análises.

Utilização do *Aloe vera* na curva de resfriamento

No presente trabalho foram avaliadas três diferentes concentrações de *Aloe Vera*. Este crioprotetor foi adicionado aos diluentes de resfriamento e congelamento, em substituição à gema de ovo (GO). A concentração de 20% da GO foi utilizada como tratamento controle. Os esquemas dos tratamentos podem ser vistos na Tab. 01 a seguir:

Tabela 01: Concentrações (%) de *Aloe vera* utilizadas em substituição a gema de ovo, após a centrifugação, no protocolo congelamento (curva de resfriamento) do sêmen suíno.

Tratamento	Crioprotetor	Concentração (%)
T01 (controle)	Gema de ovo	20 [GO20]
T02	<i>Aloe vera</i>	10 [AV10]
T03	<i>Aloe vera</i>	20 [AV20]
T04	<i>Aloe vera</i>	30 [AV30]

Avaliação do vigor e da motilidade espermática durante o resfriamento

Para a avaliação da qualidade espermática, foram levadas em consideração as características de vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996) e a porcentagem de células móveis (0 a 100% - MARTIN RILLO *et al.*, 1996), com análises por 9 exames em momentos diferentes do abaixamento de temperatura. A amostra coletada durante o resfriamento, era incubada em “banho maria” a 37 °C, com leitura feita após 10 minutos de incubação. Para cada ejaculado/tratamento, eram retiradas amostras e avaliadas através da microscopia óptica, com o sêmen (15µL) colocado entre lâmina e lamínula (24x24), em um aumento de 200 vezes. Foram avaliados, para cada análise, ao menos três campos de microscópio.

Cada amostra foi avaliada durante o período de abaixamento da temperatura visando a congelamento do sêmen, sendo estas análises feitas em momentos precisos conforme descrito abaixo (exames de A1 até A9):

Exame A1 (0h): a 30 °C logo após a coleta ainda com o sêmen *in natura*;

Exame A2 (15’): a 30 °C logo após a diluição 3:1 com o BTS;

Exame A3 (1:00h): a 30 °C após o 1º período de estabilização;

Exame A4 (1:30h): a 25 °C após estabilização da temperatura;

Exame A5 (2:30h): a 17 °C após estabilização da temperatura, antes centrifugação;

Exame A6 (3:30h): a 17 °C após o 2º período de estabilização, antes a centrifugação;

Exame A7 (3:45h): a 17 °C após centrifugação + diluente resfriamento;

Exame A8 (4:00h): a 5 °C após estabilização da temperatura;

Exame A9 (4:45h): a 5 °C após 3º período estabilização, antes diluente congelamento.

Integridade acrossomal e vitalidade espermática

Exames de integridade acrossomal, vitalidade espermática, foram feitos nos seguintes momentos de análise: A1, A3, A5, A7 e A9. Em todas as análises o sêmen foi previamente reaquecido durante 10 minutos de a 37 °C, para em seguida ser analisado à luz da microscopia óptica em aumento de 200x.

Para este teste foi feito uma avaliação do acrossoma (BORTOLOZZO *et al.*, 2005) e do total de células vivas (MEDEIROS *et al.*, 2006), ambos com resultados expressos em porcentagem. Para este exame, foi utilizada uma alíquota de sêmen (15µL) e uma do corante (15µL), homogêneas e procedendo-se em seguida esfregão, no qual foi analisado um total de 200 células através da microscopia óptica com lente de imersão a um aumento de 1000x. A solução corante utilizada foi o azul de bromo-fenol (0,1g de azul de bromo-feno, 0,4g de citrato de sódio e 10mL de água destilada, 300 a 310mOsm). Segundo a morfologia do acrossoma e vitalidade, os espermatozoides foram classificados em quatro categorias: 01. Vivos com acrossoma íntegro; 02. Vivos com acrossoma danificado; 03. Mortos com acrossoma íntegro; 04. Mortos com acrossoma danificado.

Teste de resistência osmótica (TRO)

Os exames de TRO foram feitos nos seguintes momentos: exames 1, 3, 5, 7 e 9. Em todas as análises o sêmen foi previamente reaquecido durante 10 minutos de a 37 °C, para em

seguida ser analisado à luz da microscopia óptica de contraste de fase em aumento de 1000x. Este teste permite fazer a avaliação da funcionalidade da membrana do espermatozoide. Para tanto foi colocado em um tubo de ensaio 0,5mL de sêmen ressuspenso acrescido com 7,5mL de água destilada mantido por 15 minutos a 37 °C (solução A). Posteriormente, foi retirado 1mL da solução A e colocado em outro tubo de ensaio contendo 0,5mL de Formol salina a 1% (solução B). Em seguida foi retirado 15µL da solução B e colocada entre lâmina e lamínula. Foram avaliados 200sptz/lâmina (GRAHAM e MOCÉ, 2005), de acordo com a proporção de espermatozoides com cauda enrolada (reagentes) ou cauda reta (não reagentes).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso, conduzido sob um delineamento experimental inteiramente casualizado. A análise estatística foi feita através da avaliação das médias e desvios padrões, aos quais foram aplicados testes de análise de variância. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância por meio do procedimento *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (GLM do SAS 6.03) e as médias foram comparadas entre os grupos por meio dos testes de Tukey e o Teste do Qui-quadrado corrigido para valores em porcentagem. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney. Para a significância estatística foi utilizado um intervalo de confiança 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios do vigor espermático e da motilidade espermática do sêmen *in natura* (Fig. 02) dos ejaculados dos varrões usados nos experimentos foram 4,3 e 92%, respectivamente. Estes valores estão dentro dos padrões aceitos pelo CBRA (2013) para reprodutores suínos, e permitem a diluição, conservação e utilização dos ejaculados com essa qualidade na inseminação artificial. Para o experimento em questão, os ejaculados foram considerados aptos à utilização nos protocolos experimentais, uma vez que se encontrassem dentro dos padrões mínimos exigidos pela metodologia do trabalho.

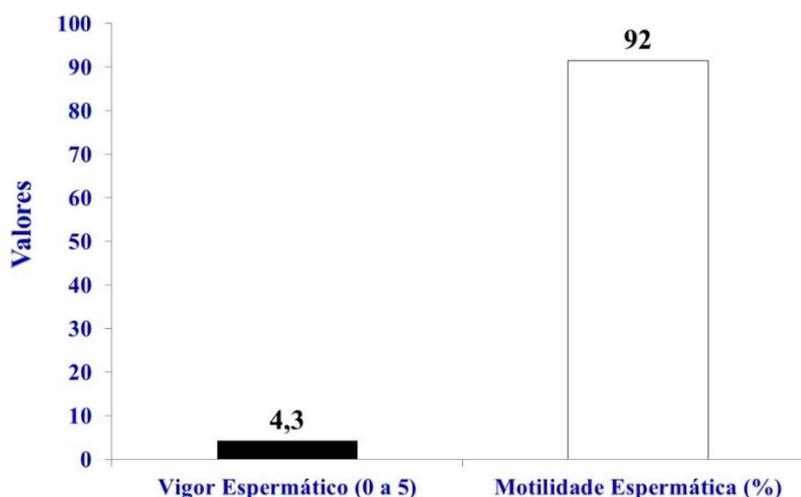


Figura 02: Vigor e motilidade espermática do sêmen *in natura*, dos ejaculados de suínos.

Os valores do vigor espermático (Fig. 03) reduziram gradativamente durante o período de abaixamento da temperatura (curva de resfriamento), após a diluição (1:3) em BTS. Uma queda dos valores já era esperada, pois durante períodos de incubação em temperaturas decrescentemente mais baixas, há uma queda concomitante do metabolismo celular, além da possibilidade, dos espermatozoides consumirem os nutrientes disponíveis no meio, excretarem produtos tóxicos, como os radicais livres, resultantes de seu próprio metabolismo, mesmo que de uma forma gradativamente menor. A redução na temperatura tem sido um efetivo método de eleição para prolongar a viabilidade dos espermatozoides ejaculados, devido ao seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares (YESTE, 2017). Entretanto, após a centrifugação a 17 °C e diluição com Gema de ovo ou *Aloe vera*, o tratamento controle apresentou um pequeno aumento do valor do vigor, seguido de uma queda posterior, entretanto, ainda ficando em patamares superiores aos dos outros tratamentos.

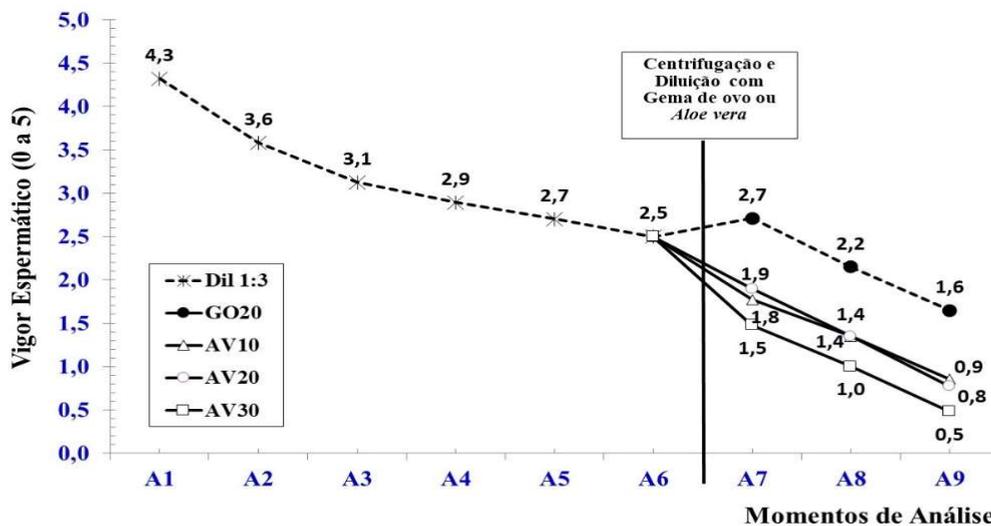


Figura 03: Vigor espermático durante a curva de resfriamento do sêmen do varrão em diferentes tratamentos após a centrifugação, visando a congelação.

Já nas amostras tratadas com o *Aloe vera*, os valores de vigor espermático sofreram uma queda contínua até o último momento de avaliação. O vigor espermático, é uma importante característica pois representa a força do movimento dos espermatozoides, o qual influencia a velocidade com que estes se deslocam (CORRÊA *et al.*, 2001). Com a centrifugação das amostras, os metabólitos presentes no meio foram retirados, melhorando assim a qualidade do ambiente para o espermatozoide, particularmente após a adição do novo diluente, gema de ovo glicose, comprovando-se essa melhoria pela análise A7, e resultados finais de vigor espermático mais altos do que os outros tratamentos.

Além disso a centrifugação do sêmen, pode atuar como uma capacitação celular induzida através da retirada do plasma seminal, e conseqüentemente, um aumento no vigor espermático. Já os tratamentos com *Aloe vera* não apresentaram um aumento do vigor espermático na espécie suína corroborando com Nunes *et al.* (2019), diferentemente do que foi relatado por diversos autores em outras espécies (BRITO *et al.*, 2014; GUTIÉRREZ *et al.*,

2006; MELO-MACIEL *et al.*, 2015; BOONKONG *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2020).

Os resultados da motilidade espermática (Fig. 04), apresentaram a mesma tendência encontrada nos padrões do vigor espermático. Foram diminuindo gradativamente ao decorrer da curva de resfriamento, tendo um ponto crítico maior, após a centrifugação e diluição com os variados tratamentos. Essa diminuição pode ser explicada pelo processo de resfriamento do sêmen, que nesta faixa de temperatura pode fazer com que os lipídeos da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996; GUIMARÃES *et al.*, 2018), induzindo com que neste ponto da curva as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenem-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, podendo causar uma rápida queda na motilidade espermática (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

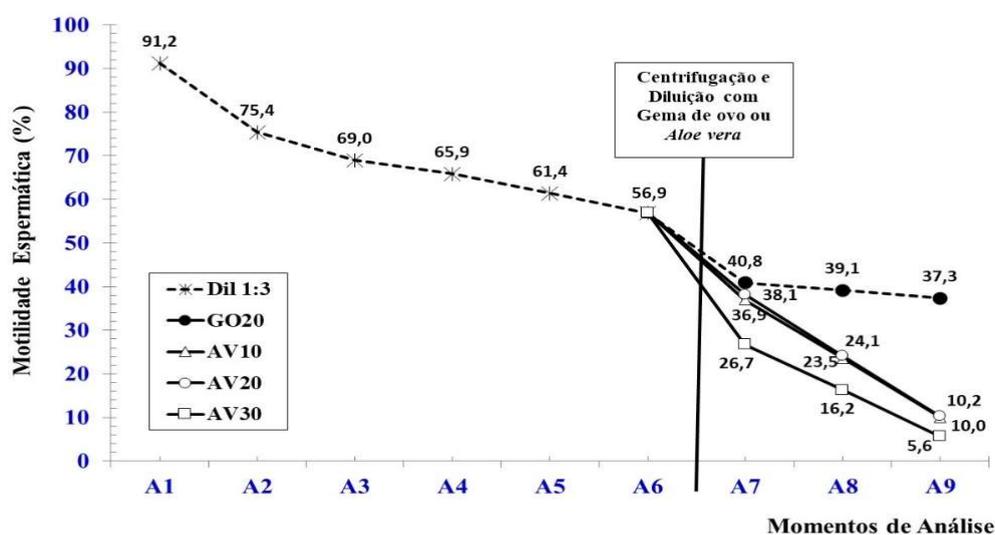


Figura 04: Motilidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen do varrão.

Além disso, o processo de peroxidação lipídica pode estar diretamente ligado a diminuição da motilidade espermática, pois nesse ponto da curva pode estar havendo uma produção excessiva de metabólitos do oxigênio, que induz extensas modificações biofísicas e bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide (BUCAK *et al.*, 2010).

As amostras diluídas em gema de ovo tiveram uma pequena diminuição, entretanto, as que foram tratadas com as diferentes concentrações de *Aloe vera*, diminuíram seus valores de forma significativa pela metade. Assim como em outros estudos (NUNES *et al.*, 2019; ARTEAGA *et al.*, 2022), o uso de *Aloe vera* como protetor de células espermáticas para criopreservação apresentou efeito limitado e pouca eficácia para a espécie suína.

Arteaga *et al.* (2022) relataram resultados satisfatórios em sêmen suíno conservado a 17 °C em diluente acrescido de 20% de *A vera*, no entanto observou diminuição drástica da motilidade pós-congelamento no primeiro dia, tanto no tratamento *Aloe vera* a 17% + 3% de glicose como no *Aloe vera* 20%, obtendo-se 0,3% e 5,3% de motilidade respectivamente, valores inadequados para fertilização. Uma possível causa para isso foi provavelmente pelo fato de que o *Aloe vera* possui consistência viscosa podendo dificultar o movimento da célula,

tornando o sêmen impróprio para o uso na Inseminação Artificial (IA), visto que é necessária uma motilidade espermática superior a 50% para o uso nos programas de IA (FIGUEIRÔA *et al.*, 2001). Melo *et al.* (2015) levantaram a hipótese de que espermatozoides diluídos com *A. vera* requerem um tempo maior para adaptação devido a essa característica mucilaginosa que o extrato da planta apresenta.

A motilidade espermática está diretamente relacionada com a fertilidade em suínos, sendo um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração do mesmo no oócito (GADEA, 2005). A queda abrupta nos parâmetros de vigor e motilidade se dá principalmente graças a característica de extrema sensibilidade do sêmen suíno às alterações de temperatura (BORTOLOZZO *et al.*, 2005), além disso durante o resfriamento, o desequilíbrio iônico intra e extracelular influenciam diretamente na redução da motilidade espermática, podendo haver também aumento do cálcio citosólico e colapso da membrana mitocondrial (JÄKEL *et al.*, 2021), assim como também a formação de radicais livres podem ocasionar queda de motilidade, vigor espermático e de integridade do DNA espermático (MELO-MACIEL *et al.*, 2015).

O percentual de espermatozoides vivos (Fig. 05) durante a curva de resfriamento foi aquém do que o normalmente encontrado na literatura, onde normalmente a vitalidade dos espermatozoides na temperatura de 17 °C se manteve entre 60 a 81 % (TONIOLLI *et al.*, 2007; SILVA e GUERRA, 2011), sendo que nestes trabalhos, mesmo com 48 horas de conservação, o percentual de espermatozoides vivos ainda estavam acima de 40 %. Em todos os passos da curva de resfriamento, seguindo o mesmo padrão de diminuição da temperatura, com pequenas alterações até 17 °C, tiveram uma variação de apenas 0,9 pontos percentuais. Após a centrifugação e diluição, os espermatozoides tratados com *Aloe vera* e gema de ovo, tiveram uma queda mais acentuada da vitalidade.

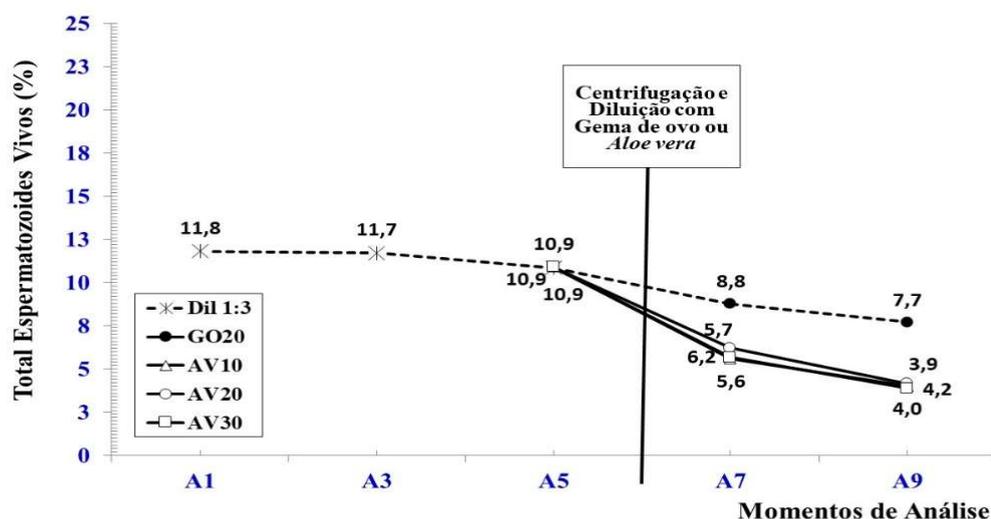


Figura 05: Total de espermatozoides vivos (%), durante a curva de resfriamento do sêmen do varrão.

Segundo Torres *et al.* (2019) o sêmen suíno não pode ser criopreservado imediatamente, ele precisa ser mantido em espera a 17 °C antes da criopreservação, pois o tempo de espera permite uma interação prolongada entre os espermatozoides e os

componentes do plasma seminal. Dessa forma, um tempo de espera de 24 horas aumentam a motilidade total e progressiva, e integridade do plasma e do acrossoma, embora não seja capaz de controlar a quantidade de ânion superóxido nem a peroxidação lipídica da membrana e não tenha efeitos sobre a fluidez da membrana.

O que chamou a atenção nesses resultados, foi o percentual de células espermáticas vivas do sêmen *in natura* foi de apenas 11,8%, o que inviabilizou uma possível utilização do sêmen em inseminação artificial. Uma queda natural na porcentagem de células vivas é explicada por alterações de pH e osmolaridade do meio, já que com o decorrer do tempo, há o consumo do substrato energético e a produção de metabólitos. A produção de radicais livres durante o período de incubação, também contribui para o decréscimo da sobrevivência espermática, uma vez que em ambiente aeróbio ou parcialmente anaeróbio a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) é inevitável (TORRES *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020; PEZO *et al.*, 2021). No presente estudo, não foi possível identificar com exatidão a causa que levou o sêmen *in natura* à essa grande queda da porcentagem de células vivas.

Com relação à integridade acrossomal (Fig. 06), os espermatozoides de suínos são mais susceptíveis a danos durante a diminuição da temperatura que os de outras espécies (WIEBKE *et al.*, 2022), provavelmente devido à composição da membrana plasmática. Como apresentado no gráfico acima, durante a curva de resfriamento, o percentual de espermatozoides com membrana íntegra foi muito baixo, tendo apresentado uma queda mais acentuada após a centrifugação e diluição a 17 °C com os diferentes tratamentos. A concentração de 30% de *Aloe vera* apresentou a menor porcentagem de acrossomas íntegros entre diferentes os tratamentos. Esses resultados foram bem inferiores aos encontrados por Nunes *et al.* (2019) pós-congelação.

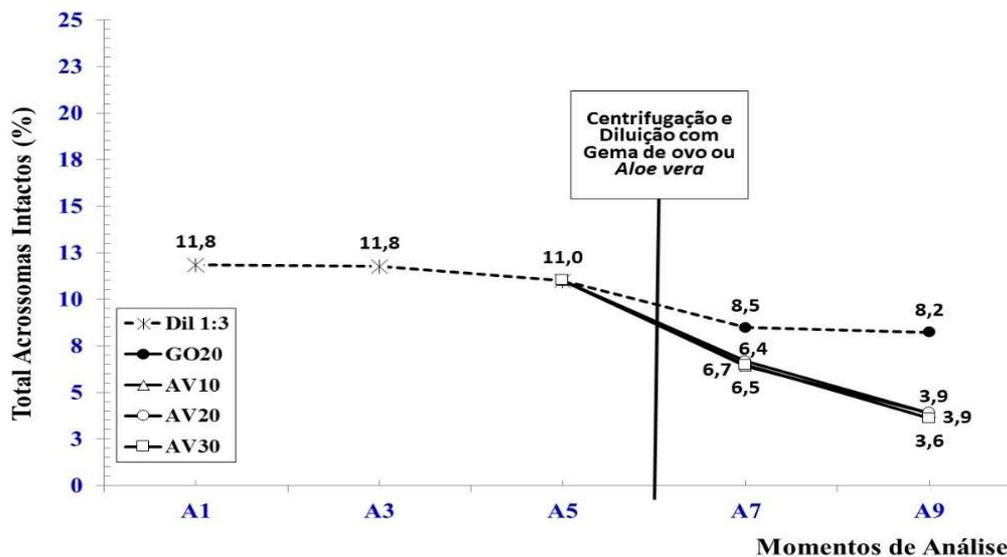


Figura 06: Total de espermatozoides com acrossoma intacto (%), durante a curva de resfriamento do sêmen do varrão.

O decréscimo no número de espermatozoides com acromossa intacto pode ter acontecido, graças a mudanças que ocorrem na composição e estrutura da membrana plasmática de espermatozoides de suínos devido ao choque térmico a 17 °C (WIEBKE *et al.*,

2022). A criopreservação promove fenômenos de translocação de fosfolipídios entre o lado externo e interno da bicamada lipídica e reação acrossômica prematura, diminuindo a viabilidade de espermatozoides criopreservados quando comparados a espermatozoides *in natura* (SILVA e GUERRA, 2011). Outra possibilidade para explicar essa queda nos valores é a relação colesterol: fosfolipídio da membrana plasmática do espermatozoide suíno, que é mais baixa (0,12) do que em bovinos (0,38) e ovinos (0,36). Essa relação pode explicar, ao menos parcialmente, a maior sensibilidade do espermatozoide suíno ao frio (WIEBKE *et al.*, 2022), fato esse que favorece uma ação mais direta do mesmo sobre a integridade espermática.

Desta forma, como a integridade da membrana espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAN, 1992), a escolha de um crioprotetor eficiente é fundamental. Seja ele intra ou extra-celular, é necessário que confira uma melhor proteção a membrana plasmática do espermatozoide, e mantenha em patamares mais altos a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro, após a sua criopreservação.

Os resultados da reatividade de membrana (Figura 07) se mostraram bem promissores nas análises A1, A3 e A5 feitas durante a curva de resfriamento, entretanto, após a centrifugação e diluição nos variados tratamentos, ocorreu uma queda mais acentuada na porcentagem total de espermatozoides reativos, indicando uma diminuição na integridade da membrana dos espermatozoides. As diferentes concentrações de *Aloe vera* apresentaram comportamento relativamente parecido entre si, caindo mais de 50% após a diluição e centrifugação a 17 °C.

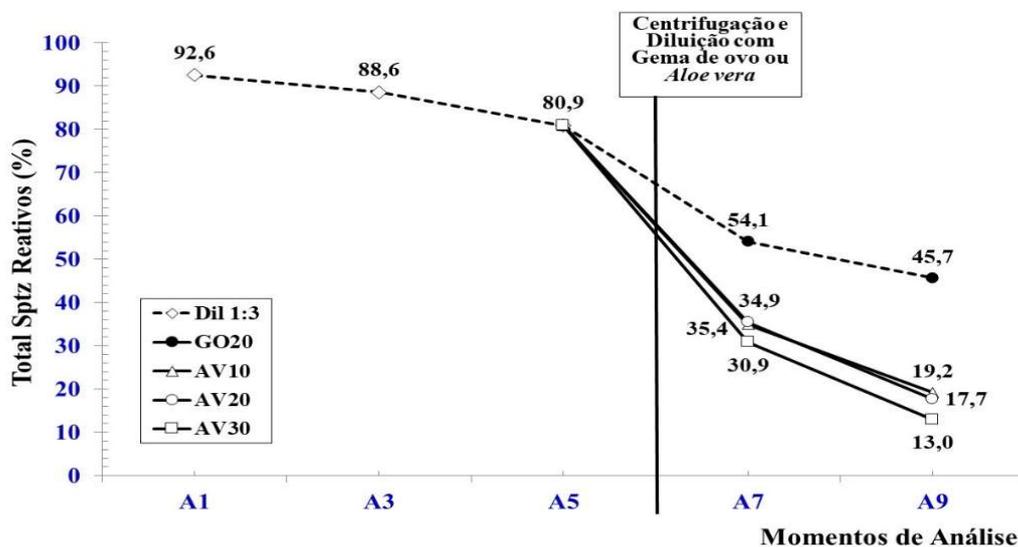


Figura 07: Total de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, durante a curva de resfriamento do sêmen do varrão.

No tratamento controle com gema de ovo, a variação dos resultados das análises na curva foi menor, provavelmente porque a inclusão do diluente de resfriamento também contribuiu para essa manutenção, protegendo o espermatozoide contra o estresse provocado pelo frio, em uma faixa de temperatura conhecidamente lesiva para o espermatozoide, abaixo dos 17 °C até os 5 °C. Jäkel *et al.* (2021) sugerem que as membranas (plasmática e

acrossômica) dos espermatozoides que sobrevivem ao estresse de resfriamento inicial a 5 °C resistem ao armazenamento de longo prazo, como é o caso do espermatozoide que passa pelo armazenamento convencional a 17 °C. A gema de ovo tem como característica apresentar em sua composição o LDL, que é uma lipoproteína de baixa densidade, que pode agregar-se à membrana plasmática durante o processo, evitando a perda de fosfolípidios da membrana e diminuindo as lesões provocadas pela ação do frio e da crioinjúria (SIEME *et al.*, 2016). Enquanto que a interação dos polissacarídeos de *A. vera* com os componentes da membrana, são pouco eficazes em protegê-los contra crioinjúrias (BARBOSA *et al.*, 2020).

Já nas amostras tratadas com as diferentes concentrações de Aloe vera, as alterações provocadas pela diminuição da temperatura, do pH e produção excessiva de compostos reativos de oxigênio, podem ter desestabilizado a estrutura fluida da membrana plasmática, ocasionando diversas alterações na sua função e integridade (JOHNSON *et al.*, 2000). Além disso, o resfriamento pode ocasionar uma produção ineficiente de ATP, graças a diminuição dos processos metabólicos, o que pode culminar na abertura de canais de cálcio na membrana plasmática do espermatozoide que vão causar posteriormente a hidrólise dos fosfolípidios de membrana e conseqüentemente alterações na sua integridade (AMANN e PICKETT, 1987).

CONCLUSÕES

Conclui-se que, na espécie suína, o extrato de *Aloe vera* não apresentou bons resultados na manutenção ou melhoria da motilidade, do vigor e da viabilidade espermática, quando adicionado como diluente de resfriamento a 17 °C. Ele não apresentou ação crioprotetora em nenhuma das concentrações empregadas neste estudo. Dessa forma, entende-se que novos estudos devem ser estruturados a fim de encontrar uma concentração ideal dessa substância em meios de conservação para utilização em protocolos de criopreservação do sêmen do varrão.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- ANTUNES, L.P.; BRITO, B.F.; RODRIGUES, F.R.N.; CATUNDA, A.G.V.; RIOS, R.R.S. Avaliação do sêmen ovino resfriado e diluído em ACP 101/102 adicionado de diferentes proporções de Aloes. **Acta Veterinária Brasileira**, v.8, supl. 2, p.232-233, 2014.
- ARTEAGA, M.A.C.; ZAMBRANO, J.J.; ARTEAGA, N.P.C. El uso del áloe vera y la glucosa como elementos protectores para la conservación del semen porcino. **Polo del Conocimiento**, v.7, n.11, p.1940-1956, 2022.
- BARBOSA, B.S.; SANTOS, F.A.; MACÊDO, L.B., IZZO, R.G.; FERNANDES, D.P.; PRAXEDES, É.A.; SILVA, A.R.; BEZERRA, M.B. Effect of supplementation of Aloe vera extracts in cold storage media and cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.17, n.1, p.1-9, 2020.

Recebido: ago./2022.

Publicado: mar./2024.

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm. **Biology of Reproduction**, v.70, n.3, p.708-717, 2004.

BOONKONG, S.; HONGLADDAPORN, C.; MATRA, A.; SIRIBUREE, A.; KULLAWONG, S.; KHUTTAKA, S.; NOIMAY, P. Effects of Aloe vera extract in semen extender on frozen semen quality of bovine. **Khon Kaen Agriculture Journal**, v.47, supl.2, p.549-554, 2019.

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

BRITO, B.F.; ANTUNES, L.P.; RODRIGUES, F.R.N.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; NUNES, J.F. Efeito do Aloe vera adicionado em diferentes concentrações à água de coco em pó (ACP-102[®]) no sêmen ovino diluído e incubado por duas horas. **Revista Acta Veterinária Brasileira**, v.8, supl.2, p.242-243, 2014.

BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; SAKIN, F.; ATEŞŞAHIN, A.; KULAKSIZ, R.; ÇEVİK, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v.89, n.1, p.24-30, 2010.

CASTELO, T.S.; SILVA, A.R.; FROTA, T.R. Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. 1. ed. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001.

CRESPILHO, A.M.; SÁ FILHO, M.F.; DELL'AQUA Jr, J.A.; NICHI, M.; MONTEIRO, G.A.; AVANZI, B.R.; MARTINS, A.; PAPA, F.O. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Science**, v.149, n.1, p.1-6, 2012.

FARSTAD, W. Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. **Reproduction in Domestic Animal**, v.44, n.2, p.336-341, 2009.

FIGUEIRÔA, P.T.B.; SALVIANO NETO, P.; OLIVEIRA, R.R. Avaliação da viabilidade do sêmen suíno submetido à refrigeração. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.442-443, 2001.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.431-444, 2005.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

Recebido: ago./2022.

Publicado: mar./2024.

GUTIÉRREZ, A.J.; COSME, R.W.; JIMÉNEZ, C.J.A.; RAMIREZ, G.J. A. Água de coco, suero fetal bovino, *Aloe vera* y sus combinaciones para criopreservarsemen ovino. **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.209, p.101-104, 2006.

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; ARAUJO, L.R.S.; SOUSA, L.P.; FEUGANG, J.M.N.; TONIOLLI, R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno, diluído no diluente, água de coco em pó, visando sua criopreservação. **Ciência Animal Brasileira**, v.19, p.1-16, 2018.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K; NOLAN, P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959.

JÄKEL, H.; HENNING, H.; LUTHER, A. M.; ROHN, K.; WABERSKI, D. Assessment of chilling injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v.99, n.10, p.1033-1041, 2021.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1/3, p.143-172, 2000.

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

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIRÊDO; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4 °C e 29 °C, como método de coloração vital para a avaliação do espermatozoide ovino. **Revista Ciência Agrária**, v.46, p.287-297, 2006.

MELO, C.C.S.; OLIVEIRA, É.C.S.; RAMOS, R.P.; LIMA, C.F.; RODRIGUES, A.E.S.; GUERRA, M.M.P. Renovação do diluidor Tris com gema de ovo ou *Aloe vera* sp. Na viabilidade do sêmen canino refrigerado a 5 °C - resultados preliminares. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, supl.2, p.142-143, 2015.

MELO-MACIEL, M.A.P.; LEITE-CASTRO, L.V.; LEITE, J.S.; OLIVEIRA, M.S.; ALMEIDA-MONEIRO, P.S.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. *Aloe vera* na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossomamacropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.3, p.945-949, 2015.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen - thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, n.6, p.1695 -1706, 2002.

NESCI, S.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; NEROZZI, C.; PAGLIARANI, A.; ALGIERI, C.; TAMANINI, C.; BUCCI, D. Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. **Theriogenology**, v.144, p.82-88, 2020.

NUNES, T.G.P.; GUIMARÃES, D.B.; COSTA, J.M.S.; SILVA, H.V.R.; DANTAS, R.A.A.; TONIOLLI, R. Uso do extrato de *Aloe vera* na criopreservação do sêmen suíno. **Ciência Animal**, v.29, n.2, p.22-35, 2019.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PEZO, F.; YESTE, M.; ZAMBRANO, F.; URIBE, P.; RISOPATRÓN, J.; SÁNCHEZ, R. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology**, v.98, p. 5-11, 2021.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.2-5, 2016.

SILVA, T.A.S.N. **Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado in vitro e na inseminação artificial cervical**, 2007. 64p. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de Brasília. Brasília, 2007.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-84, 2011.

SINGH, P.; AGARWAL, S.; SINGH, H.; VERMA, P.K.; PANDEY, A.K.; KUMAR, S. Antioxidant Effects of Aloe vera as Semen Additive in Cryopreservation of Cattle Bull Semen. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.9, n.9, p.1625-1635, 2020.

SOUZA, A.L.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Use of Aloe vera based extender for chilling and freezing collared peccary (Pecari tajacu) semen. **Theriogenology**, v.85, n.8, p.1432-1438, 2016.

TONIOLLI, R. **Pouvoir fecondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation**, 1996. 91p. (These de Doctorat em Cience de la Vie – Biotechnologie de la Réproduction). Université François Rabelais de Tours - France, 1996.

TONIOLLI, R.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y.; BUSSIRER, J. Fração ativa da água de coco: Conservação e fertilidade do sêmen de suíno. **Revista Ciência Animal**, v.17, n.2, p.91-100, 2007.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A.; ALVARENGA, M. A.; SIMONE M.M.K.; MARTINS; DE ANDRADE, A. F. C. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to shot-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, v.86, p.58-64, 2019.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: *in vitro* and *in vivo* studies. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.720-733, 2005.

WIEBKE, M., HENSEL, B., NITSCHKE-MELKUS, E., JUNG, M., & SCHULZE, M. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar, bull, and stallion. **Animal Reproduction Science**, v.246, p.106822, 2022.

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