

USO DO EXTRATO DE *ALOE VERA* NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO

(Use of Aloe vera extract in swine semen cryopreservation)

Thalles Gothardo Pereira NUNES^{1*}; Daianny Barboza GUIMARÃES²; Jonathan
Maia da Silva COSTA²; Herlon Victor Rodrigues SILVA¹; Raul
Andrei de Assis DANTAS²; Ricardo TONIOLLI²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV-UECE),
Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000; ²Laboratório de
Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (UECE). *E-mail: thalles_gothardo@hotmail.com

RESUMO

A gema de ovo é utilizada como agente crioprotetor em diluentes de congelamento de sêmen visando à proteção contra o choque térmico, apesar de apresentar uma possibilidade de contaminação microbiológica. Autores buscam no Aloe vera, um meio alternativo para a conservação do sêmen. O objetivo foi avaliar o uso do crioprotetor Aloe vera na criopreservação do sêmen de suíno. Foram utilizados 25 ejaculados, coletados através da técnica da mão enluvada. As amostras foram diluídas no diluente de refrigeração (gema de ovo 10,0%, Aloe vera 10, 20 e 30%) a 17 °C, diluente de congelamento (diluente de refrigeração + glicerol 6,0%) 5 °C e armazenados em palhetas. As palhetas foram avaliadas quanto ao vigor, motilidade, funcionalidade da membrana, vitalidade, integridade de acrossoma e na análise de sêmen assistida (CASA). Os dados foram avaliados quanto à normalidade, em seguida analisados utilizando ANOVA e comparações múltiplas, as análises foram realizadas com nível significância de 5,0%, utilizando o programa R3.4.0. Utilizou-se estatística descritiva para dados de vigor, motilidade e CASA. Na avaliação do sêmen descongelado para a funcionalidade da membrana, vitalidade e integridade de acrossoma, os maiores valores foram encontrados para as amostras com a gema de ovo ($p < 0,05$), e entre as amostras que utilizaram o *Aloe vera*, não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas ($p > 0,05$). Os dados de vigor, motilidade e CASA, das amostras utilizando o *Aloe vera*, apresentaram valores de 0,0. Os resultados mostraram que as diferentes concentrações de *Aloe vera* não exerceram o efeito crioprotetor desejado sobre a célula espermática, sendo assim, entende-se que são necessários maiores estudos sobre a sua ação na conservação de sêmen, bem como uma possível interação com os espermatozoides suínos. Por outro lado, acredita-se que ainda são necessários estudos suplementares sobre a curva de resfriamento do sêmen suíno, visando a sua criopreservação.

Palavra-chave: Sêmen suíno, congelamento, conservação; crioprotetor, *Aloe vera*.

SUMMARY

Egg yolk is used as a cryoprotective agent in semen freezing diluents for protection against thermal shock, despite the possibility of microbiological contamination. Authors search for Aloe vera, an alternative medium for the conservation of semen. The objective was to evaluate the use of the cryoprotectant Aloe vera in the cryopreservation of swine semen. We used 25 ejaculates, collected through the gloved hand technique. The samples were

diluted in the coolant diluent (10.0% egg yolk, Aloe vera 10, 20 and 30%) at 17 °C, freezing diluent (refrigerant diluent + glycerol 6.0%) at 5 °C and stored in vials. The vials were evaluated for vigor, motility, membrane functionality, vitality, acrosome integrity and assisted semen analysis (CASA). The data were evaluated for normality, then analyzed using ANOVA and multiple comparisons, the analyzes were performed with a significance level of 5.0%, using the program R3.4.0. Descriptive statistics were used for data on vigor, motility and CASA. In the evaluation of thawed semen for membrane functionality, acrosome integrity and vitality, the highest values were found for the egg yolk samples ($p < 0.05$), and among the samples that used Aloe vera, found significant differences between the different concentrations tested ($p > 0.05$). The data of vigor, motility and CASA, of the samples using Aloe vera presented values of 0.0. The results showed that the different concentrations of Aloe vera did not exert the desired cryoprotective effect on the sperm cell, so it is understood that further studies are needed on its action on semen conservation, as well as a possible interaction with swine spermatozoa. On the other hand, it is believed that additional studies on the cooling curve of the porcine semen are still necessary, aiming at its cryopreservation.

Key word: Semen swine, freezing, conservation, cryoprotectant, Aloe vera.

INTRODUÇÃO

A gema de ovo é um crioprotetor não penetrante, rotineiramente utilizado nos diluentes de criopreservação de sêmen, protegendo os espermatozoides contra o choque térmico e lesões que alteram a permeabilidade da membrana (MOUSSA *et al.*, 2002; BERGERON *et al.*, 2004). Essas funções são atribuídas à presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais impedem o efluxo progressivo de fosfolípidios, colina e colesterol da membrana plasmática (BERGERON *et al.*, 2004).

Entretanto, é necessária a substituição da gema de ovo no processo de criopreservação, por representar um potencial de risco microbiológico (FARSTAD, 2009; CRESPILO *et al.*, 2012,) além de favorecer o aumento na peroxidação lipídica (FARSTAD, 2009). Por estes motivos, substâncias de origem vegetal têm sido estudadas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006; CRESPILO *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2014; MELO-MACIEL *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Com base nisso, estudos estão sendo desenvolvidos utilizando o *Aloe vera*, que é uma planta pertencente à família *Asphodelaceae*. Ao ser utilizado na conservação de espermatozoides refrigerados de carneiros, foi observada uma manutenção dos parâmetros cinéticos espermáticos por 24 horas a 4 °C (ANTUNES *et al.*, 2014). Várias concentrações do extrato da planta foram testadas e não foi observado nenhum efeito deletério sobre os parâmetros cinéticos dos espermatozoides (BRITO *et al.*, 2014).

Na refrigeração dos espermatozoides dos catetos, esta substância proporcionou ao sêmen, uma qualidade semelhante quando utilizada a gema de ovo (Souza *et al.*, 2016). Também, já foi relatada ação crioprotetora em espermatozoides de carneiros (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006), tambaqui (MELO-MACIEL *et al.*, 2015) e catetos (Souza *et al.*, 2016). O poder de conservação do *Aloe vera* sobre os espermatozoides é atribuído a diversas substâncias presentes na sua composição, dentre as quais foram identificados alguns antioxidantes e diversos minerais (CHOI e CHUNG, 2003; SURJUSHE *et al.*, 2008; PANDEY e SINGH, 2016).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do gel de *Aloe vera* como um crioprotetor alternativo, durante o processo de criopreservação do sêmen suíno, através das suas consequências sobre as amostras de sêmen descongeladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará - processo nº 7512738/2015, aprovado em 15 de janeiro de 2015.

Animais e coletas de sêmen

Foram utilizados 05 machos mestiços, adultos e saudáveis da espécie suína (animais híbridos) para a colheita dos ejaculados, durante 05 semanas (n=25) consecutivas, sendo realizadas cinco colheitas por animal. Os reprodutores eram oriundos do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da Universidade Estadual do Ceará, com idades variando entre 12 e 18 meses. Os animais eram alimentados com ração balanceada em regime de trabalho e fornecimento de água *ad libitum*. O sêmen foi obtido através da técnica da mão enluvada, utilizando um recipiente coberto por filtro e protegido por envoltório térmico. Ao término da colheita, o ejaculado foi encaminhado ao laboratório para avaliação do sêmen *in natura*.

Avaliação da qualidade do sêmen *in natura*

O sêmen *in natura* foi avaliado logo após a coleta, quanto a sua qualidade, quanto ao seu aspecto (coloração e odor); volume (mL); concentração ($\times 10^6$ spztz/mL); vigor espermático (0 a 5); motilidade espermática (0% - 100%), funcionalidade de membrana (teste hiposmótico – HOST); integridade de acrossoma (% de íntegros); vitalidade (% de células vivas). O aspecto foi considerado normal quando o ejaculado apresentou cor branca ou branco-acinzentada e odor *sui generis*. Ejaculado com cor amarelada, rosada e/ou verde, além da presença de odor fétido ou urinoso, foi considerado contaminado e impróprio para ser utilizado.

O volume do sêmen foi obtido pesando-se o ejaculado em balança digital de precisão. A concentração espermática foi avaliada utilizando um espectrofotômetro (Minitub do Brasil, Porto Alegre, Brasil). O vigor espermático e a motilidade espermática foram avaliados de forma conjunta, com uma gota (10 μ L) colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio óptico a um aumento de 200x em três campos distintos. Os ejaculados que não apresentaram alterações no aspecto e com vigor $\geq 3,50$ e motilidade $\geq 85,0\%$, foram utilizados no experimento.

Para avaliar a funcionalidade de membrana, uma alíquota de 10 μ L foi retirada de cada amostra e adicionada em tubos de microcentrífuga contendo 100 μ L de água destilada, permanecendo a 37 °C durante 30 minutos. Após o período de incubação, foram avaliadas 200 células em microscopia de contraste de fase com aumento de 400x, onde os espermatozoides que apresentaram cauda enrolada foram considerados com membrana funcional. Um bom sêmen deve ter no mínimo 50% de espermatozoides reativos ao teste

(BARIL *et al.*, 1993). Para a avaliação da integridade de acrossoma e a vitalidade, foram confeccionados esfregaços com 10 μ L de amostra seminal e 10 μ L de azul de bromofenol, no qual foram avaliadas 200 células em microscópio óptico a um aumento de 1000x, onde os espermatozoides que não coraram foram considerados vivos e os que apresentaram o acrossoma normal foram considerados íntegros.

Extração do extrato bruto de *Aloe vera*

As folhas de *Aloe vera* foram obtidas no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará. Após a colheita, cada folha foi enrolada em papel filme, acondicionadas em recipiente de isopor contendo gelo reciclável, sendo imediatamente levadas ao LRSTS. As folhas foram cortadas transversalmente e a substância presente no seu parênquima (gel incolor) foi extraída através da raspagem do mesmo. Em seguida foi filtrado, e por fim, esse extrato bruto (gel), era armazenado em tubo de vidro fechado e conservado a 17 °C por período máximo de até 18 horas (SOUZA *et al.*, 2016).

Congelamento, criopreservação e descongelamento

Foram retiradas quatro amostras de $2,50 \times 10^9$ sptz de cada ejaculado, o volume de sêmen utilizado nas amostras variou de acordo com a concentração espermática de cada ejaculado. Estes permaneceram durante 15 minutos, em banho-maria a 30 °C. Após este período, foi realizada uma pré-diluição das amostras com *Beltsville Thawing Solution* (Minitub do Brasil, Porto Alegre, Brasil), na proporção de 03 partes de diluente para 01 de sêmen (3:1), que permaneceram por 45 minutos em banho-maria a 30 °C. Em seguida, estas foram conservadas a 25 °C durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram conservadas a 17 °C durante 02 horas, em seguida centrifugadas a 800g a 17 °C durante 15 minutos. Os *pellets* obtidos no processo de centrifugação foram ressuspensos utilizando o diluente de resfriamento contendo 5,67% de glicose e o crioprotetor externo: gema de ovo 20% (GO) ou *Aloe vera* em três diferentes concentrações: 10%, 20% e 30% em suspensão em água destilada autoclavada.

As amostras foram conservadas a 5 °C por 60 minutos, e após este período foi adicionado o diluente de congelamento 5,67% de glicose, 6,0% de glicerol e o crioprotetor externo: gema de ovo 20,0% ou *Aloe vera* 10%, 20% e 30% em suspensão em água destilada autoclavada, sendo envazadas em palhetas (IMV Technologies. L'Aigle, France) de 0,5mL contendo $2,50 \times 10^8$ sptz/palheta. Em seguida, foram colocadas no vapor de nitrogênio líquido (-60 a -70 °C) durante 30 minutos. Finalmente, as palhetas congeladas foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijões criogênicos (BARROS *et al.*, 2015), por pelo menos 15 dias antes da descongelamento e análises.

As amostras foram descongeladas em banho-maria após um período de armazenamento mínimo de quinze dias e máximo de 30 dias, à temperatura de 37 °C, durante 50 segundos. Em seguida adicionou-se 2,0mL do diluente BTS, após 10 minutos de incubação a 37 °C e teve início as avaliações e confecções de lâminas das amostras (BARROS *et al.*, 2015).

Avaliações do sêmen após descongelamento

As amostras descongeladas foram submetidas às avaliações de vigor e motilidade espermática, funcionalidade de membrana, integridade da membrana acrossomal, vitalidade, além da avaliação no sistema de análise de sêmen assistida por computador (CASA). No CASA, as amostras foram analisadas após 10 minutos de incubação a 37 °C, tendo permanecido durante todo este período em recipientes fechados.

Para a análise computadorizada do sêmen, foi utilizado o software Sperm Class Analyser® (SCA 2002, Microptic, Barcelona, Espanha), foram avaliados 5 (cinco) diferentes campos do microscópio, em uma amostra de 10µL de sêmen entre lâmina e lamínula. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Motilidade total (%) e progressiva (%); Velocidade (%) (rápidos, médios, lentos e estáticos); Parâmetros de velocidade (velocidade curvilínea (VCL - µm/s), velocidade linear (VSL - µm/s), velocidade média da trajetória (VAP - µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), (deslocamento de cabeça (ALH - µm), frequência de batimento cruzado (BCF - Hz). Foi utilizada uma configuração anteriormente preconizada para a espécie suíno no sistema SCA (KARAGEORGIOU *et al.*, 2016). Quando necessário, foi realizada a edição das imagens para a remoção de artefatos.

Análises estatísticas

Inicialmente os dados obtidos foram avaliados quanto a sua normalidade através do Teste de Cramer-Von Mises e homocedasticidade utilizando o Teste de Box-Cox. Os resultados de espermatozoides íntegros após a descongelamento não apresentaram homocedasticidade, estes foram transformados em arco seno, sendo submetidos novamente aos testes anteriormente citados. Então, os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), em seguida foi realizado o teste comparação múltiplas, no qual foi escolhido o Teste de Student-Newman-Keuls. Para os dados obtidos das avaliações do vigor, da motilidade e dos parâmetros cinéticos avaliados no sistema CASA após o processo de descongelamento foi realizada estatística descritiva. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão e avaliados no do software R 3.4.0⁴ (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), com o nível de significância de 5.0% (p<0,05).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Todas as amostras de sêmen *in natura* apresentaram: aspecto normal, com coloração branco acinzentado e odor sui generis; volume 162,4±53,3mL; concentração 525,9±115,8 (x10⁶ spz/mL); vigor espermático de 4,3±0,2 (0 a 5); motilidade espermática de 91,5±4,3 (%); membrana funcional 92,5±2,6 (%); espermatozoides vivos e com acrossoma íntegro com 97,3±1,4 (%); total de células vivas com 97,6±1,4 (%) e total de células com acrossoma íntegro com 97,9±1,2 (%).

Os parâmetros avaliados de sêmen *in natura* encontraram-se dentro de uma boa qualidade seminal para o presente estudo, se encontrando acima dos padrões mínimos

*Endereço para correspondência:
thalles_gothardo@hotmail.com

exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para reprodutores suínos em trabalho de coleta (CBRA 2013). Os valores obtidos foram semelhantes aos observados em outros trabalhos de criopreservação do sêmen suínos (BARROS *et al.*, 2012; PINHO *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2015). Assim, todos os ejaculados dos reprodutores que foram aproveitados, foram considerados aptos a serem utilizado no presente experimento.

As amostras criopreservadas com 10% de gema de ovo apresentaram valores médios de vigor com $2,0 \pm 0,4$ e de motilidade com $44,5 \pm 6,4\%$, sendo esse, o tratamento que obteve os melhores resultados após a descongelação, enquanto que os demais tratamentos com *Aloe vera* zeraram os valores dessas características após descongelação das amostras de sêmen (Tab. 01).

Tabela 01: Valores (média±DP) do vigor e da motilidade espermática após descongelação, em espermatozoides suínos criopreservados com gema de ovo (10%) ou *Aloe vera* (10, 20 e 30%).

Espermatozoides	Gema de ovo	AV 10%	AV 20%	AV 30%
Vigor	$2,0 \pm 0,4$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Motilidade (%)	$44,5 \pm 6,4$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Trabalhando-se com sêmen suíno, e utilizando-se de protocolo semelhante, outros autores obtiveram os seguintes resultados para essas características: $2,1 \pm 0,6$ e $35,4 \pm 21,0$ para vigor e motilidade ao utilizar o crioprotetor gema de ovo, respectivamente (BARROS *et al.*, 2015). Desta forma, os resultados obtidos nesse trabalho, sugerem que a gema de ovo foi eficiente para a manutenção das características vigor e motilidade espermática, após descongelação do sêmen. Entretanto, quando comparados aos resultados de outros protocolos de congelação de sêmen suíno, os resultados do vigor espermático foram inferiores ao descrito na literatura: $3,0 \pm 0,0$ (PINHO *et al.*, 2014) e $3,4 \pm 0,4$ (BARROS *et al.*, 2012). Por outro lado, a motilidade permaneceu semelhante à obtida em outros autores: $46,2 \pm 1,3$ (PINHO *et al.*, 2014) e $49,5 \pm 12,1$ (BARROS *et al.*, 2012).

Segundo a literatura, pode ser evidenciada uma relação direta entre o número de leitões nascidos e a motilidade espermática, uma vez que a mesma favorece a chegada do espermatozoide junto ao óvulo da fêmea. O vigor espermático, que se traduz na prática pela intensidade de movimento que o espermatozoide está executando, também é uma característica importante a ser considerada para os resultados de fertilidade (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; DAIGNEAULT *et al.*, 2014). Levando-se em consideração os resultados dessas características utilizando-se a gema de ovo como crioprotetor externo, seria possível se esperar bons resultados de fertilidade com a utilização do sêmen conservado desta forma.

O comportamento apresentado pelo sêmen, nas características vigor espermático e motilidade, com a utilização do crioprotetor *Aloe vera*, foi muito ruim, apesar de se saber que os seus componentes possuem uma ação crioprotetora (SOUZA *et al.*, 2016), alguns deles também com ação antioxidantes, e que proporcionam uma boa manutenção da qualidade espermática (RONDON *et al.*, 2015; SAVI *et al.*, 2015). No sêmen de ovinos descongelado, utilizando-se concentrações de 60 e 70% de *Aloe vera*, observou-se uma

ação tóxica traduzida por uma redução da motilidade espermática (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Por outro lado, o mesmo autor, obteve resultados satisfatórios com concentrações entre 10 e 50%. Diante desses resultados, pode-se considerar que as concentrações de *Aloe vera*, utilizadas no presente trabalho, não foram suficientes para proporcionar atividade crioprotetora. Uma vez que a célula espermática suína é reconhecidamente mais sensível do que a de outras espécies (WATSON, 1995), é bem provável que sejam necessários maiores estudos no sentido de se encontrar uma concentração ideal do *Aloe vera* para o sêmen do varrão. Por outro lado, outra possibilidade pode ser levantada, a de o espermatozoide suíno ser sensível a algum componente do *Aloe vera* e desta forma protocolos experimentais adicionais devem ser desenvolvidos no sentido de se identificar a ou as possíveis substâncias que provocaram essa queda drástica no vigor e na motilidade espermática.

Nos resultados de todas as análises, apresentados na Tab. 02, as amostras que utilizaram gema de ovo apresentaram valores superiores aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Quando comparados os tratamentos que utilizaram o *Aloe vera* como crioprotetor, em diferentes concentrações, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos ($p > 0,05$) para todas as características analisadas.

Tabela 02: Valores (média±DP) das características de integridade acrossomal, funcionalidade de membrana e vitalidade espermática (% sptz vivos) de espermatozoides suínos criopreservados com gema de ovo (10%) e de *Aloe vera* (10, 20 e 30%).

Espermatozoides (%)	Gema de ovo	AV 10%	AV 20%	AV 30%
Membrana funcional	24,7±4,0 ^a	12,5±1,8 ^b	12,5±2,4 ^b	12,4±1,8 ^b
Vivos + acrossoma íntegro	9,6±1,8 ^a	0,7±0,3 ^b	0,7±0,5 ^b	0,8±0,7 ^b
Total de vivos	24,4±2,7 ^a	2,3±1,5 ^b	2,1±1,0 ^b	2,0±1,3 ^b
Total acrossoma íntegro	40,4±3,5 ^a	8,3±3,2 ^b	7,3±3,9 ^b	6,3±3,7 ^b

Letras minúsculas (^{a,b}) na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os espermatozoides descongelados com membrana funcional, na presença da gema de ovo (Tab. 02), apresentaram valores semelhantes aos relatados em outros trabalhos, 29,2±0,8 (BARROS *et al.*, 2015) e 23,4±2,5 (PINHO *et al.*, 2014), analisando o sêmen suíno.

As porcentagens de células criopreservadas com membrana funcional, na presença do *Aloe vera*, apresentaram resultados com diferenças significativas em relação aos resultados da atividade crioprotetora utilizando-se a gema de ovo. Esses resultados não corroboraram com os encontrados no sêmen de catetos, onde não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos (SOUZA *et al.*, 2016). Essa possível ação protetora do gel de *Aloe vera* para o sêmen suíno, possivelmente foi devido à constituição desse crioprotetor, onde podem ser encontradas diversas substâncias com ação protetora aos espermatozoides (CHOI e CHUNG, 2003; SURJUSHE *et al.*, 2008; PANDEY e SINGH, 2016).

Assim sendo, seria esperado uma maior proteção da célula espermática do suíno, uma vez que o *Aloe vera* também por proporcionar uma melhor estabilização de membranas (CAO *et al.*, 2013; SAVI *et al.*, 2015). Provavelmente as concentrações utilizadas nesse trabalho, associadas ao tempo de exposição antes da congelação, não tenham sido suficientes para que o gel de *Aloe vera*, adicionado aos diluentes durante o resfriamento do sêmen, pudesse expressar de maneira eficiente sua ação crioprotetora.

Os valores encontrados para a característica de integridade acrossomal com 20% de gema de ovo (Tab. 02), foram inferiores quando comparado aos de outros autores que utilizaram metodologia semelhante, com $40,1 \pm 17,9$; $87,4 \pm 11,9$ e $50,3 \pm 20,9$, respectivamente (BARROS *et al.*, 2015). Ao ser comparado a resultados obtidos com metodologia de criopreservação diferente, também foi observado valores inferiores para o total de vivos $47,9 \pm 0,9$ (PINHO *et al.*, 2014). Essas diferenças podem ter sido possivelmente devido às variações entre características estruturais dos espermatozoides. Uma maior presença e distribuição simétrica do colesterol na estrutura desta célula pode proporcionar uma melhor interação com o meio de criopreservação, e dessa forma, obter uma maior estabilização da membrana plasmática e melhor proteção celular (HOLT, 2000), associado às características individuais de varrões com ejaculados de boa ou má congelabilidade (TONIOLLI *et al.*, 2017).

As porcentagens de ácidos graxos de cadeia longa presentes na membrana plasmática do espermatozoide, após a descongelação, influenciam a sua tolerância ao processo de criopreservação em ejaculados de machos da mesma espécie (WATERHOUSE *et al.*, 2006). Casas *et al.* (2010) ao avaliarem a expressão da proteína HSP90AA1 após a descongelação no sêmen suíno, observaram que ejaculados com integridade de membrana espermática inferior a 40% apresentaram baixo poder de congelabilidade, o que ocorreu em 60% dos ejaculados dos animais utilizado no presente experimento.

Os resultados obtidos após descongelação para o total de espermatozoides vivos, com a adição do crioprotetor *Aloe vera* no meio diluente, foram inferiores a 2,5%, independente da concentração utilizada (Tab. 02). Quando comparado aos resultados obtidos na avaliação do sêmen de catetos, os valores foram muito próximos ($23,3 \pm 5,5$) (SOUZA *et al.*, 2016) aos obtidos nesse trabalho com o uso da gema de ovo. Por outro lado, quando o sêmen criopreservado é o de ovino, os resultados subiram para 60% de espermatozoides vivos após a descongelação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006).

Para esta característica em questão, os valores obtidos nas diferentes espécies mais uma vez comprovaram que não só o espermatozoide suíno, bem como o de catetos, são mais sensíveis ao tratamento visando conservação pelo frio, do que o de um ruminante. Neste caso, nem a gema de ovo impediu uma maior queda da porcentagem de células vivas após o processo de criopreservação. Por outro lado, não se deve esquecer que a utilização do *Aloe vera* na congelação do sêmen suíno é um fato muito recente, devido a isso, não se consegue encontrar uma boa sustentação na literatura consultada. Provavelmente, a associação da substância testada ao protocolo utilizado não tenha sido a mais adequada, sendo necessário se determinar uma melhor associação entre tempos, temperaturas, diluentes e concentração de crioprotetores.

Os valores (média±desvio padrão) dos parâmetros cinéticos avaliados no software SCA[®] do sêmen suíno descongelado são apresentados na Tab. 03. O diluente contendo o crioprotetor gema de ovo obteve os melhores resultados em relação aos demais tratamentos experimentais. Independentemente da concentração utilizada, os tratamentos que utilizaram o crioprotetor *Aloe vera*, apresentaram valores de 0,0±0,0 para todos os parâmetros cinéticos avaliados no software SCA[®] (Tab. 03).

Tabela 03: Valores (médias±DP) dos parâmetros cinéticos avaliados no software SCA[®] do sêmen suíno descongelado, e conservado com os crioprotetores gema de ovo (GO - 10%) e *Aloe vera* (AV - 10, 20 e 30%).

Tratamentos	Gema de ovo	AV 10%	AV 20%	AV 30%
Motilidade total (%)	45,2±8,58	0,0	0,0	0,0
Motilidade progressiva (%)	20,7±2,3	0,0	0,0	0,0
Velocidade				
Rápidos (%)	1,0±6,7	0,0	0,0	0,0
Médios (%)	14,5±6,8	0,0	0,0	0,0
Lentos (%)	22,5±11,6	0,0	0,0	0,0
Estáticos (%)	54,7±8,5	0,0	0,0	0,0
Velocidade curvilinear (VCL - µm/s)	43,7±10,0	0,0	0,0	0,0
Velocidade linear (VSL - µm/s)	24,3±8,5	0,0	0,0	0,0
Velocidade média da trajetória (VAP - µm/s)	29,0±8,5	0,0	0,0	0,0
Linearidade (LIN - %)	54,5±10,6	0,0	0,0	0,0
Retilinearidade (STR - %)	82,2±7,2	0,0	0,0	0,0
Freqüência de batimento cruzado (BCF - Hz)	7,7±2,2	0,0	0,0	0,0
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm)	2,2±0,7	0,0	0,0	0,0

O uso da edição das imagens para a remoção dos artefatos foi necessário em 100% (125/125) das amostras oriundas dos tratamentos usando o crioprotetor gema de ovo; já com o *Aloe vera* foi necessário em apenas 9,06% (34/375) das amostras durante as avaliações dos parâmetros cinéticos no software SCA[®].

Dentre os parâmetros cinéticos avaliados no software SCA[®], a motilidade espermática, total e progressiva, está, segundo alguns autores, diretamente relacionada com a taxa de parto e os resultados de prolificidade, respectivamente (BROEKHUIJSE *et al.*, 2012; DAIGNEAULT *et al.*, 2014). Desta forma são características importantes e que podem influenciar nos resultados de produtividade de um determinado reprodutor.

Os resultados do presente trabalho apresentaram 45,2±8,5% de motilidade total e 20,7±2,3% de motilidade progressiva com a utilização do crioprotetor gema de ovo (Tab. 03). Em um trabalho com sêmen suíno, onde se utilizou um protocolo de congelação semelhante, mas com uma relação de temperatura e tempo de descongelação diferentes (50 °C durante 12 segundos), os resultados de motilidade total (41,9±16,3%) e progressiva (18,4±2,0%) foram bem próximos aos do presente estudo (RUNGRUANGSAK *et al.*,

2017). Estes resultados colocaram em evidência o fato de que a relação temperatura/tempo, para a descongelação do sêmen, não influenciou na qualidade dos resultados obtidos para a motilidade espermática, nem houve influência do crioprotetor utilizado.

Em outro protocolo de congelação para o sêmen suíno, que utilizou um período de estabilização à temperatura de 17 °C por 24 horas, a lactose como fonte energética e o detergente *Orvus Est Paste*, os resultados das avaliações após a descongelação foi de $57,6 \pm 3,3$ e $34,0 \pm 1,9$ para motilidade total e progressiva, respectivamente (ESTRADA *et al.*, 2013). Aparentemente a associação de maior tempo de estabilização, com utilização de outra fonte energética diferente da glicose e a solubilização das lipoproteínas da gema de ovo pelo uso do detergente, proporcionou melhor qualidade espermática após a descongelação. Entretanto, em suínos miniaturas foi relatado um tempo de estabilização ideal de aproximadamente três horas (KONG *et al.*, 2013). Estas diferenças de resultados encontradas coloca em evidência a necessidade de maiores estudos com relação ao tipo de técnica de criopreservação a ser usada, bem como a melhor composição dos diluentes envolvidos na congelação do sêmen em relação à espécie animal estudada.

Quanto maior o tempo de estabilização em temperaturas entre 15 a 17 °C, maior será a incidência de metabolitos tóxicos sobre os espermatozoides e com isso maior também a possibilidade de redução da qualidade seminal (YESTE, 2017). Essa redução pode ser explicada pelo fato de que apesar do espermatozoide apresentar um nível metabólico mais baixo, induzido por temperaturas de conservação mais baixas, ainda acontece consumo de nutrientes do meio e produção de secreções que acabam por alterar a composição química desses diluentes, levando às modificações do pH e da osmolalidade do meio conservador (TONIOLLI, 2013).

No sêmen de catetos, o crioprotetor *Aloe vera* proporcionou uma manutenção da cinética espermática mais efetiva do que a gema de ovo (SOUZA *et al.*, 2016), entretanto, deve ser levado em consideração que para o sêmen dessa espécie animal, foi utilizado o diluente TRIS-gema de ovo-glicerol durante a curva de resfriamento. No sêmen de ovinos, a utilização do diluente água de coco adicionado do crioprotetor *Aloe vera*, também proporcionou uma melhor manutenção da cinética espermática, com 60% de motilidade progressiva (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Em sêmen de tambaqui, com este mesmo diluente, obteve valores semelhantes de VAP, VCL e VSL para os espermatozoides descongelados quando comparados ao diluente associado ao dimetilsufóxido (MELO-MACIEL *et al.*, 2015).

Como pode ser visto, em outras espécies e diluentes, resultados que apresentaram melhor proteção ao espermatozoide foram obtidos com o uso do *Aloe vera*. Desta forma, pode-se supor que existe uma diferença de proteção atribuída a uma possível interação entre o tipo de crioprotetor e o diluente utilizado durante a curva de abaixamento da temperatura visando à criopreservação, com conseqüente melhor proteção às células espermática. Essas diferenças entre resultados sugere a necessidade de se identificar, para cada espécie animal, o melhor diluente a ser utilizado e os possíveis períodos de estabilização do sêmen. O comportamento de ambos os crioprotetores com relação à incidência de artefatos e edição das imagens foi semelhante ao relatado no sêmen de catetos (SOUZA *et al.*, 2016). No tocante a esta característica, o uso do crioprotetor o *Aloe vera* não dificultou a avaliação das amostras de sêmen através da cinética espermática,

enquanto que nas que utilizam a gema de ovo, foi necessário uma maior atenção e trabalho adicional de limpeza, para avaliação destas características.

Os resultados do presente trabalho, não conseguiram colocar em evidência a ação crioprotetora do extrato de *Aloe vera* sobre o sêmen suíno. Sugere-se como uma das possibilidades que justificam os resultados, a remoção do plasma seminal durante a curva de resfriamento, das amostras que foram congeladas. Este procedimento não ocorreu nos demais trabalhos que utilizaram o *Aloe vera* para a criopreservação do sêmen (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006; MELO-MACIEL *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016), levando-se a pensar na possibilidade da ação crioprotetora do *Aloe vera* estar associada com uma possível interação com o plasma seminal.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que as diferentes concentrações do gel de *Aloe vera*, não exerceram efeito crioprotetor desejado, apesar dessas propriedades ainda serem pouco estudadas e conhecidas. No caso do sêmen do varrão, esse conhecimento é fundamental para que se possa encontrar a concentração ideal e poder colocar em evidência suas propriedades antioxidativas e crioprotetoras. Os resultados obtidos nesse trabalho abriram caminho para novos questionamentos e estudos sobre a utilização do *Aloe vera* dentro de protocolos de congelação do sêmen do varrão. Estudos adicionais são necessários.

AGRADECIMENTOS

Ao Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos – UFC, pelo fornecimento da planta *Aloe vera*.

REFERÊNCIAS

- 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 Brasília*, v.8, suppl. 2, p.232-233, 2014.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, Y.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, B.; LEBŒUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins*. 3^a ed., Nouzilly, INRA, 1993. 137p.
- BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau submetido a três protocolos de congelamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.4, p.914-922, 2012.

BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; SOUZA, L.P.; FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar sêmen freezing procedure. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, Suppl. 1, p.2023-2030, 2015.

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.

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. *Acta Veterinária Brasileira*, v.8, Suppl. 2, p.242-243, 2014.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; ŠOŠTARIĆ, E.; FEITSMA, H.; GADELLA, B.M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, v.90, n.3, p.779-789, 2012.

CAO, H.; SUN, X.; LI, Q.; ZHOU, S.; NAN, X.; HU, J.; WANG, L.; HE, Y. Testing *Rhodiola sachalinensis* saccharide as cryoprotectant for bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, v.96, n.11, p.6965-6972, 2013.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, v.74, n.6, p.940-950, 2010.

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1, p.53-62, 2003.

Colégio Brasileiro Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA. pp.47-50, 2013.

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.

DAIGNEAULT, B.W.; MCNAMARA, K.A.; PURDY, P.H.; KRISHER, R.L.; KNOX, R.V.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; MILLER, D.J. Enhanced fertility prediction of cryopreserved boar spermatozoa using novel sperm function assessment. *Andrology*, v.3, n.3, p.558-568, 2014.

ESTRADA, E.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; ROCHA, L.G.; BALASCH, S.; BONET, S.; YESTE, M. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases

fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, v.2, n.1, p.88-100, 2013.

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

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

KARAGEORGIU, M.A.; TSOUSIS, G.; BOSCOS, C.M.; TZIKA, E.D.; TASSIS, P.D.; TSAKMAKIDIS, I.A. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinaria Brno*, v.85, n.1, p.23-31, 2016.

KONG, D.; SHANG, H.; GUO, K.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WEI, H. A study on optimizing the cryopreservation methods for Bama miniature pig semen. *Experimental Animals*, v.61, n.5, p.533-42, 2012.

MELO-MACIEL, M.A.P.; LEITE-CASTRO, L.V.; LEITE, J.S.; OLIVEIRA, M.S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *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 a easy method: cryoprotective effect on frozen - thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, n.6, p.1695 -1706, 2002.

PANDEY, A.; SINGH, S. Aloe vera: A systematic review of its industrial and ethno-medicinal efficacy. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Science*, v.5, n.1, p.21-33, 2016.

PARRILLA, I.; DEL-OLMO, D.; SIJSES, L.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. *Animal Reproduction Science*, v.132, n.1-2, p.66-73, 2012.

PINHO, R.O.; LIMA, D.M.; SHIOMI, H.H.; SIQUEIRA, J.B.; SILVA, H.T.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.; GUIMARÃES, J.D. Effect of different cryo-protectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. *Animal Reproduction Science*, v.146, n.3-4, p.187-192, 2014.

RONDON, R.M.M.; ARAÚJO, A.A.; TONIOLLI, R.; RONDON, F.C.M. Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.36, n.3, p.141-147, 2012.

RUNGRUANGSAK, J.; SUWIMONTEERABUTR, J.; BURANAAMNUAY, K.; PONGPENG, J.; TUMMARUK, P. Association between frozen-thawed boar sperm motility characteristics assessed by Sperm Class Analyzer (SCA[®]) and sperm viability assessed by SYBR-14/EthD-1. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, v.47, Suppl.1. p.7-8, 2017.

SAVI, P.A.P.; ZAVAREZ, L.B.; KIPPER, B.H.; FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, M.E.F. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura. *ARS Veterinaria*, v.31, n.1, p.12-18, 2014.

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.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D.G. Aloe vera: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, v.53, n.4, p.163-166, 2008.

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B.; TONIOLLI, L.S.; GUIMARÃES, D.B.; DIAS, A.V.; CANTANHÊDE, L.F.; ARAÚJO, L.R.S.; FILHO, I.B.Q. Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 5 °C no diluente ACP-103[®] associado à gema de ovo. *Ciência Animal*, v.23, n.2, p.45-57, 2013.

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

WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

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