

Criopreservação do sêmen de caprinos em diluidores alternativos e análise da viabilidade**Cryopreservation of goat semen in alternative extenders and viability analysis**

DOI:10.34117/bjdv6n8-166

Recebimento dos originais: 20/07/2020

Aceitação para publicação: 13/08/2020

Marcimar Silva Sousa

Médico Veterinário, Doutorando em Ciências Veterinária
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: marcimar.sousa@aluno.uece.br

Bruna Farias Brito

Médica Veterinária, Doutoranda em Ciências Veterinária
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: bruna.brito@aluno.uece.br

Leonardo Alves Rodrigues Cabral

Médico Veterinário, Doutorando em Ciências Veterinária
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: leonardo.cabral@aluno.uece.br

Natanael Aguiar Braga Negreiros

Graduando em Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Ceará – UECE
E-mail: natanael.negreiros@aluno.uece.br

Karmilee dos Santos Pontes

Graduanda em Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: karmilee.santos@aluno.uece.br

Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

Médica Veterinária, Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidad Complutense de Madrid
Docente e pesquisadora do Doutorado em Biotecnologia da RENORBIO/UECE
Docente do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal / UECE
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: crismelloaco@gmail.com

José Ferreira Nunes

Médico Veterinário, Doutor em Fisiologia da Reprodução - Université de Paris IV;
Docente do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e
Animal / UECE

Professor Visitante do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / UECE, Av. Dr.
Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60.740-000
E-mail: ferreira.nunes@uece.br

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da refrigeração e congelamento do sêmen caprino utilizando diluentes de origem vegetal. Para isso, foi utilizado 20 amostras de sêmen de cinco machos caprinos, em que foi avaliado imediatamente após a coleta, diluídos em ACP-101 e extrato liofilizado de *Aloe vera* e controle Tris. O sêmen foi refrigerado a 4 °C e congelado a -196 °C. Ao término da refrigeração e após descongelamento as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos de motilidade, velocidades e viabilidade. Os resultados das avaliações, demonstraram que o diluente ACP apresentou resultados superiores em comparação aos tratamentos com *Aloe vera*. Portanto, a utilização do ACP-101 associado aos crioprotetores proporciona um excelente meio para criopreservação do sêmen de caprinos. Novos estudos são necessários para verificar em que concentração o aloe vera pode ser utilizado na criopreservação do semen exercendo outros benefícios.

Palavras-chave: ACP, Congelamento, Biotecnologia do sêmen

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of refrigeration and freezing of goat semen using diluents of vegetable origin. For this, 20 semen samples from five male goats were used, which were evaluated immediately after collection, diluted in ACP-101 and lyophilized extract of *Aloe vera* and Tris control. The semen was refrigerated at 4 °C and frozen at -196 °C. At the end of refrigeration and after thawing the samples were evaluated for kinetic parameters of motility, velocities and viability. The results of the evaluations showed that the ACP diluent presented superior results in comparison to the treatments with *Aloe vera*. Therefore, the use of ACP-101 associated with cryoprotectants provides an excellent means for cryopreservation of goat semen. Further studies are needed to verify in what concentration aloe vera can be used in cryopreservation of semen by exerting other benefits.

Keywords: ACP. Freezing, Semen, biotechnology

1 INTRODUÇÃO

Uma vez que se tem conhecimento da necessidade de maximizar o potencial biológico da espécie caprina a fim de aumentar os índices produtivos, as tecnologias de conservação seminal associado a inseminação artificial, tem sido instrumento importante nos avanços genéticos da espécie (LEBOEUF et al., 1998). O sêmen pode ser processado de diferentes maneiras, seja para o uso imediato a coleta, refrigerado a 4° C por um período de até 48 horas, ou até mesmo congelado

a -196°C por tempo ainda não determinado, sendo necessário o uso de diluentes específicos nos três métodos (NUNES, 2010).

O emprego de diluentes permite aumentar o volume total do ejaculado, facilitando assim a sua divisão em doses inseminantes, bem como, proporciona um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (DERIVAUX, 1982). A capacidade tamponante e pressão osmótica de um diluente tem grande importância para o sêmen de caprino, sendo necessário manter o pH entre 6.2 e 6.8 e a osmolaridade entre 300 e 330 mOsm/Kg H₂O (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Diante disto, foi então desenvolvido um diluente comercial, a água de coco em pó (ACP), sendo este, um pó resultante do final do processo de desidratação do líquido endospermico do coco e ajustado quanto ao pH e osmolaridade para cada espécie a ser utilizado (SALGUEIRO, 2002).

A gema de ovo tem sido bastante utilizada para estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico, uma vez que esta é bastante fluida e na refrigeração reduz essa fluidez (BISPO et al., 2011), no entanto deve ser utilizada com cautela, devido aos problemas relatado por Nunes (1982). Além da gema de ovo, também utiliza-se a glicerina, que possui ação intracelular, impedindo a formação de cristais de gelo, e que devido ao aumento da osmolaridade do meio, ocorre a desidratação da célula espermática (PURDY, 2005). Nesse sentido, substâncias de origem vegetal como a *Aloe vera* que tem ação crioprotetora e antioxidante, podem ser utilizadas em associação com o ACP (MELO, 2010), pois possui em sua composição inúmeros componentes bioquímicos, dentre eles estão os açúcares, esteroides, ácidos orgânicos, substâncias antibióticas, enzimas, proteínas, vitaminas e minerais (VELOSO; PEGLOW, 2003). O extrato gel de *Aloe vera* foi utilizado como diluente de sêmen de ovinos por Gutiérrez et al. (2006) e de caprinos por Melo (2010).

Quanto à avaliação espermática, atualmente é mais recomendado a utilização de Análise de Sêmen Auxiliada por Computador (CASA), que fornece de forma objetiva os parâmetros cinéticos de motilidade e as velocidades (MORTIMER, 1997). Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar e comparar através dos parâmetros cinéticos e a vitalidade espermática utilizando os diluentes ACP-101, extrato liofilizado *Aloe vera* e ACP-101/*Aloe vera* no sêmen refrigerado a 4°C e criopreservado de caprinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, o projeto foi submetido à Comissão de Ética para o Uso de Animais da UECE e aprovado com o número: 2887836/2017. Ejaculados de cinco machos caprinos adultos foram coletados com vagina artificial, obtendo ao final um total de 20 amostras de sêmen. Após a

coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 37 °C e avaliados quanto aos parâmetros subjetivos e à concentração em ($\times 10^9$ spz/mL) em câmara de Neubauer de acordo com o manual do CBRA (2013).

Após as avaliações, as amostras de sêmen foram diluídas em Tris, ACP-101, extrato liofilizado de Aloe vera, e divididos em tratamentos: Tris (Controle); ACP 101; ACP 101-Aloe vera; Aloe vera. Todos os diluentes foram acrescidos de 2,5% de gema de ovo, 7% de glicerol e 40 mg de gentamicina para 100mL. As diluições finais do sêmen foram calculadas através da fórmula $V1 \times C1 = V2 \times C2$, para obter a concentração final de 400×10^6 spz/mL.

O processo de refrigeração iniciou com a temperatura de 36 °C para 4°C em uma curva de refrigeração com duração de 45 minutos, e uma hora de estabilização, totalizando uma hora e 45 minutos. Após a refrigeração, as amostras foram avaliadas no sistema CASA e confeccionado um esfregaço para cada amostra. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, congelados em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos, submersas no nitrogênio e armazenadas em botijão criogênico (-196 °C), para posterior análise.

A análise dos parâmetros cinéticos do sêmen refrigerado e descongelado foram determinadas no sistema CASA (Sperm Class Analyser® - SCA®, Microptic S.L, Barcelona, Espanha), avaliando os parâmetros de Motilidade Total (MT%), Motilidade Progressiva (MP%), Velocidade Curvilinear (VCL - $\mu\text{m/s}$), Velocidade em Linha Reta (VSL - $\mu\text{m/s}$) e Velocidade Média do Percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$). Para o teste de viabilidade espermática, foi utilizado corantes vitais (eosina/nigrosina), em que, aliquotou-se 5 μl de corante e 5 μl de sêmen em uma lâmina, onde foram homogeneizados e realizado o esfregaço. A avaliação foi feita através de microscópio de contraste de fases, em que o espermatozoide foi classificado como corado (não viáveis) e não corado (viáveis).

Os dados foram agrupados em tabelas e analisados através do programa estatístico Graphpad Prism® versão 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados com distribuição normal foram avaliados por meio da ANOVA seguida pelo teste de Tukey, sendo os resultados obtidos expressos em média e desvio padrão. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do sêmen fresco apresentou parâmetros médios de: volume 0,7 mL, motilidade de massa score 4, e concentração espermática de $3,37 \times 10^9$. Os parâmetros cinéticos do sêmen fresco avaliados pelo sistema CASA como MT e MP foram de 94,68 e 91,42 respectivamente e vigor 3,7, parâmetros aceitáveis pelo CBRA (2013).

A avaliação dos parâmetros cinéticos do sêmen refrigerado como MT e MP, mostrou que os tratamentos controle e ACP-101 foram semelhantes (89,57 e 88,30), sendo o ACP-101 (88,30) superior ($p < 0,05$) aos tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* (55,26 e 61,97), respectivamente (tab. 1). Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos descritos por Melo (2010) que utilizou *Aloe vera* nas concentrações de 5 e 10%. Os presentes resultados também corroboram com Gutiérrez *et al.* (2006), no qual avaliou-se o extrato gel de *Aloe Vera* em diferentes concentrações no sêmen ovino após o período de estabilização refrigerado a 5°C.

Quanto ao sêmen criopreservado (tab.2), os grupos controle e ACP-101 foram semelhantes (33,13 e 42,99) respectivamente, sendo o ACP-101 (42,99) superior ($p < 0,05$) no parâmetro MT aos tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* (23,58 e 23,56) respectivamente. Na comparação do parâmetro MP, o Tris e o ACP-101 foi superior (10,84 e 15,91) aos tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* (3,79 e 2,89) respectivamente. Os resultados dos tratamentos utilizando *Aloe vera* foram inferiores aos encontrados por Gutiérrez *et al.* (2006) quando utilizou diluente comercial acrescido de 5 e 50% de extrato gel de *Aloe vera*, na qual obteve resultado de 50% e 39,2% no sêmen criopreservado.

Na espécie caprina vários estudos discorrem com valores baixos da motilidade progressiva. Silva (2017) ao avaliar sêmen pós-descongelado de caprinos nativos, obteve valores de 10,9%, Câmara *et al.* (2019) obteve valores de 22% e 6%. Esse parâmetro espermático é de grande importância na escolha de reprodutores e também na avaliação de protocolos de congelamento seminal (CÂMARA *et al.*, 2019; SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2017).

No que se refere aos parâmetros analisados pelo software SCA®, os parâmetros: VCL, VSL, VAP do sêmen refrigerado e criopreservado, nos tratamentos controle e ACP-101 foram significativamente superiores ($p < 0,05$) na comparação com os tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* respectivamente (tab. 1 e 2). Melo (2010) obteve resultados superiores com tratamentos contendo 5 e 10% de extrato *in natura* de *Aloe vera*, na comparação com os tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera*, podendo ser explicado pela consistência do diluente, devido a menor concentração de extrato de *Aloe vera*. Santiago *et al.* (2017), ao utilizarem análise computadorizada no sêmen descongelado de caprinos, obtiveram valores próximos para VCL ($69,6 \mu\text{m/s} \pm 8,4$), VSL ($42,9 \mu\text{m/s} \pm 8,1$), VAP ($51,6 \mu\text{m/s} \pm 8,8$) ao descrito no presente estudo.

A viabilidade espermática foi semelhante nos tratamentos controle e ACP-101 para o sêmen refrigerado e criopreservado, em que apresentaram comportamentos similares, no entanto o tratamento ACP-101 apresentou resultados superiores ($p < 0,05$) aos tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* (tab. 1 e 2). Melo (2010), trabalhando com 5 e 10% de extrato *in natura* de *Aloe vera*,

obteve resultados semelhantes aos tratamentos controle e ACP-101, no entanto, os resultados dos tratamentos ACP-101/*Aloe vera* e *Aloe vera* do presente estudo foram inferiores.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da cinética espermática e da viabilidade em sêmen refrigerado de caprino diluído meio à base de água de coco em pó (ACP-101), ACP-101/*Aloe vera*, *Aloe vera* e Tris (controle)

Parâmetros	Controle	ACP	ACP/ <i>Aloe vera</i>	<i>Aloe vera</i>
Motilidade Total (%)	89.57 ± 8.15a	88.30 ± 12.67a	55.26 ± 32.94b	61.97 ± 33.56b
Motilidade Progressiva (%)	35.85 ± 16.71a	39.99 ± 14.11a	8.77 ± 10.35b	16.50 ± 13.89b
Veloc. Curvilínea (µm/s)	89.42 ± 11.71a	86.40 ± 12.54a	43.18 ± 22.31b	49.58 ± 31.55b
Veloc. retilínea (µm/s)	48.55 ± 10.72a	48.15 ± 9.21a	22.68 ± 14.54b	25.32 ± 17.85b
Veloc. média do percurso (µm/s)	65.08 ± 12.62a	65.89 ± 12.74a	31.43 ± 17.01b	36.34 ± 24.49b
Viabilidade (%)	86.80 ± 5.40a	87.73 ± 7.03a	57.14 ± 30.43b	58.15 ± 28.53b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa que houve diferença estatística entre os diluentes em cada tempo de avaliação (P<0,05).

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos parâmetros cinéticos espermáticos e da viabilidade em sêmen congelado-descongelado de caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101), ACP-101/*Aloe vera*, *Aloe vera* e Tris (controle).

	Tris	ACP	ACP/ <i>Aloe vera</i>	<i>Aloe vera</i>
Motilidade Total (%)	33.13 ± 17.4ab	42.99 ± 19.54a	23.58 ± 19.28b	23.56 ± 19.14b
Motilidade Progressiva (%)	10.84 ± 7.94a	15.91 ± 10.73a	3.79 ± 5.13b	2.89 ± 3.48b
Veloc. Curvilínea (µm/s)	71.86 ± 13.15a	73.46 ± 14.92a	38.38 ± 23.98b	39.05 ± 25.24b
Veloc. retilínea (µm/s)	45.78 ± 14.66a	42.52 ± 12.69a	18.60 ± 12.71b	20.26 ± 14.30b
Veloc. média do percurso (µm/s)	56.29 ± 15.70a	60.03 ± 15.58a	28.53 ± 18.94b	27.77 ± 18.77b
Viabilidade (%)	38.13 ± 12.47ab	48.10 ± 15.39a	25.43 ± 19.34b	30.33 ± 22.61b

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha significa que houve diferença estatística entre os diluentes em cada tempo de avaliação (P<0,05).

4 CONCLUSÃO

A utilização do ACP-101 associado aos crioprotetores proporciona um meio eficaz para criopreservação do sêmen de caprinos. No entanto, a utilização de *Aloe vera* em associação ou não com o ACP-101, mostrou-se ainda ineficiente na criopreservação do sêmen de caprinos, apresentando motilidade parâmetros inviáveis para a utilização *in vivo* do sêmen descongelado.

AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem o apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) para financiamento de projetos e bolsas de pesquisa, Laboratório criogênico do Departamento de Física

e do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal / UECE.

REFERÊNCIAS

BISPO, C. A. S.; PUGLIESI, G.; PALHÃO, M.P. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 100, p. 54-8, 2011.

CÂMARA, T. S.; SOUSA JÚNIOR, A.; BARÇANTE, F. P. S.; SILVA, J. H. L.; SOUSA, M. S.; MACHADO, A. A. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MONTENEGRO, A. R.; NUNES, J. F. Comparação da qualidade seminal de caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica no Nordeste brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(4), 1260–1268, (2019).

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

DERIVAUX J. Reproducción de los animales domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza. 1982.

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

HAFEZ B.; HAFEZ E. S. E. Reprodução animal. 7a ed. São Paulo: Manole, p. 513, 2004.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*, v.55, p.193-203, 1998.

MELO, C. C. S. Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando acp-101® com duas concentrações de aloe vera ou gema de ovo. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará, Brasil, p-73, 2010.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, v. 3, n. 5, p. 403-39, 1997.

NUNES, J.F. Biotécnicas reprodutivas aplicadas aos pequenos ruminantes. Fortaleza: Tecnograf, 2010, p. 64.

NUNES, J.F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie “in vitro” des spermatozoides de boue. Paris, (Tese: Doutorado em Veterinária), Université Pierre et Marie Curie, Paris, 33p., 1982.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, (in press), 2005.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 5, p. 96-98, 2002.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; DELGADILLO, J. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Anim. Reprod. Sci.*, v.181, p.141-150, 2017.

SILVA, J.L. Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos Azul, Canindé e Moxotó nas estações seca e chuvosa. 2017. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

VELOSO, C. C.; PEGLOW, K. Plantas Medicinais. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003.