



Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

ANA LIZA PAZ SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Pecari
tajacu* LINNEAUS, 1758)**

MOSSORÓ-RN
2015

ANA LIZA PAZ SOUZA

Otimização de protocolos de criopreservação do sêmen de
catetos (*Pecari tajacu* Linneaus, 1758)

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido de Mossoró, para a obtenção do
título de Doutora em Ciência Animal.

Departamento:

Ciências Animais

Área de Concentração:

Morfofisiologia e Biotecnologia

Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Mossoró-RN

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

S725o Souza, Ana Liza Paz.

Otimização de protocolos de criopreservação do sêmen de catetos (*Pecari tajacu* LINNEAUS, 1758) / Ana Liza Paz Souza. - Mossoró, 2015.

145f: il.

Orientador: Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

1. Cateto. 2. *Aloe vera*. 3. Criopreservação. 4. Dodecil Sulfato de Sódio. 5. Lipoproteína de Baixa Densidade. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT

CDD 636.9734

Bibliotecária: Vanessa de Oliveira Pessoa
CRB-15/453

FOLHA DE AVALIAÇÃO

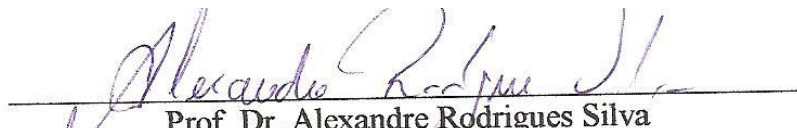
Nome do Autor: Ana Liza Paz Souza

Título: Otimização de protocolos de criopreservação do sêmen de catetos
(*Pecari tajacu* Linneaus, 1758)

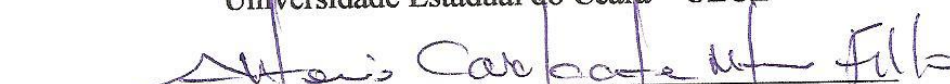
Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal
Rural do Semi- Árido de Mossoró, para a
obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

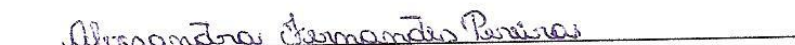
Data: 10/02/2015

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA


Profa. Dra. Carmina Sandra Brito Salmito Vanderley
Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof. Dr. Antonio Cavalcante Mota Filho
Faculdade Terra Nordeste – FATENE


Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA


Profa. Dra. Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte
Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA

Mossoró-RN
2015

Dedicatória,

Ao único que é digno de receber toda honra e toda glória!

Porque Dele, por Ele, para Ele são todas as coisas!

Meu Deus

AGRADECIMENTOS

À minha mãezinha, Maria Auxiliadora Ferreira Paz, minha estrutura, mulher forte, que não mediu esforços para me dá o bem mais precioso, o estudo. Te amo muito mamãe!

Aos meus irmãos Artur Luiz Ferreira Paz e André Levi Ferreira Paz, presentes de Deus na minha vida.

A meu esposo Manoel Nilson Batista Filho, pela amizade, confiança, paciência, força e amor que tem me dado, meu porto seguro.

A minha pequena florzinha, Naila Cecília, que mesmo ainda dentro do meu ventre já me traz uma sensação única e inexplicável.

A minha cunhada e amiga Gleiziely Melo por compartilhar comigo as minhas aflições e por me presentear com minha sobrinha que tanto amo, Ana Lavínia.

A minha família adotiva Santiago de Azevedo, por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao meu orientador Alexandre Rodrigues Silva, por me orientar com tamanha dedicação, acreditou em mim e pacientemente me ensinou além do que há em livros, me ensinou a ser perseverante, a ter autoconfiança e me incentivou a fazer a diferença. A quem muito admiro.

Aos meus colegas de pesquisa do laboratório de conservação de germoplasma animal que muito me ajudaram; Gabriela Lima, Gislayne Peixoto, Thibério Castelo, Andreia Silva, Lívia Campos, Camila Praxedes, Luana Bezerra, Artur Brilhante, Artur Lago. Em especial às minhas amigas, irmãs Gabriela Lima e Gislayne Peixoto que estavam sempre ao meu lado em qualquer situação.

Ao Professor Dr. Moacir Franco de Oliveira por está sempre disponível a me ajudar disponibilizando o seu tempo nas minhas coletas.

Aos funcionários do CEMAS, Seu Almeida pela coragem e força de vontade a me ajudar.

Ao Professor Dr. Marc Henry pelos conhecimentos e ajuda na extração da lipoproteína de baixa densidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UFERSA e a todos os seus professores e funcionários.

As minhas três inseparáveis amigas Polyanna Dantas, Maria Marília e Jussara Figueiredo que mesmo de longe acompanharam mais essa batalha.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que torceram por mim.

Muito Obrigada!

RESUMO

Souza, A L P. **OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNEAUS, 1758)**. Universidade Federal Rural do Semi-Arido, UFERSA - Mossoró, RN 2015.

A presente tese teve como objetivo aperfeiçoar protocolos de criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*). Para tanto, foram utilizados animais adultos oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), cujo sêmen foi coletado por eletroejaculação e imediatamente avaliado. O primeiro experimento objetivou avaliar o efeito da lipoproteína de baixa densidade (LDL) purificada, em relação à gema de ovo (G) e determinar a concentração ideal (20%, 10% e 5%) para criopreservação de sêmen em catetos. Após a análise dos dados verificou-se que a LDL (20%) pode ser utilizada em substituição à gema de ovo, tendo sido verificados $36.4 \pm 5.3\%$ e $21.8 \pm 6.9\%$ de motilidade espermática total após a descongelação, respectivamente. No segundo experimento, avaliou-se a ação do gel de *Aloe vera* (AV) tanto na refrigeração quanto na congelação do sêmen de catetos, em diferentes concentrações (20%, 10%, 5%) ou associado à gema de ovo (10%:10%). Verificou-se que o gel de *Aloe vera* (20%) se mostrou eficiente para a refrigeração a 5°C, mantendo a longevidade espermática por até 48 horas de avaliação apresentando uma motilidade total de $54.2 \pm 21.3\%$; quanto ao processo de criopreservação, verificou-se que o uso de *Aloe vera* a 20% pode substituir a gema de ovo, porém a associação desta com a gema promoveram a melhor preservação da viabilidade ($32.7 \pm 2.3\%$), resposta osmótica ($37.8 \pm 4.2\%$) e integridade de membrana (40.2 ± 3.1). No terceiro experimento verificou-se a ação da adição (0,5% e 1,0%) do detergente a base de dodecil sulfato de sódio (SDS), Equex[®]STM, no sêmen de catetos. Entretanto, observou-se que este, em nenhuma concentração proposta, foi eficiente em aumentar a longevidade da célula espermática de catetos além dos 15 minutos, conforme previamente descrito para a espécie. Os experimentos realizados foram suficientes a responder as hipóteses propostas, sendo úteis para o aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*).

Palavra Chave: Cateto, Criopreservação de sêmen, Lipoproteína de baixa Densidade, Dodecil Sulfato de Sódio, Gel de *Aloe vera*.

ABSTRACT

Souza, A L P. **CRYOPRESERVATION PROTOCOLS OPTIMIZATION OF SEMEN COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* LINNEAUS, 1976).** Federal Rural University of the Semi-Arid, Mossoró, RN 2015.

The present thesis had as objective optimized peccaries semen cryopreservation protocols (*Pecari tajacu*). Therefore, adult animals were used originated from the Multiplication Center of Wild Animals (CEMAS) of the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), which semen was collected by electroejaculation and immediately evaluated. The first experiment aimed at evaluating the effect of low-density lipoprotein (LDL) purified in relation to egg yolk (G) and defines the ideal concentration (20%, 10% and 5%) for semen cryopreservation in peccaries. After the data analysis it was found that LDL (20%) can be used to replace egg yolk having been verified 36.4 ± 5.3 and $21.8 \pm 6.9\%$ of the total sperm motility after thawing, respectively. The second experiment evaluated the action of *Aloe vera* gel (AV) both refrigeration and in the peccaries of semen freezing in different concentrations (20%, 10%, 5%) or associated with egg yolk (10%:10%). It was found that *Aloe vera* gel (20%) proved to be efficient cooling at 5 ° C, maintaining the longevity of sperm for up to 48 hours of total motility assessment having a $54.2 \pm 21.3\%$; as the cryopreservation process, it was found that the use of *Aloe vera* 20% can replace egg yolk, but its association with gem promoted better preservation of viability ($32.7 \pm 2.3\%$), osmotic response ($37.8 \pm 4.2\%$) and membrane integrity (40.2 ± 3.1). In the third experiment evaluated the addition of the action (0.5% and 1.0%) of base detergent sodium dodecyl sulfate (SDS), Equex[®]STM, the peccaries of semen. However, it was observed that, at any concentration proposal was effective in increasing the longevity of sperm cell peccaries over 15 minutes as previously described for the species. The experiments have been sufficient to answer the hypotheses and are useful for the improvement of semen cryopreservation protocols of collared peccary (*Pecari tajacu*).

Keyword: Peccaries, semen cryopreservation, low density lipoprotein, Sodium dodecyl sulfate, *Aloe vera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie <i>Pecari tajacu</i>	24
Figura 2: Testículo de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) demonstrando a bolsa testicular despigmentada e sem pelos grosseiros.....	26
Figura 3: Testículo de cateto (<i>Pecari tajacu</i>) dissecado demonstrando a fásia espermiática fibrosa.....	27
Figura 4: Imagem histológica do testículo de cateto (<i>pecari tajacu</i>).....	28
Figura 5: Pênis do cateto (<i>Pecari tajacu</i>) em forma de espiral.....	29
Figura 6: Diagrama da ação da lipoproteína de baixa densidade.....	46

Artigo 3

Innovative use of *Aloe Vera* for collared peccary (*Pecari tajacu*) semen conservation

Figure 1: Values (means $\pm$ SEM) for sperm viability, morphology and osmotic response in collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) chilled semen (n=5) diluted in Tris plus egg yolk (20%) or <i>Aloe vera</i> extract (20%), storage during 48h at 5 °C. (a,b) case letters indicate significant differences for the treatment egg yolk over time and (A,B) case letters indicate significant differences for the treatment <i>Aloe Vera</i> over time (P<0.05).....	113
--	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores para as características dos espermatozoides epididimários de catetos (<i>Pecari tajacu</i> ; n = 9), coletados por flutuação e lavagem retrógrada, após a recuperação (AR) e após centrifugação (AC).....	30
Quadro 2: Características seminais de catetos (<i>Pecari Tajacu</i>) obtidos por eletroejaculação.....	34
Quadro 3: Defeitos das células espermáticas de catetos (<i>Pecari tajacu</i>), (n=10), utilizando diferentes métodos de coloração.....	37
Quadro 4: Morfometria da célula espermática de catetos (n = 10).....	37
Quadro 5: valores de concentração espermática de catetos (<i>Pecari tajacu</i>).....	38
Quadro 6: Componentes da Aloe vera e sua atuação.....	47

Artigo 2

Comparison of egg yolk and different purified low-density lipoprotein (LDL) concentrations for the collared peccary (*Pecari tajacu*) semen freezing

Table 1: Semen characteristics in fresh ejaculates of collared pecaries (<i>Pecari tajacu</i>) collected by electroejaculation (n=11).....	90
Table 2: Values for sperm motility and vigor (Mean $\pm$ EP) in collared pecaries (<i>Pecari tajacu</i>) (n=11) semen collected by electroejaculation through the freezing – thawing process, using Tris extender added of 20% egg yolk (EY) or low-density lipoprotein (LDL) at 5%, 10% or 20%.....	90
Table 3: Characteristics (mean $\pm$ EP) semen from collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) collected by electroejaculation (n=11), after freezing-thawing procedures, at using Tris extender added of 20% egg yolk (EY) or low-density lipoprotein (LDL) at 5%, 10% or 20%.....	91

Artigo 3

Innovative use of *Aloe Vera* for collared peccary (*Pecari tajacu*) semen conservation

Table 1: Values (means $\pm$ SEM) for kinematic parameters of sperm motility in collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) chilled semen diluted in Tris plus egg yolk (EY) or <i>Aloe vera</i> extract (AV), storage during 48h at 5 °C.....	114
Table 2: Values (means $\pm$ SEM) for sperm morphology, viability, osmotic response and plasma membrane integrity in collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) frozen-thawed semen (n=12) diluted in Tris plus egg yolk or <i>Aloe vera</i> extract in different concentrations.....	115

Table 3: Semen characteristics in after freezing-thawing procedures in analyses computer (CASA) collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) collected by electroejaculation (n=12), (p<0.05).....	115
--	-----

Artigo 4

Efeito do detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex® STM) na criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*)

Tabela 1: Características (média ± E.P) do sêmen fresco de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) avaliado pela análise computadorizada (CASA), (n=12), (p≤0.05).....	124
--	-----

Tabela 2: Valores (média ± E.P) de Viabilidade e Fluorescência (IP/CFDA) verificada no sêmen descongelado de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) diluído em Tris gema/ <i>Aloe vera</i> , acrescida de diferentes concentrações (0, 0,5 ou 1,0%) de detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex® STM Paste), submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....	125
--	-----

Tabela 3: Valores (média ± E.P) de resposta osmótica e Morfologia (normais) verificada no sêmen descongelado de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) diluído em Tris gema/ <i>Aloe vera</i> , acrescida de diferentes concentrações (0, 0,5 ou 1,0%) de detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex® STM Paste), submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....	125
---	-----

Tabela 4: Características (média ± E.P) do sêmen descongelado de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ <i>Aloe vera</i> , acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....	134
--	-----

Tabela 5: Características (média ± E.P) do sêmen descongelado de catetos (<i>Pecari tajacu</i>) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ <i>Aloe vera</i> , acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....	134
--	-----

Tabela 6: Características (média $\pm$ E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex[®] STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....135

Tabela 7: Características (média $\pm$ E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex[®] STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12).....135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µm	Micrometro
AB	Azul de Bromofenol
ACP	Agua de coco em pó
ALH	Amplitude de Deslocamento Linear da cabeça
ANOVA	Análise de Variância
ANX5	Annexin 5
AV	Aloe vera
BCF	Frequência de Batimento Flagelar Cruzado
Bdh	Bodhesin
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
BTS	Beltsville Thawing Solution
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	Análise Computadorizada de Sêmen
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EEJ	Eletroejaculação
EP	Erro Padrão
EUA	Estados Unidos da América
g	grama

GPX	Glutationa Peroxidase
h	Hora
HOST	Teste hipo-osmótico
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
PI	Iodeto de Propídeo
IUCN	International Union for Conservation of Nature
IV	Intravenoso
KDa	kilodalton
Kg	Quilograma
L	Litro
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LIN	Linearidade
m	Metro
mA	Microampere
Mg	Miligrama
Min.	Minuto
mL	Mililitro
mOsm	Miliosmól
MPI	Integridade de Membrana Plasmática
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico

PSP1	Espermadesinas
s	Segundo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
STR	Retilinearidade
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethane
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
V	Volume
VAP	Velocidade Média da Trajetória
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade linear Progressiva
v	Volt

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	Mais ou menos
$<$	Menor
$\leq$	Menor igual
$\%$	Porcentagem
®	Marca Registrada
10^6	Milhões

SUMÁRIO

1. Introdução	21
2. Revisão de Literatura	24
2.1 Espécie <i>Pecari tajacu</i>	24
2.2 Aspectos básicos da anatomia do reprodutor masculino de catetos (<i>Pecari tajacu</i>).....	26
2.3 Tecnologia de sêmen de Catetos: Estado da Arte	29
2.3.1 Obtenção de gametas masculinos	29
2.3.2 Parâmetros seminais	32
2.3.3 Refrigeração de sêmen	38
2.3.4 Congelação de Sêmen	39
2.4 Importância da criopreservação	41
2.4.1 Crioprotetores Penetrantes	42
2.4.2 Crioprotetores não penetrantes	44
2.4.3 Aditivos	49
3. Referências Bibliográficas	50
4. Justificativa	64
5. Hipóteses Científicas	65
6. Objetivos.....	66
7. Capítulo 1: Artigo de Revisão: Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens.....	68

8. Capítulo 2: Comparison of egg yolk and different purified low-density lipoprotein (LDL) concentrations for the collared peccary (<i>Pecari tajacu</i>) semen freezing	74
9. Capítulo 3: Innovative use of <i>Aloe Vera</i> for collared peccary (<i>Pecari tajacu</i>) semen conservation.....	93
10. Capítulo 4: Efeito do detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex® STM) na criopreservação de sêmen de catetos (<i>Pecari tajacu</i>)	117
11. Conclusões Finais	136
12. Considerações e Perspectivas	137
13. Anexos	138
I. Efeito da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) na congelação de sêmen de catetos (<i>Pecari Tajacu</i>).....	139
II. Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (<i>Tayassu tajacu</i>).....	141
III. <i>Aloe Vera</i> use on short-term preservation of Collared Pecari (<i>Pecari tajacu</i>) semen.....	142
IV. Innovative use of <i>Aloe vera</i> as a cryoprotectant for the Collared Peccaries (<i>Pecari tajacu</i>) semen freezing.....	143
V. Carta Submissão (Artigo 2).....	144
VI. Carta Submissão (Artigo 3).....	145

1. INTRODUÇÃO

Durante a última década, a espécie *Pecari tajacu*, popularmente conhecida como cateto ou porco-do-mato, tem recebido especial atenção pela comunidade científica (NOGUEIRA e NOGUEIRA-FILHO, 2011). Atualmente, classificada como uma população estável (IUCN, 2014), esta espécie tem sido considerada de grande interesse para a reprodução em cativeiros, bem como para produção comercial (MAYOR et al., 2007). Salienta-se que sua criação em cativeiro é considerada uma estratégia de conservação, pelo aumento do estoque populacional, pela diminuição de pressão da caça e do tráfico e, principalmente, pela possibilidade de conservação de remanescentes florestais em regiões que têm sofrido o impacto, ocasionado por outras atividades econômicas (SANTOS et al., 2009). Ressalta-se ainda a grande demanda internacional pela carne e artigos de luxo oriundos da pele do cateto (FANG et al., 2008).

Diante do exposto, em virtude da sua importância, faz-se necessário conhecer a biologia reprodutiva e desenvolver biotécnicas reprodutivas apropriadas para a espécie visando a otimização do seu desempenho zootécnico em cativeiro. Assim, a criopreservação de gametas masculinos aparece como um importante instrumento para a reprodução de animais silvestres, incluindo os catetos (CASTELO et al., 2010a; SILVA et al., 2013), sendo que tal intervenção se torna bastante útil na manutenção da diversidade genética (HIEMSTRA et al., 2005).

Estudos recentes sobre criopreservação têm como intuito principal minimizar os efeitos estressantes do processo, os quais incluem as variações de temperatura, exposição àquelas não inerentes a cada animal, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor de congelação e pela formação e

dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, que comprometem a viabilidade da célula espermática (WATSON e MARTIN, 2000). Essas alterações podem ser influenciadas positivamente com a adição de diferentes substâncias ao diluidor, promovendo melhores resultados após a descongelação.

Os protocolos de criopreservação abrangem o uso de diluentes e crioprotetores. Dentre os diluentes mais utilizados em espécies selvagens destacam-se o Tris (tris-hidroximetil-aminometano, OLIVEIRA et al., 2011), o TES (VALLE, 2007) e, mais recentemente aquele à base de água de coco em pó (ACP[®]), (SILVA et al., 2013), cujas características particulares se modificam de acordo com cada espécie animal envolvida. Esses diluentes objetivam, primordialmente, oferecer nutrientes essenciais, utilizados como fontes de energia, bem como tampão eficaz que previnam as mudanças nocivas de pH e estabilizadores de membrana, favorecendo a sobrevivência espermática (CONCANNON e BATISTA, 1989).

Adicionalmente, para reduzir os efeitos de crioinjúrias, duas classes de crioprotetores são utilizados, estes classificados como crioprotetores penetrantes, como o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol e dimetilssulfóxido (VAJTA e NAGY, 2006); e os não penetrantes, como os açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e em alguns casos, aminoácidos (AMANN e PICKETT, 1987). A gema de ovo é um crioprotetor não penetrante que tem ampla utilização na criopreservação de sêmen das mais diversas espécies selvagens como gazelas (*Gazella cuvieri*, GARDE et al., 2008), cateto (*Pecari tajacu*, ALVES et al., 2013) e elefantes (*Elephas maximus indicus*, IMRAT et al., 2013), apresentando bons resultados de motilidade após o processo de congelação. Embora a gema possua grandes qualidades, estudos vêm sendo realizados com o intuito da substituição da mesma pela sua lipoproteína de baixa densidade (LDL) purificada (DONG et al., 2011). No entanto, com o intuito da utilização de um produto

de origem vegetal, o gel de Aloe vera apresentou bons resultados de motilidade espermática como crioprotetor para o sêmen de ovinos (GUTIÉRREZ et al., 2006) e caprinos (AGUIAR et al., 2012), sendo portanto uma possível alternativa para substituir a gema de ovo.

Além de crioprotetores, outros aditivos podem ser incorporados ao diluente de sêmen a fim de incrementar sua ação, tais como, estimulantes, antioxidantes e detergentes. Acredita-se que os detergentes a base de dodecil sulfato de sódio (SDS), Equex STM Paste® (Nova Chemical Sales, Scituate Inc., M.A., EUA) e Orvus ES Paste® (Proctor & Gamble, Cincinnati, OH, EUA), embora tenham sua ação pouco elucidada, dissolvam as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando seu potencial de penetração na membrana plasmática e, por consequência, sua ação crioprotetora (HOLT, 2000; PEÑA et al., 2003). Contudo, sua aplicação em associação a outras substâncias é ainda desconhecida no sêmen de catetos.

Na tentativa de se aprimorar os protocolos de criopreservação de sêmen de catetos, visando o intercâmbio de seu material genético entre criatórios radicados em regiões distantes, ou ainda no intuito de se formar um banco de germoplasma para a espécie, justifica-se a realização de estudos como o exposto na presente tese, a qual se propôs a elucidação do efeito de diferentes substâncias adicionadas aos diluentes do sêmen nesta espécie com fins de criopreservação.

2.1 Espécie *Pecari tajacu*

O cateto (*Pecari tajacu*, LINNAEUS, 1758) pertence ao reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Classe *Mammalia*, ordem dos *Artiodáctilos*, subordem *Suiforme*, família dos *Tayassuideos*. A família *Tayassuidae* é constituída pelos artiodáctilos pequenos (75 centímetros a 1,0 metro de comprimento). Estes são *Suiformes* de quatro dígitos no membro torácico e três no membro pélvico, orelhas e olhos pequenos, nariz em forma de tromba, cauda muito curta, corpo cobertos por pelos grosseiros, membros proporcionalmente delgados em contraste com o corpo robusto e dentes caninos superiores relativamente pequenos, pontudos cortantes e dirigidos para baixo (Figura 1), (DESBIEZ et al., 2014).

Figura 1: Espécie *Pecari tajacu* – Fonte: Arquivo pessoal.



Os catetos se separaram da família *Suidae* há dezenas de milhões de anos (BERNIRSHCHKE, 1974). Portanto, apesar de serem bastante semelhantes ao porco doméstico e ao javali, os catetos diferem dos mesmos em alguns aspectos, como por exemplo: pelo estômago que é dividido em três compartimentos (CAVALCANTE FILHO, 1996), vesícula biliar ausente, membros pélvicos contendo três dígitos e pela presença de uma glândula de cheiro na região dorsal próximo à cauda, cuja secreção tem odor forte e coloração esbranquiçada (SOWLS, 1974). Esta glândula secreta continuamente um líquido, cujo odor tem certamente um grande papel no reconhecimento individual e movimento do bando, porque frequentemente esfregam o focinho nas glândulas de seus congêneres (WALLACH e BOEVER, 1983).

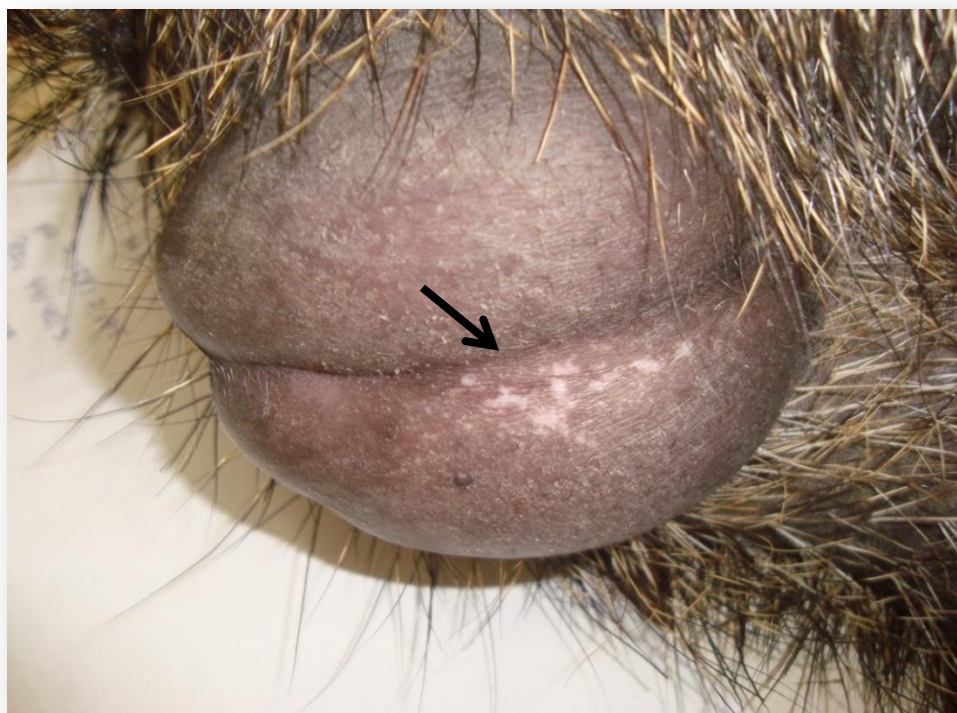
A fisiologia reprodutiva do cateto é semelhante àquela dos suínos domésticos, acasalando-se durante todas as épocas do ano (WISLOCKI, 1931; FOWLER, 1986). Segundo observações de Bellantoni (1991), a maturidade sexual dos machos é atingida com 11 meses e a das fêmeas entre 8 a 14 meses. Considerado o mais produtivo dos ungulados americanos, o *P. tajacu* pode gerar de um a quatro filhotes por gestação e apresentar estro oito dias após o parto. Os filhotes são precoces, podendo acompanhar a mãe no mesmo dia do nascimento. Adquirem pelagem de adulto por volta dos 75 dias de vida. Os machos são sexualmente ativos a partir de um ano de idade e as fêmeas pouco antes de um ano (SANTOS, 2007).

Os machos e fêmeas são bem parecidos em tamanhos e coloração dos pelos; contudo, os jovens possuem uma cor marrom amarelada com uma faixa preta no membro posterior (BELLATONI, 1991). Os filhotes possuem pelagem mista de vermelho marrom e creme com faixa dorsal mais escura persistindo até um ano; alterando a tonalidade no segundo ano de vida (SOWLS, 1961).

2.2 Aspectos básicos da anatomia do sistema reprodutor masculino do cateto

De acordo com Wallach; Boever, (1983), a única diferença visual externa entre machos e fêmeas de catetos é a presença do escroto no macho. Nos pecaris o escroto localiza-se ventralmente ao ânus, projetando-se na superfície corporal, contornando os órgãos que contêm testículos e epidídimos (SONNER et al., 2004). A bolsa testicular se localiza na região pélvica, em posição intermediária entre a região perineal e inguinal, a pele da bolsa testicular possui pigmentação como no restante do corpo, porém não apresenta pelos longos e espessos, característicos de Tayassuideos, com apenas alguns pêlos finos (Figura 2) (SONNER et al., 2004).

Figura 2: Testículo de cateto (*Pecari tajacu*) demonstrando a bolsa testicular sem pêlos grosseiros, na seta a rafe testicular – Fonte: Arquivo pessoal.



Os testículos são posicionados mais ventralmente que nos suínos, (SONNER et al., 2004). Encontram-se envoltos por uma fáscia espermática fibrosa (figura 3), extremamente resistente (SONNER et al., 2004). Possuem duas margens (livre e

epididimária) e duas extremidades (capitata e caudata). Na extremidade capitata, localiza-se o funículo espermático, que contém artérias, ducto deferente, vasos linfáticos, veias, além de nervos, o músculo cremaster e a túnica vaginal. Na extremidade caudata, o epidídimo origina o ducto deferente (SONNER et al., 2004).

Figura 3: Testículo de cateto (*Pecari tajacu*) dissecado demonstrando a fásia espermática fibrosa (Seta) – Fonte: Arquivo pessoal.



De forma geral, os testículos têm como função primária a produção de espermatozoides e de hormônios, como a testosterona. Quando se analisa os testículos macroscopicamente, é possível observar a natureza enovelada dos túbulos seminíferos, os quais se direcionam para o mediastino (SONNER et al., 2004). Nos túbulos seminíferos, constituindo o chamado epitélio germinativo, encontram-se as células germinativas em seus vários estágios de desenvolvimento, e as células de suporte, denominadas células de Sertoli (COSTA et al., 2004). É no interior destes túbulos que

ocorre a espermatogênese na qual se trata de um processo sincrônico e regular de diferenciação celular pelo qual uma espermatogônia é gradativamente diferenciada numa célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. Essa diferenciação envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides (COSTA et al., 2004). Costa et al. (2010) determinaram que a espermatogênese do cateto é semelhante à espermatogênese de suíno (± 9 dias). Caracterizada pela alta eficiência na produção espermática, uma vez que os caititus possuem um dos mais baixos números de células de Sertoli por grama de testículo e uma das mais altas proporções volumétricas, em que 16% do parênquima é ocupados por compartimento intertubular e 84% por túbulos seminíferos (COSTA et al., 2004).

Um estudo realizado por Peixoto et al., 2012 em catetos, demonstraram não haver correlação entre a morfometria testicular e características seminais nessa espécie. Ainda, detectaram que os túbulos seminíferos apresentam diâmetro tubular de 222.22 ± 3.69 , espessura de epitélio 70.70 ± 1.32 e área de túbulos seminíferos de 67.76 ± 1.26 (Figura 4). Recentemente, foi também demonstrada a possibilidade de conservação do tecido testicular por meio de uma técnica de vitrificação em superfície sólida (SILVA et al., 2014). Quanto ao pênis do cateto, este é semelhante ao do suíno, apresentando-se em forma espiralada (Figura 5).

Figura 4: Imagem histológica do testículo de cateto (*Pecari tajacu*) – Fonte: Arquivo Pessoal.

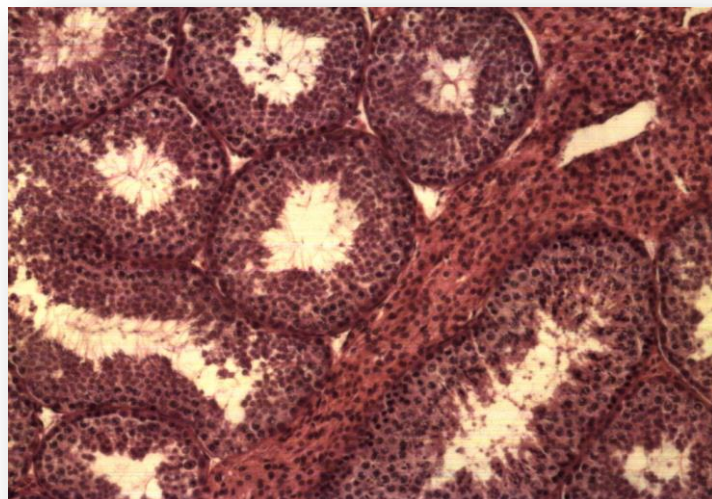


Figura 5: Pênis do cateto (*Pecari tajacu*) em forma espiralada – Fonte: Arquivo Pessoal.



2.3 Tecnologia de sêmen de catetos: Estado da arte

2.3.1. Obtenção de gametas masculinos

➤ Coleta epididimária

A obtenção de espermatozoides do epidídimo é de grande valia para animais silvestres e criadores de alto valor genético, em especial, dos mortos acidentalmente visto que o material genético é morfológicamente viável, com um adequado grau de maturidade e capacidade fertilizante (MONTEIRO et al., 2011).

Em catetos, foi descrito a coleta epididimária de espermatozoides, que se baseia na obtenção de espermatozoides diretamente do epidídimo seja pelo método de flutuação ou de lavagem retrógada, ainda, foi observada a necessidade de realização da centrifugação para remoção de possíveis contaminantes por sangue ou células epiteliais que por ventura venha a ocorrer pela coleta. Os autores relataram que tanto o método de

flutuação quanto lavagem retrógrada pode ser usado para recuperação de espermatozoides epididimários de catetos (Quadro 1), não recomendando a centrifugação das amostras, dado o risco de aumentar a percentagem de defeitos de cauda, levando a uma diminuição na viabilidade espermática (BEZERRA et al., 2014).

Quadro 1: Valores para as características dos espermatozoides epididimários de catetos (*Pecari tajacu*; n = 9), coletados por flutuação e lavagem retrógrada, após a recuperação (AR) e após centrifugação (AC). (BEZERRA et al., 2014)

Características	Flutuação		Lavagem retrógrada	
	AR	AC	AR	AC
Motilidade (%)	64.4 ± 10.6 ^a	61.1 ± 10.5 ^a	57.8 ± 13.2 ^a	40.0 ± 10.8 ^a
Vigor (0-5)	3.1 ± 0.3 ^a	2.9 ± 0.4 ^a	2.9 ± 0.3 ^a	2.2 ± 0.4 ^a
Viabilidade (%)	63.1 ± 5.2 ^a	50.5 ± 3.4 ^b	68.2 ± 5.7 ^a	53.8 ± 3.8 ^b
Integridade Funcional de membrana (%)	64.0 ± 5.2 ^a	50.5 ± 3.9 ^a	60.3 ± 7.3 ^a	56.2 ± 4.9 ^a

a. b sobrescritos na mesma linha, significa diferenças (P <0,05).

➤ Eletroejaculação

Em diferentes espécies, vários métodos podem ser citados para a obtenção de ejaculados, como manipulação digital, vagina artificial e eletroejaculação. No entanto, em animais selvagens devido à dificuldade e aos riscos que envolvem o manejo destes, a eletroejaculação (EEJ) aparece como o método de escolha para a coleta seminal. Este método se baseia na estimulação elétrica controlada do reflexo ejaculatório, através da intromissão de uma sonda transretal contendo eletrodos, acoplada a um aparelho produtor de voltagem específico (SILVA et al., 2004).

Em catetos, são citados diferentes protocolos de estimulação elétrica do reflexo ejaculatório. Costa e Paula, (2005) testaram dois protocolos de eletroejaculação onde,

concluiu-se que a utilização de três sessões de 15 estímulos de 12 V era suficiente para a obtenção de ejaculados. Já Castelo et al. (2010) descreveram um outro protocolo adaptado do protocolo existente para suíno, no qual obtiveram bons resultados. O protocolo consiste em estímulos contínuos iniciando-se com 10 repetições de 5 V, com a intensidade aumentada em 1 V, até atingir 12 V durante 10 minutos. Utilizando este mesmo protocolo, Peixoto et al. (2012) obtiveram um total de 52 ejaculados de catetos, e descreveram a variação individual e a média referente aos parâmetros seminais para a espécie. Adicionalmente, Kahwage et al. (2010) relatam o uso de um protocolo de estimulação baseado na aplicação de 45 ± 13 estímulos seguidos (12V, 3s por estímulo), até que se iniciasse a liberação da fração em gel do ejaculado nesta espécie.

Devido à agressividade dessas espécies ou pelo fato de não serem treinados para tal, para uma adequada eletroejaculação, faz-se necessária a determinação de um protocolo anestésico que viabilize sua realização mantendo a qualidade seminal bem como a segurança do animal e da equipe que o assiste (SILVA et al., 2004). Com esta finalidade, têm sido utilizados anestésicos para a coleta seminal em catetos tais como cloridrato de cetamina (HELLGREN et al., 1989), cloridrato de zolazepan associado ao cloridrato de tiletamina (COSTA E PAULA, 2005), e acepromazina associado com cetamina (KAHWAGE et al. 2008).

No intuito de avaliar a interação entre o anestésico e o processo de eletroejaculação, Souza et al. (2009) testaram dois protocolos de anestesia, consistindo o primeiro deles no uso isolado do Propofol em bolus, e o segundo na associação tiletamina-zolazepam. Os autores verificaram uma superioridade do Propofol em promover o bem-estar dos animais, haja vista que o tempo de recuperação do estado anestésico com este foi de 73 min., enquanto que no uso da associação previamente citada foi de 185 min., em média. Além disso, o propofol proporcionou a coleta em

80% das tentativas, enquanto na associação tiletamina-zolazepam, apenas 40% dos animais foram coletados. Recentemente, Paiva et al. (2014) avaliaram o efeito do propofol associado ou não a medicamentos pré-anestésicos como o atipamezole e medetomidine sobre as características seminais, ereção e ejaculação e confirmaram que o propofol sozinho seria eficiente para coleta de sêmen por eletroejaculação em catetos.

2.3.2. Parâmetros seminais

Uma vez coletado o sêmen, o mesmo deve ter sua qualidade avaliada com base em parâmetros macroscópicos, como coloração e volume, e parâmetros microscópicos como motilidade, concentração, morfologia e viabilidade espermática. Os catetos têm gerado curiosidades a respeito de suas características seminais que datam de 1984, 1985 e 1989 quando Seager, Lochmiller e Hellgren, respectivamente, avaliaram o sêmen desta espécie. Desde então muitos trabalhos tem sido relatado na espécie.

➤ Características do sêmen de catetos

De acordo com Kawage et al. (2010), o sêmen de catetos pode ser dividido em três frações: uma pobre, constituída da secreção das glândulas acessórias; uma rica de células espermáticas; e uma fração gel. Segundo Hellgren et al. (1989), a fração gel pode vir em qualquer fração do ejaculado, embora seja mais provável na fração final. Ainda, Souza et al., 2009 relatam que a obtenção apenas da fração gel sugere uma ejaculação incompleta.

Sabe-se que o ejaculado é composto pela fração de espermatozoides e uma fração do plasma seminal que consiste em um fluido produzido pela rede testicular,

epidídimo e glândulas acessórias, contendo proteínas, enzimas, íons e hormônios (KARESKOSKI et al., 2008). Assim, estudos têm sido centrados sobre a origem e função das proteínas do plasma seminal. Em suínos, o animal mais próximo filogeneticamente do cateto, duas espermadesinas (26 kDa e 55kDa) foram identificadas como marcadores para a fertilização (FLOWERS, 2001) e também foi relatado que a proteína 26kDa estaria relacionada com a integridade da membrana espermática após o processo de criopreservação (BIANCHI et al., 2008). Neste sentido, Santos et al. (2014) detectaram um total de 179 proteínas no plasma seminal de catetos, destas podemos destacar a Clusterina ($19,7 \pm 8,3\%$), espermadesinas (PSP1 – $5,4 \pm 1,9\%$), bodhesin (Bdh-2 – $8,8 \pm 3,9\%$), glutathione peroxidase (GPX – $6,1 \pm 1,3\%$), albumin ($2,5 \pm 2\%$) e a annexin 5 (ANX5 – $2,01 \pm 1,5\%$). Os autores relataram que a Clusterina está relacionada negativamente com a quantidade de espermatozoides com membrana funcional e que as proteínas PSP1 e Bdh-2 assim como em suínos (TOPFER--PETERSEN et al., 2008) estão relacionadas com a capacidade fertilizante, por estarem relacionadas com espermatozoides móveis e metabolicamente ativos. Ainda, as proteínas com efeito antioxidante (GPX, ANX5 e albumin) assim como observado em outras espécies (DACHEUX et al., 2006, MOURA et al., 2010), em catetos provavelmente também apresentem a capacidade de manutenção da funcionalidade da membrana, impedindo a perda de motilidade e reação prematura do acrossoma.

➤ **Motilidade e vigor**

De acordo com o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013), a motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozoides móveis em uma amostra (0 – 100%); a intensidade desta motilidade, o vigor espermático, é expressa em escala que vai de 0 a 5.

Trabalhos de avaliação de sêmen de catetos foram realizados por diversos autores apresentando motilidade de $49,5 \pm 15,8\%$ por Lochmiller et al. (1985), $48,7 \pm 31,5\%$ por Costa e Paula (2005), até $85 \pm 8,0\%$ por Souza et al. (2009). Esta variação nos resultados encontrados, provavelmente, deve-se à época do ano e/ou clima característico da região aos quais os animais habitam.

Kawage et al., 2010 realizaram a coleta e avaliação de sêmen de catetos na Amazônia oriental de clima equatorial semiúmido no período de outubro de 2007 a fevereiro de 2009, perfazendo um total de 65 amostras (Quadro 2) e relacionaram que a redução nos parâmetros seminais pode ter ocorrido tanto em função de fatores ambientais como por fatores intrínsecos ao indivíduo (repouso sexual, enfermidades, comportamento, entre outros). Esta consideração corrobora com Peixoto et al. (2012) que realizaram um trabalho no bioma Caatinga, de clima semiárido, no período compreendido entre julho e novembro de 2010, onde se buscou reformular os parâmetros fisiológicos da espécie utilizando para tanto um total de 52 ejaculados e obtiveram resultados de motilidade e vigor superiores aos demais trabalhos até então publicados (Quadro 2). Na ocasião, os autores confirmaram que existe uma grande variação individual na espécie, mesmo estando os animais submetidos à mesma condição de criação.

Quadro 2: Características seminais de catetos (*Pecari Tajacu*) obtidos por eletroejaculação por Kawage et al., 2010 e Peixoto et al., 2012.

Variáveis	Kawage et al. (2010)	Peixoto et al. (2012)
Volume (mL)	$0,8 \pm 0,8$	$3,5 \pm 3,8$
Concentração ($\times 10^6$)	$138,1 \pm 154,0$	$80,0 \pm 70,0$
Motilidade (%)	$52,8 \pm 29,1$	$85,1 \pm 10,7$
Vigor	$2,1 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,9$
Integridade de Membrana (%)	$55,4 \pm 28,6$	$76,9 \pm 13,2$

➤ Avaliação da membrana plasmática

Para avaliação da funcionalidade da membrana espermática é realizado o teste hiposmótico. Este teste baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelular. Com o influxo da água para o interior da célula, há uma edemaciação celular, com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984). Para tanto, faz-se necessário determinar a osmolaridade de soluções específicas a serem utilizadas para determinada espécie. Com este intuito, Santos et al. (2013) testaram quatro osmolaridades de soluções a base de frutose (50, 100, 150 e 200 mOsm/L) bem como a água destilada (0 mOsm/L), a qual já havia inclusive sido testada de forma empírica nesta espécie (SOUZA et al., 2009; CASTELO et al., 2010). Os autores observaram que o número de espermatozoides reagidos diminuía de acordo com o aumento da osmolaridade do meio, concluindo então que o uso da água destilada, que apresentou a maior porcentagem (71,8%) de espermatozoides reagidos, seria a opção mais adequada para o uso do teste hiposmótico em catetos.

A avaliação da integridade das membranas espermáticas é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis às crioinjúrias (PENÃ et al., 2005). Assim, o uso de fluoróforos ou sua associação busca avaliar integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática (HAUGLAND, 2001). Neste sentido, Souza et al. (2013) realizaram a validação do uso da associação de dois fluoróforos, o Iodeto de Propídio (PI) e o Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) para avaliação da integridade de membrana de espermatozoides de catetos. Para a devida confirmação dos dados obtidos por meio do

uso destes fluoróforos foi realizado também a confecção de esfregaço corado com azul de bromofenol (AB).

O Iodeto de Propídio (PI) tem a propriedade de se ligar especificamente ao DNA, não atravessa a membrana plasmática íntegra, corando o núcleo de células com membrana plasmática lesada em vermelho. Já o Diacetato de Carboxifluoresceína é hidrolisado por esterases, produzindo Diacetato de Carboxifluoresceína livre que é retida dentro da célula com a membrana plasmática íntacta, exibindo coloração verde (CELEGHINE et al., 2005).

O teste de azul de bromofenol é realizado com o intuito de avaliar a funcionalidade da membrana através da confecção do esfregaço com uma alíquota de sêmen e a mesma proporção do corante. O corante penetra na célula que apresenta membrana desintegrada e cora em azul (SOUSA et al., 2013).

➤ **Morfologia e morfometria do espermatozoide de catetos**

A análise morfológica permite a avaliação qualitativa das células espermáticas para determinar o percentual de alterações na amostra de sêmen (RODRIGUEZ-MARTINEZ; ERIKSSON, 2000). Avaliações da morfologia da célula espermática têm sido associadas com a infertilidade e esterilidade masculina em diferentes espécies, sugerindo que os percentuais mínimos de espermatozoides morfolologicamente normais mantenham-se entre 80-70%. Recentemente, Sousa et al. (2013) descreveram a morfometria e a morfologia do espermatozoide de catetos através do uso de três diferentes métodos de coloração (Rosa de Bengala, Azul de Bromofenol e Eosina-Nigrosina). Em todos os métodos citados, a proporção de espermatozoides normais no ejaculado a fresco ficou acima de 80% demonstrando também que a patologia mais

encontrada no espermatozoide da espécie encontra-se na cauda (Quadro 3). Ainda neste estudo, a morfometria da célula espermática de cateto foi pela primeira vez descrita sendo observado que a cauda ocupa a maior proporção (89%) do espermatozoide, e a cabeça apresenta-se discretamente alongada (Quadro 4).

Quadro 3: Defeitos das células espermáticas de catetos (Pecari tajacu), (n=10), utilizando diferentes métodos de coloração.

Defeitos	Métodos de Coloração		
	Rosa de Bengala	Azul de bromofenol	Eosina-Nigrosina
Defeitos de Cabeça (%)	1.5	3	3.8
Defeitos de peça intermediária (%)	0.9	1.5	1.2
Defeitos de cauda (%)	6.5	8.4	5.5

Quadro 4: Morfometria da célula espermática de catetos (n = 10) por Sousa et al. (2013).

Variáveis	Média ± EP
Comprimento de cabeça (µm)	6,34 ± 0,018
Largura de cabeça (µm)	4,2 ± 0,019
Peça intermediária (µm)	13,29 ± 0,032
Comprimento de Cauda (µm)	32,25 ± 0,076
Comprimento total (µm)	50,68 ± 0,121

➤ Concentração espermática

A análise da concentração é definida como sendo o número de células espermáticas presentes em um ejaculado, por sua unidade de volume (CORRÊA et al., 2001). De acordo com Silva et al., 2014 a determinação correta da concentração no ejaculado possibilita a adequação na produção de doses utilizadas para a inseminação. Por outro lado, a mensuração incorreta deste parâmetro pode levar a problemas na

identificação de infertilidade ou, ainda, gerar prejuízos econômicos para um sistema de produção (OLDENHOF et al., 2010). Para tanto, Silva et al. (2014) verificaram a possibilidade de uso da espectrofotometria para determinação da concentração espermática em catetos, porém concluíram que o uso da câmara de Neubauer configura-se no método mais confiável para este propósito (SILVA et al., 2014). No quadro 5 apresenta-se alguns valores de concentração espermática encontradas no sêmen de catetos coletados por eletroejaculação verificados por diversos autores demonstrando que estes animais possivelmente estão submetidos a variações individuais bem como ambiental.

Quadro 5: valores de concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*).

Concentração ($\times 10^6/\text{mL}$)	
Castelo et al., 2010	506.6 $\pm$ 58.3
Peixoto et al., 2012	800 $\pm$ 70
Alves et al., 2013	439 $\pm$ 60.3
Silva et al., 2014	283,9 $\pm$ 30,8

2.3.3. Refrigeração de sêmen

A refrigeração de sêmen é caracterizada pela redução da temperatura, que originalmente encontra-se em torno de 37°C, para temperaturas próximas a 0°C; nesse período o espermatozoide sofre uma inibição reversível de seu metabolismo (CÂMARA & GUERRA, 2011). A redução da temperatura a níveis baixos é utilizada para deprimir o metabolismo dos espermatozoides e prolongar a sua vida fértil, possibilitando o seu

armazenamento e utilização por um maior período de tempo do que seria utilizado para o sêmen fresco (ANEL et al., 2006).

Em 2012, Garcia et al. avaliaram a influência da refrigeração a 17 °C ao longo do tempo sobre as características seminais de catetos, relatando que o sêmen refrigerado desta espécie pode ser usado para inseminação artificial por até 24h, quando diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS).

2.3.4. Congelação de sêmen

A congelação de sêmen possibilita o armazenamento a baixas temperaturas (-196°C) em botijão criobiológico e o intercâmbio deste material entre diferentes regiões, bem como a possibilidade de formação de bancos de germoplasma para uso futuro. Para a congelação de sêmen de catetos, o primeiro trabalho a reportar esta biotécnica foi descrito por Castelo et al. (2010a). Desde então, muitos trabalhos têm sido realizados com o intuito de se buscar um protocolo que permita a sobrevivência dos espermatozoides em todo o processo de congelação/descongelação, aumentando assim, a viabilidade espermática.

Na curva de congelação descrita por Castelo et al. (2010a), diretamente adaptada de um protocolo utilizado em suínos (SELLÉS et al., 2003), o sêmen processado foi mantido em um refrigerador programável por 4 h a 5 °C. As amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 µl, submetidas ao vapor de nitrogênio líquido a 3 cm por 20 min. e acondicionadas em botijão criobiológico (-196 °C). Neste estudo, o sêmen foi diluído em Tris e foram testados dois açúcares, frutose e glicose, no entanto não foram observadas diferenças entre eles. Ainda, foram testadas duas curvas de descongelação (37 °C por 1 min e 55 °C por 7 seg.) sem apresentar diferenças.

Outro trabalho também realizado por Castelo et al. (2010b) avaliou o efeito da centrifugação prévia para a remoção do plasma seminal de sêmen de catetos sobre a qualidade do sêmen congelado/descongelado a 37 °C/1min. Os autores concluíram que a centrifugação não é recomendada para ejaculados de catetos previamente a congelação, por diminuir a motilidade espermática e aumentar a porcentagem de defeitos morfológicos nas células. Em 2013, Alves et al. testaram três concentrações de gema (5, 10 e 20%) e duas de glicerol (3 e 6%) associados ao diluente Tris, demonstrando que tanto a concentração de 10 ou 20% de gema com 3% de glicerol mostraram-se eficientes para a criopreservação.

Como alternativa ao diluente Tris, Silva et al. (2012) demonstraram o uso do diluente a base de água de coco em pó (ACP), o qual foi testado adicionado de diferentes concentrações de gema (10 e 20%) e glicerol (1,5 e 3%), sendo obtidos os melhores resultados no uso do ACP adicionado de 20% de gema e 3% de glicerol. Partindo do pressuposto de que o uso de crioprotetores no processo de criopreservação pode causar danos à célula espermática após a descongelação e que esses deveriam ser retirados após a descongelação, Campos et al. (2014) avaliaram o efeito da centrifugação seguida da re-diluição pós-descongelação sobre a longevidade espermática de catetos. No entanto, foi observado que a centrifugação bem como a re-diluição, não aumentaram a longevidade das células espermáticas podendo ser realizada apenas com o intuito de aumentar o volume seminal.

Em 2013, Silva et al. testaram duas curvas de congelação: a primeira, uma curva lenta já descrita para catetos por Castelo et al., 2010; e a segunda, uma curva rápida descrita para cutias por Silva et al., 2012. Nesta, as amostras foram mantidas em caixa térmica por 40 min. até atingir uma temperatura de 15 °C, seguidos de mais 30 min. a 5 °C em refrigerador programável; as amostras foram envasadas e submetidas ao vapor de

nitrogênio por 5 min. e então mergulhadas em botijão (-196°C). Na ocasião, não foi verificada diferença entre as curvas, sendo sugerido, o uso da curva rápida por diminuir gastos e tempo. No mesmo experimento também foi avaliado o efeito do volume da palheta (0,25 µl ou 0,50 µl) utilizada para o envase do sêmen, não tendo sido evidenciada diferença estatística. Porém, os autores demonstraram que a descongelação em banho-maria a 37 °C/1 min. foi significativamente superior àquela realizada 70 °C/8 seg.

Apesar destes relatos já existentes acerca da criopreservação do sêmen de *Pecari tajacu*, é necessária a constante busca pelo aprimoramento do processo, visando obter um protocolo ideal que maximize a sobrevivência espermática pós-descongelação. Fazendo-se necessário, no entanto o conhecimento a cerca da importância da criopreservação bem como a ação de crioprotetores.

2.4 Importância da criopreservação

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, proporcionando a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento (PEGG, 2007) em nitrogênio líquido (-196 °C). Tal processo se baseia na desidratação da célula, com remoção máxima da água intracelular antes de submetê-la às baixas temperaturas e, com isso, reduzir a formação de grandes cristais de gelo (DALCIN; LUCCI, 2010).

Durante a congelação, a temperatura declina e a água do meio se cristaliza, levando ao aumento da concentração de solutos extracelulares. Assim, quando a velocidade de congelação é lenta, a célula sofre desidratação. Porém, quando essa

velocidade é rápida, a célula não perde água o suficiente, havendo, então, formação de gelo intracelular. Estes cristais de gelo podem causar a morte celular por danos mecânicos (REICHENBACH et al., 2002).

As lesões ocasionadas pelo processo de congelação têm sido atribuídas às mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana do espermatozoide e em seu DNA, toxicidade do crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON; MARTIN, 2000). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico associado à adição e remoção de crioprotetores, assim como as alterações na concentração de soluto durante a congelação (WATSON; MARTIN, 2000).

No decorrer do processo de criopreservação a formação de cristais de gelo intracelular e o choque osmótico são fatores importantes que podem levar à morte celular (SANTOS et al., 2008). Na tentativa de se minimizarem os danos decorrentes da criopreservação é necessário adicionar substâncias denominadas crioprotetores, os quais protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura (GUYADER-JOLY, 1998; SANTOS et al., 2007).

O princípio do uso destas substâncias se baseia do fato de que a adição de solutos à água faz com que sua temperatura de congelação se torne mais baixa, retardando o aparecimento dos cristais e diminuindo a temperatura em que se dá o equilíbrio de congelação para uma temperatura inferior a 0 °C (KAROW, 2001). Os crioprotetores podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes (AMANN; PICKETT, 1987).

2.4.1 Crioprotetores Penetrantes

Os crioprotetores penetrantes consistem em pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formando pontes de hidrogênio com moléculas de água presente no interior da célula e diminuindo a temperatura de congelação, prevenindo, portanto, a formação dos cristais de gelo (JAIN; PAULSON, 2006). De forma geral, eles atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula e ligam-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma. Adicionalmente também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (JAIN; PAULSON, 2006). Os mais comumente utilizados na preservação de gametas são o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol e dimetilssulfóxido (VAJTA; NAGY, 2006).

O glicerol foi o primeiro crioprotetor a ser utilizado em espermatozoides. Trata-se de um álcool polihídrico altamente permeável, onde sua capacidade crioprotetora se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais, portanto, diminuindo a osmolaridade do meio de congelamento. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (DOEBBER, 1966).

No entanto, sabe-se que o glicerol pode produzir efeitos considerados tóxicos para as células espermáticas. Hammersted e Graham (1992) relatam que os efeitos tóxicos relacionados a esse crioprotetor são o estresse osmótico, associado à alteração da concentração de substâncias no interior e no exterior das células espermáticas, a modificação da membrana plasmática espermática, associada à habilidade de penetração pelos fosfolípidios, e a capacidade de ativar diversos mensageiros celulares, pela ligação a proteínas da membrana plasmática. Assim, Holt (2000b) afirma que a concentração

ideal de glicerol para criopreservação espermática e as consequências dos efeitos tóxicos desencadeados pelo mesmo, varia entre as diferentes espécies animais.

Dentre outros exemplos de crioprotetores penetrantes, destaca-se o etilenoglicol, o qual é também quimicamente definido como álcool, e possui quatro pares de elétrons isolados, tendo a possibilidade de ligação com átomos de hidrogênio em quatro sítios e a possibilidade de doar dois hidrogênios (KEITH, 1998). O etilenoglicol pode também efetuar ligações de hidrogênio na membrana dos espermatozoides. (KUNDU et al., 2000). Já o dimetilsulfóxido (DMSO) também apresenta interações com a molécula da água onde seu radical sulfoxido ($S=O$) tem a capacidade de formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila (OH), diminuindo assim o ponto de congelação da solução (MURTHY, 1998).

2.4.2 Crioprotetores Não Penetrantes

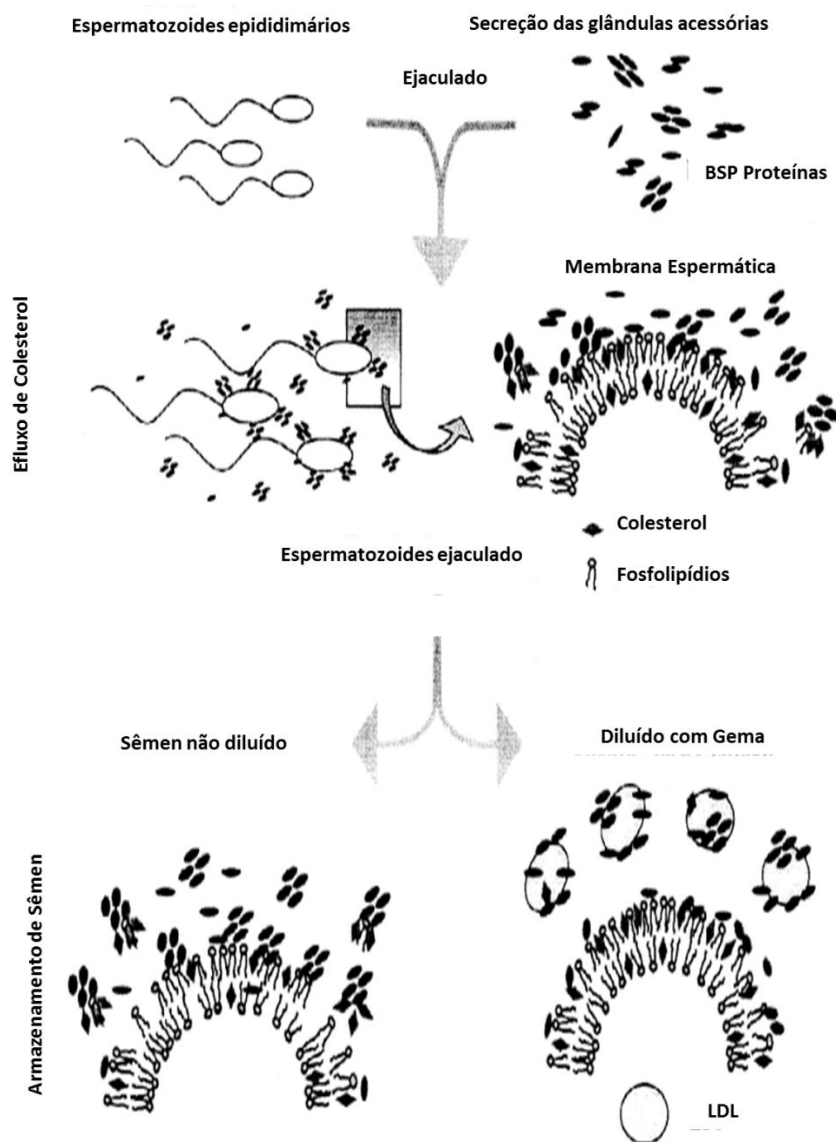
Os crioprotetores não penetrantes, conhecidos também como agentes de alto peso molecular, permanecem no meio extracelular retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (PEREIRA; MARQUES, 2008). Eles aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim a formação de cristais de gelo de seu interior durante a congelação (VAJTA; NAGY, 2006). São moléculas de alto peso molecular como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e, em alguns casos, aminoácidos (AMANN; PICKETT, 1987), as quais protegem as membranas celulares contra as injúrias do frio (SANTOS et al., 2007). Estes crioprotetores são usados em combinação com os penetrantes visando diminuir a concentração destes no interior das células, prevenir a formação de grandes

cristais de gelo, diminuir a concentração necessária do crioprotetor permeável e, conseqüentemente, sua toxicidade (PEREIRA; MARQUES, 2008).

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos domésticos com o intuito de proteger contra o choque térmico (MOUSSA et al., 2002). Acredita-se que sua ação seja devida a presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A gema do ovo é composta principalmente por 68% de LDL, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de lipetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis, os grânulos e o plasma (JOLIVET et al., 2006). Segundo Manjunath et al. (2002), a LDL se liga as proteínas presentes no plasma seminal evitando sua ação sobre a membrana espermática e desta forma evita o efluxo de fosfolípidios e colesterol que causaria a desestabilização da membrana (Figura 6).

No entanto, como a gema de ovo é um produto de origem animal, este pode representar um potencial risco contaminante, podendo carrear doenças exóticas, este fato diminui a possibilidade de troca de material contendo a gema de ovo (BOUSSEAU et al., 1998). Ainda, a gema de ovo é um produto extremamente complexo, cuja composição pode ser variável e diferir entre lotes, mudando a sua composição de lipídeos com a dieta das galinhas, além de ter sido relatado em sua composição, substâncias que inibem a respiração celular (WATSON; MARTIN, 1975). Neste sentido, a utilização da lipoproteína de baixa densidade purificada, tem sido utilizada em substituição da gema de ovo em algumas espécies domésticas (Equinos - MARTIN, 2005, Cães – BENCHARIFF et al., 2010 e Bovinos - HU et al., 2011) visando a diminuição destes danos causados pela gema.

Figura 6: Diagrama da ação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por Manjunath et al. (2002).



Outra substância possível de substituir a gema de ovo é o gel de *Aloe vera*. A *Aloe vera* pertence à família das Liláceas, da qual fazem parte, a cebola, o nabo e os aspargos (MAURELLE et al., 1996). Em sua composição foram identificadas inúmeras substâncias (Quadro 6), (VELOSO; PEGLOW, 2003). Suas aplicações, embora não totalmente conhecidas, abrangem problemas como a artrose, a acne, a úlcera e até cardiopatias além de possuir inúmeras propriedades regeneradoras, curativas,

umectantes, lubrificantes e nutritivas (MAURELLE et al., 1996). A sua ação crioprotetora ainda é desconhecida, porém, possui em sua composição substâncias similares ao encontrados em crioprotetores convencionais como polissacarídeos, além de apresentar ação antioxidante (AIRES et al., 2003).

Os açúcares são crioprotetores não penetrantes que atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substrato energético para o espermatozoide durante a incubação, conferindo proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídios (YILDIZ et al., 2000). Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema, neste sentido, os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida na ausência de água (ANCHOROGUY et al., 1987).

Quadro 6: Componentes da Aloe vera e sua atuação, por Brasil (2009).

Vitaminas	Atuação
A (Beta Caroteno)	Visão, pele, ossos e contra anemia
B1 (Tiamina)	Crescimento dos tecidos e energia
B2 (Riboflavina)	Associada a vitamina B6, participa da produção de células sanguíneas
B3 (Niacina)	Participa da regulação do metabolismo
B6 (Piridoxina)	Associada a vitamina B12, participa da produção de células sanguíneas
B12 (Cianocobalamina)	Combate a anemia e problemas neuropatológicos
C (Ácido Ascórbico)	Combate às infecções e estimula o sistema imunológico
E (Tocoferol)	Juntamente com a vitamina C, combate as infecções
Ácido Fólico (Complexo)	Auxilia na formação do sangue

B)	
Minerais	Atuação
Fosfato de Cálcio	Crescimento de dentes e ossos, alimento do sistema nervoso
Potássio	Regula os fluidos do sangue e dos músculos, além dos batimentos cardíacos
Ferro	Absorve o oxigênio para dentro dos glóbulos sangüíneos e aumenta a resistência às infecções
Sódio	Juntamente com o potássio, regula os fluídos do corpo e transporta os aminoácidos e a glicose para dentro das células
Colina	Um dos compostos da lecitina, indispensável ao metabolismo
Magnésio e Manganês	Preservam o sistema nervoso e os músculos
Cobre	Participa da formação do sangue
Cromo	Colabora no controle do nível de açúcar no sangue, do metabolismo, da glicose e da circulação
Mono e Polissacarídeos	Atuação
Acemannan	Recentemente descoberto, tornou-se o maior foco da maioria das pesquisas sobre <i>Aloe vera</i> , vem sendo apontado como o maior responsável pela ação “milagrosa” da Aloe como agente contra doenças auto-imunes do tipo câncer, AIDS, reumatismo, artrite, alergias
Celulose	
Manose	
Ácido Urônico	
Alínase	
Glicose	
L-raminose	
Aldopentose	
Lipase	
Aminoácidos Essenciais	Atuação
Valina, Leucina e Isoleucina (Aminoácidos de cadeia ramificada ou BCAAs (branched chain aminoacids))	Contribuem consideravelmente para o aumento da resistência física, pois durante as atividades de longa duração são utilizados pelos músculos para o fornecimento de energia. Assim, o consumo de aminoácidos de cadeia ramificada diminui a degradação das proteínas corporais favorecendo a hipertrofia muscular
Metionina e Lisina	Funções cerebrais e exercem uma ação direta sobre as reações emocionais
Fenilalanina e Treonina	
Triptofano	
Histidina	Requerido na infância
Enzimas	Atuação
Brandiquinase	Analgésico, anti-inflamatório e estimulante do sistema imunológico
Catalase	Evita a acumulação de líquidos no corpo
Celulase	Ajuda a digerir a celulose
Creatina Fosfoquinase	Enzima muscular

Proteolitiase	Liquidifica as proteínas no seu interior
Fosfatase, Amilase e Nucleotidase	
Outras Substâncias	Atuação
Ácidos Graxos	São os ácidos instaurados indispensáveis à saúde. Dentre esses, o ácido Caprílico é utilizado no tratamento de micoses
Lignina	Penetra facilmente na pele
Saponinas	São ao mesmo tempo depurativas e anti-sépticas
Antraquinonas	Analgésicas e laxativas
Aloína	Antibiótica e cartática
Isobarbaloína	Analgésica e anbitiótica
Ácido Aloético	Antibiótico
Aloe Emodina	Bactericida e Laxativa
Ácido Cinâmico	Germicida e fungicida
Óleo Etéreo	Tranqüilizante
Ácido Crisofânico	Fungicida para a pele
Antranol e Resistanol	

2.4.3 Aditivos

Ainda, visando o aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação, o uso de aditivos como detergentes pode melhorar a qualidade da célula espermática após a descongelação. Segundo Penã (2000), o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre a célula espermática não está ainda totalmente compreendido. Porém, acredita-se que ele solubilize as lipoproteínas da gema de ovo e aumente deste modo seu potencial de proteção à célula espermática. Assim, pode-se observar que a incorporação de detergentes comerciais derivados do SDS aos diluentes, como o Equex STM (PEÑA, 2000) e o Orvus ES (TSUTSUI et al., 2000) vem sendo realizada. A adição de tais detergentes ao sêmen é eficaz para proteger a motilidade dos espermatozoides, integridade de membrana plasmática e acrossômica bem como o aumento da longevidade das células espermáticas de cães após a descongelação (PEÑA et al., 2003).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G.V.; SANTOS, B.M.B.; CAVALCANTE, J.M.M.; RODRIGUES, F.R.N.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Adição de *Aloe vera* ao diluente a base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4 °C. *Ciência Animal. Anais do VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal*, 2012, 283 – 286.
- AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. ***Theriogenology***, 2003, v.60, p.269-279.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. ***Theriogenology***, 2002, v.57, p.1801-1808.
- ALVES, H.M; OLIVEIRA, I.R.S; CASTELO, T.S; LIMA, G.L; SOUZA, A.L.P; MOREIRA, M.A.P; PAULA, V,V; SILVA, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. ***Reprod Domest Anim***, v.48, p.506-511, 2013.
- AMANN, R.P; PICKETT BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. ***Cryobiology***, 1987, v.24, p.324-331.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. ***Reprod. Dom. Anim.***, v. 41, supl. 2, p. 30-42, 2006.

- BELLANTONI, E. Habitat Use by Mule Deer and Collared Peccaries in an Urban Environment, **Report 42**. Tucson: University of Arizona, p.2-33, 1991.
- BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; PASCAL, O.; ANTON, M.S.E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M.L.; BARRIE`RE, P.; LARRAT, M.; TAINTURIER, D. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reprod Domest Anim**, 2010, v.45, p.189-200.
- BENIRSHCHKE, K. Quest for the giant peccary: the chaco revisited. **Zoonoz.** 25:364-372, 1974.
- BEZERRA, J.A.B; SILVA, A.M; G.C.X; SILVA, M.A; OLIVEIRA, M.F; SILVA, A.R. Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Zoological Science** 31: 338–342, 2014.
- BIANCHI, T; COLLARES, V.F; CAMPOS, P.V; CAVALANTI, C; KAEFER, E.K; CORREA, A.O; DELLAGOSTIN, T; LUCIA, J.C; DESCHAMPPS, M.N. Fator do plasma seminal associado a` integridade de membrana de espermatozóides sui`nos pós descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60 384–388, 2008.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; GUIENNE, B. M.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, 1998, v. 50, n. 5, p. 699-706.
- BRASIL, A. V. F. **Brasil Aloe vera Forever**. Disponível em: <<http://www.nossosaopaulo.com.br/AloeVeraForever/>>, Data de acesso: 15 de dezembro de 2014.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes

- sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.
- CAMPOS, L.B.; SILVA, M.A.; BEZERRA, J.A.B.; CASTELO, T.S.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.R. Survival of collared peccaries (*pecari tajacu*) sperm after freezingthawing using different extenders. **Acta Scientiae Veterinariae**, 42: 1217, 2014.
- CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; SOUZA, A.L.P.; MOREIRA, M.A.P.; PAULA, V.V.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**. V. 74 1060-1065, 2010a.
- CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIMA, G.L; ALVES, H.M; OLIVEIRA, I.R.S; SANTOS, E.A.S; PEIXOTO, G.C.X; SILVA, A.R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*), **Cryobiology** 61, 275–279, 2010b.
- CAVALCANTE FILHO, M.F. Morfologia dos estômagos do queixada (*Tayassu pecari*) e do cateto (*Tayassu tajacu*) [Linnaeus, 1789]. São Paulo, **Dissertação Mestrado** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1996.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. 3. ed. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; BIANCONI, L.L.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRUDA, R.P. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33 (supl.1), p. 327-327, 2005.

- CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. IN: KIRK. **Current veterinary therapy – Small animal practice**, X. Philadelphia : Saunders, p.1247-1289, 1989.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, JR.T.; DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 181p, 2001.
- COSTA, D.S.; HENRY, M.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.1, p.46-51, 2004.
- COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*), *Biota Neotropica* 5, 131–136, 2005.
- COSTA, G.M.J.; LEAL, M.C.; SILVA, J.V.; FERREIRA, A.C.S.; GUIMARÃES, D.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenic Cycle Length and Sperm Production in a Feral Pig Species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, 31, 2, 2010.
- DACHEUX, J.L.; BELGHAZI, M.; LANSON, Y.; DACHEUX, F. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 250, 36–42, 2006.
- DALCIN, L.; LICCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, 2010.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.
- DESBIEZ, A.L.J.; KEUROGHLIAN, A.; BEISIEGEL, B.M.; MEDICI, E.P.; GATTI A.; PONTES, A.R.M.; CAMPOS, C.B.; TOFOLI, C.F.; MORAES JR., E.A.; AZEVEDO, F.C.; PINHO, G.M.; CORDEIRO, J.L.P.; SANTOS JR., T.S.;

- MORAIS, A.A.; MANGINI, P.R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L.F.; ALMEIDA, L.B. **Avaliação do risco de extinção do cateto (Pecari tajacu – Linnaeus, 1758) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, ano II, n.3, 74 – 83, 2012.
- DOEBBLER, G.F. Crioprotective compounds—review and discussion of structure and function of structure and function. **Cryobiology**, 1966, v. 4, p. 2-11.
- DONG, Q.-X.; RODENBURG, S.E.; HILL, D.; VANDEVOORT, C.A. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Asian Journal of Andrology** (2011) 13, 459–464.
- FANG, T., R. E. BODMER, P. E. PUERTAS, P. MAYOR, P. P. PEÑA, R. A. VILLANES AND D. T. S. HAYMAN. Certificación de pieles de pecaríes em la **amazonía peruana**. Lima: Gráfica Biblos S. A. 202 p, 2008.
- FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine**. 2 ed., Philadelphia: W. B. Saunders. p. 970. 1986.
- FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility, pp 1–4. Raleigh, NC: **Annual Swine News**, 2001.
- GARCIA, A.R; KAHWAGE, P.R; GUIMARÃES, D.A.A; OHASHI, O.M. Chilled Semen of Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*): Effects of Preservation at 17 °C on Semen Quality. **Journal of Agricultural Science and Technology**. 921-929, 2012.
- GARDE, J.J.; OLMO, A.D.; SOLER, A.J.; ESPESO, G.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). **Anim Reprod Sci.**, 108, p.384–401, 2008.
- 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. **Arch.Zootec.**, v.55 p.101-104, 2006.

- GUYADER-JOLY, C. Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit in vitro. 193p. **Tese** (Doutorado em Ciências da Vida). Universidade de Paris VI, Paris. 1998.
- HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, 1992, V. 29, p. 26-38.
- HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. **Molecular Probes**, 2001.
- HELLGREEN, E.C; LOCHMILLER, M.S; AMOSS, J.R; GRANT, W.E. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*). **J Reprod Fertil**. 85:677– 86, 1989;.
- HIEMSTRA SJ, VAN DER LENDE T, WOELDERS H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO. p.25-35, 2005.
- HOLT WV. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**; v. 62:3–22, 2000b.
- HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K.; LI, Q.W.; ZHANG, S.S.; ZAN, L.S.; LI, Y.K.; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, 2011, v.62, p.83-87.
- IMRAT, P.; SUTHANMAPINANTH, P.; SAIKHUN, K.; MAHASAWANGKUL, S.; SOSTARIC, E.; SOMBUTPUTORN, P.; JANSITTIWATE, S.; THONGTIP, N.; PINYOPUMMIN, A.; COLENBRANDER, B.; HOLT, W.V.; STOUT, T.A.E. Effect of pre-freeze semen quality, extender and cryoprotectant on the post-thaw quality of Asian elephant (*Elephas maximus indicus*) semen. **Cryobiology**, V.66, P. 52–59, 2013.
- IUCN, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 February 2014.

- JAIN, K.J.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, 2006, v. 86, pág. 1037-1046, 2006.
- JEYENDRAN, R. S.; VANDER-VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVLD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. **J. Repord. Fertil**, 70: 219-228, 1984.
- JOLIVET, P.; BOULARD, C.; BEAUMAL, V.; CHARDOT, T.; ANTON, M. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **J Agric Food Chem**, 2006, v.54, p.4424-4429, 2006.
- KAHWAGE, P.R; GARCIA, A.R; GUIMARÃES, D.A.A; OHASHI, O.M; LUZ-RAMOS, R.S; DIAS, H.L.T; ALBUQUERQUE, N.I; BARTHA, M.M.P. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caititus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, Tayassuidae) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Acta amazônica**. VOL. 40(4) 771 – 778, 2010.
- KAROW, A.M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. Disponível em: www.xytextinternational.com/pdf/cryobiology.pdf. Acessado em 25/11/2014.
- KARESKOSKI, M; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Anim Reprod Sci**. 107:249-56, 2008.
- KEITH, S. Evaluation of new cryoprotectans for the preservation of equine spermatozoa. **Tese doutorado**; Colorado State Unirversity Fort Collins,1998.
- KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTRA, P.; BHATTACHARYYA,D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation

model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa.

Cryobiology, v. 40, p. 117-125, 2000.

LOCHMILLER, R.L; HELLGREN, E.C; VARNER, L.W; GREENE, L.W; AMOSS, M.S; SEAGER, S.W.J. Physiological responses of the adult male of collared peccary *Tayassu tajacu* (Tayassuidae) to severe dietary restriction, **Comparative Biochemistry and Physiology**. 82, 49-58, 1985.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod.**, v.67, p.1250-1258, 2002.

MARTIN, C.E.G. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. 2005. 27f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Pelotas, RS, 2005.

MAURELLE, J. A. F.; RODRIGUEZ, F. M.; GUITIERREZ, Z. P. Acción analgésica del extrato acuoso liofilizado de *Aloe vera* L. em ratones. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, 1996, n.2, p.15-17.

MAYOR, P; GUIMARÃES, D.A.A; LE PENDU Y . Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Anim Reprod Sci** 102, 88–97, 2007.

MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA, J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Anim Reprod Sci** 127: 197–201, 2011.

- MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.; STANLEY, B.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics** 73: 2006–2020, 2010.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bullsemen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695- 1706, 2002.
- MURTHY, S.S.N. Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. *Cryobiology*, 1998, v.36, p.96, 1998.
- NOGUEIRA, S.S.C; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. **Biodivers Conserv** 20: 1385–1397, 2011.
- OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; SIEME, H.; GLASMACHER, B.; WOLKERS, W.F. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v.61, p.115-122, 2010.
- OLIVEIRA, K.G; MIRANDA, S.A; LEÃO, D.L; BRITO, A.B; SANTOS, R.R; DOMINGUES, S.F.S. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Anim Reprod Sci**, v.123, p.75-80, 2011.
- PAIVA, A.L.C; NUNES, T.L; OLIVEIRA, M.G.C; MORAIS, A.M.L; SANTOS, E.A.S; SILVA, A.R; OLIVEIRA, M.F; PAULA, V.V. Effects of atipamezole and medetomidine administration on seminal variables and functions of erection and ejaculation of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) after electroejaculation. **BMC Veterinary Research**. 10:170, 2014.
- PEIXOTO, G.C.X; SILVA, M.A; CASTELO, T.S; SILVA, A.M; BEZERRA, J.A.B; SOUZA, A.L.P; OLIVEIRA, M.F. SILVA, A.R. Individual variation related to

- testicular biometry and sêmen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science* 134, 191– 196, 2012.
- PEGG D. E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. In: **Molecular Biology**. 2007, 2nd edn. Totowa: Humana Press Inc., 348p., 2007.
- PEÑA A. I. Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity. 86f. **Thesis** (Doctoral, Veterinary Medicine) - Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, 2000.
- PEÑA, A.I; LUGILDE, L.L; BARRIO, M; HERRADON, P.G; QUINTELA, L.A. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. **Theriogenology**. 59:1725–39, 2003.
- PEÑA, F.J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen–thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107–114, 2005.
- PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, 2008, v. 9, p. 267-277, 2008.
- REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; FILHO, A.S.S.; ANDRADE, J.C. Transferência e criopreservação de embrião bovino. In: Gonçalves PB, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2002, São Paulo: Varela. p.127-178.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. y ERICSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad en inseminação artificial in suínos. In: Simpósio Internacional Minitub, 3, 2000, Flores da Cunha. **Anais...** Flores da Cunha, p. 11-33, 2000.

- SANTOS, R. R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of cryopreservation, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Anim Reprod Sci**, 2007, v.99, p.53-64, 2007.
- SANTOS, E.A.A; SOUSA, P.C; MARTINS, J.A.M; MOREIRA, R.A; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O; MORENO, F.B.M.B, OLIVEIRA, M.F; MOURA, A.A; SILVA, A.R. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Reproduction** 147 1–13, 2014.
- SANTOS, E.A.S.; SOUSA, P.C.; PEIXOTO, G.C.X.; SIMÃO, B.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.65, p.1257-1260, 2013.
- SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.C.; NOGUEIRA FILHO, S.L.G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio (Captive breeding of the collared-peccary: an **Agribusiness alternative**, 2009.
- SANTOS, R. R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of cryopreservation, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Anim Reprod Sci**, v.99, p.53-64, 2007.
- SANTOS, T. C., A relação materno-fetal em Tayassuidae: catetos (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) e queixadas (*Tayassu pecari* Link, 1795). **Tese (doutorado)** – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de cirurgia, São Paulo, 2007.
- SEAGER, S.W.J; HELLGREN, E.C; MAGYAR, S.J; BIEDIGER, T.G; HOEKSTRA, R.E; COSCARELLI, K.P; LOCHMILLER, R.L; GRANT, W.E. Semen collection in the javelina or collared peccary (*Tayassu tajacu*). In Proc. **Am. Assoc. Zoo Vet.**, Louisville, p. 185, 1984.

- SELLÉS E, GADEA J, ROMAR R, MATÁS C, RUIZ S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Repro Dom Anim* 2003;38:66 –72.
- SILVA, M.A; PEIXOTO, G.C.X; CASTELO, T.S; LIMA, G.L; SILVA, A.M; OLIVEIRA, M.F; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, 50–55, 2013.
- SILVA, M.A; PEIXOTO, G.C.X; LIMA, G.L; BEZERRA, J.A.B; CAMPOS, L.B; PAIVA, A.L.C; PAULA, V.V; SILVA, AR. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v.78, p.605-611, 2012.
- SILVA, A.M.; PEIXOTO, G.C.X.; BEZERRA, J.A.B.; CASTELO, T.S.; SANTOS, E.A.A.; SILVA, A.R. Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*). **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, n.8, p.1494-1498, 2014.
- SILVA, A.R.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.*, 81:159 –75, 2004.
- SONNER, J.B.; SANTOS, T.C.; MIGLINO, M.A. Morfologia dos testículos em queixadas (*Tayassu tajacu* Link 1795). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, 2002.
- SOWLS, L. K. Gestation period of collared peccary. **Journal of mamology**, v.42, n. 3, p. 425-426, 1961.
- SOWLS, L. K. Social behavior of the collared peccary, *Dicotyles tajacu* (L). **In:** The behavior of ungulates and its relation to management (Geist, V., Walter, F) Morges, Switzerland: IUCN, v. 24, p. 144-165, 1974.
- SOUZA, A.L.P; CASTELO, T.S; QUEIROZ, J.P.A.F; BARROS, I.O; PAULA, V.V; Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. **Anim Reprod Sci.**, v. 116, p.370–375, 2009.

- SOUSA, P.C; SANTOS, E.A.A; SOUZA, A.L.P; LIMA, G.L; BARROS, F.F.P.C, OLIVEIRA, M.F; SILVA, A.R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesq. Vet. Bras.** 33 (7): 924-930, julho 2013.
- SOUZA, A.L.P; LIMA, G.L; PEIXOTO, G.C.X; CASTELO, T.S; BEZERRA, J.A.B; SILVA, A.R. Validação do uso de sondas fluorescentes na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*). **XX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Uberlandia, MG, 2013.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TSOLOVA, M. Glycobiology of fertilization in the pig. **International Journal of Developmental Biology**, 52 717–736, 2008.
- TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; KOMORIYA, K.; SHIMIZU, N.; NAGAKUBO, K.; KAWAKAMI, E. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. **J Vet Med Sci**, 2000, v.62, p.537-538.
- VAJTA, G; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.
- VALLE, R.R. Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). 2007. 535f. **Tese** (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, SP, 2007.
- VELOSO, C. C.; PEGLOW, K. Plantas Medicinais. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003.
- WALLACH, J. P., BOEVER, W. J. Diseases of Exotic Animals: Medical and surgical management. Philadelphia: **W. B. Saunders**, p. 631-632, 1983.
- WATSON, P.F, MARTIN, I.C. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science.**, v. 60-1, p. 481-92, 2000.
- WISLOCKI, G. B; DEMPESEY, E. W. Histochemical reactions of the placenta of the pig. **American Journal of Anatomy**, v. 78, p. 181-225, 1931.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, 2000, v.54, p.579-585, 2000.

4. JUSTIFICATIVA

Os catetos (*Pecari tajacu*) constituem uma espécie de fácil adaptação e com grande demanda internacional por seus produtos, o que tem causado a sua diminuição em alguns biomas brasileiros. Este fato, aliado a degradação do meio ambiente, faz com que estudos mais aprofundados acerca da fisiologia reprodutiva bem como o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas representem um potencial para a conservação e multiplicação da espécie e, possivelmente, o aproveitamento de áreas improdutivas.

O processo de criopreservação de sêmen, que engloba a refrigeração, congelação e descongelação, é uma biotécnica reprodutiva que permite a utilização e a troca destes gametas entre criatórios e até a formação de bancos de germoplasma. Com o intuito de maximizar a qualidade e o intercambio de sêmen congelado tem sido preconizado o uso de substâncias que substituam a gema de ovo dada a sua possibilidade de contaminação bacteriana, neste sentido, o uso da lipoproteína de baixa densidade purificada (LDL), responsável pelo efeito benéfico da gema e a utilização de produtos de origem vegetal como o extrato de *Aloe vera* (AV) tem sido testada com êxito na criopreservação de sêmen de algumas espécies.

Além de seu uso na inseminação artificial e no intercambio do sêmen, o ajuste de protocolos busca também maiores conhecimentos visando uma maior viabilidade da célula espermática como pela adição de detergentes a base de Dodecil sulfato de Sódio (SDS) que apresenta a característica de melhorar a qualidade e a longevidade da célula espermática.

Neste sentido, justifica-se a realização de estudos em catetos no que tange ao aperfeiçoamento da criopreservação de sêmen, principalmente através da incorporação de aditivos e novas substâncias crioprotetoras, tal qual tem sido demonstrado em outras espécies domésticas e selvagens.

5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- 4 A lipoproteína de baixa densidade (LDL) purificada possibilita um aumento na resistência contra o choque térmico e melhor visualização das amostras de sêmen de catetos, quando comparada ao uso da gema de ovo;
- 5 O gel de *Aloe vera* é um crioprotetor que pode ser utilizado de forma alternativa em substituição a gema de ovo para conservação do sêmen de catetos;
- 6 O uso de detergente à base de dodecil sulfato de sódio como agente no diluente promove o prolongamento da longevidade espermática pós-descongelação em catetos.

6.1 Objetivo geral

Otimizar o protocolo de criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*) permitindo uma maior viabilidade do sêmen após a descongelação.

6.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da lipoproteína de baixa densidade (LDL) purificada em relação à gema de ovo e determinar sua concentração ideal para o uso em sêmen de catetos;

Avaliar o efeito do gel de *Aloe vera* (AV) na refrigeração (5°C) de sêmen de catetos em substituição à gema de ovo;

Avaliar o efeito do gel de *Aloe vera* (AV) em substituição ou combinação à gema de ovo, e determinar sua concentração ideal para o uso na congelação do sêmen de catetos;

Verificar os efeitos da adição de detergente a base de dodecil sulfato de sódio em diferentes concentrações ao sêmen de catetos para criopreservação.

**Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de
criopreservação de sêmen de animais selvagens**



Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens

Alternatives for the improvement of semen cryopreservation in wild animals

A.L.P. Souza, G.L. Lima, A.R. Silva¹

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido
(Ufersa), Mossoró, RN, Brasil.

¹Correspondência:legio2000@yahoo.com

Resumo

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica importante para a reprodução e manutenção da diversidade genética de animais selvagens. Apesar dos avanços já alcançados, evidencia-se a necessidade de novos estudos vislumbrando o uso de novas substâncias que possam oferecer maior proteção à célula espermática. Para tanto, este trabalho apresenta uma revisão no tocante às inovações a serem incorporadas como alternativas, no intuito de aprimorar os protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens.

Palavras-chave: antioxidantes, banco de germoplasma, congelamento, crioprotetores, espermatozoides.

Abstract

The semen cryopreservation is an important biotechnique for the reproduction and maintaining of the genetic diversity in wild animals. Despite the improvements reached in the use of this biotechnique, there is a highlighted need for studies that show the use of new substances, which could contribute to sperm protection. Thus, this study presents a review about innovations that could be incorporated as alternatives for the improvement of protocols for semen cryopreservation in wild animals.

Keywords: antioxidants, cryoprotectant, freezing, gene bank, sperm.

Introdução

A conservação de espécies ameaçadas baseia-se em projetos *in situ*, realizados em ambiente natural, e *ex situ*, realizados *in vivo* com manutenção de animais em cativeiro e/ou *in vitro*, pela formação de bancos de germoplasma (Domingues et al., 2011). Tais estratégias são importantes para reprodução de animais selvagens e manutenção da diversidade genética, permitindo, por meio da formação dos criobancos, a superação do tamanho limitado das reservas e dos zoológicos (Wilson, 1997).

A criopreservação, porém, expõe os espermatozoides a situações de estresse, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos adequados, que permitam sua preservação por curtos (resfriamento) ou longos períodos (congelamento). O ajuste desses protocolos requer o estudo de fatores que podem afetar o sucesso da criopreservação, como a formulação de diluentes adequados às características inerentes a cada espécie, haja vista que tais características podem variar, não possibilitando a extrapolação direta de uma espécie para outra. Assim, esta revisão apresenta diferentes alternativas para o aperfeiçoamento de protocolos de criopreservação de espermatozoides em espécies selvagens, apresentando inovações acerca de diluentes, crioprotetores e aditivos que poderiam contribuir para elevação da taxa de sobrevivência espermática.

Diluentes alternativos

Um diluente para sêmen deve apresentar ação tamponante, uma combinação ajustada de nutrientes, ser de baixo custo, oferecer proteção contra danos causados pelas mudanças de temperatura, e proporcionar estabilidade dos sistemas enzimáticos e integridade da membrana plasmática (Amann e Pickett, 1987). Dentre os diluentes mais utilizados, destaca-se aquele à base de Tris (tris-hidroximetil-aminometano), utilizado em coiotes (*Canis latrans*; Minter e DeLiberto, 2005), felinos (*Prionailurus viverrinus*; Thiangtum et al., 2006), cães africanos (*Lycaon pictus*; Johnston et al., 2007), macacos-prego (*Cebus apela*; Oliveira et al., 2011) e catetos (*Pecari tajacu*; Silva et al., 2012). Outra opção tem sido o diluente à base de TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano), descrito para ursos (*Ursus thibetanus japonicus*; Okano et al., 2006) e lincos pardos (*Lynx rufus*; Gañán et al., 2009). Uma associação entre diluentes à base de Tris e TES (TEST yolk buffer-TYB) já foi também utilizada para leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*; Pukazhenth et al., 2006), sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*; Valle, 2007) e pequenos felinos (*Felis nigripes* e *Felis margarita*; Herrick et al., 2010). Além disso, um diluente comercial denominado Bioxcell (IMV, L'Aigle, França), inicialmente disponível



para bovinos, tem sido também sugerido para conservação do sêmen de alpacas (*Lama Pacos*; Vaughan et al., 2003).

Diluentes à base de água de coco têm surgido como alternativa e mostrado resultados satisfatórios na conservação de gametas de diversas espécies domésticas (Uchoa et al., 2012). A água de coco é composta por proteínas, sais, açúcares e minerais. Sua fração ativa foi identificada como um fitormônio promotor de crescimento celular, denominado ácido 3-indol-acético, conhecido por promover um incremento na conservação espermática em mamíferos (Blume e Marques Jr., 1994). Em animais selvagens, já foi demonstrado que esses diluentes são eficientes para manutenção da qualidade espermática em macacos-prego (Oliveira et al., 2011), catetos (Silva et al., 2012) e cutias (Castelo et al., 2013).

O uso de diluentes contendo lecitina de soja em concentrações variando de 1% (Forouzanfar et al., 2010) a 10% (Akhter et al., 2012) tem sido sugerido para ruminantes. Em bovinos, a ação da lecitina proporciona resultados similares aos obtidos com diluentes à base de Tris-gema de ovo (Papa et al., 2011). Em animais selvagens, no entanto, não existem relatos do uso de diluentes à base dessa substância, os quais poderiam também ser uma alternativa para o aperfeiçoamento dos protocolos.

Crioprotetores alternativos

O uso de crioprotetores se baseia no princípio de que a adição de solutos à água reduz a temperatura de congelamento, retardando o aparecimento de cristais de gelo (Karow, 2001). Em animais domésticos, o glicerol e a gema de ovo são rotineiramente utilizados como crioprotetores, sendo efetivamente adaptados a espécies selvagens como rinocerontes (*Ceratotherium sp*; Hermes et al., 2005), leopardos-nebulosos (Pukazhenth et al., 2006), ursos (*Ursus arctos*; Okano et al., 2006), impalas (*Aepyceros Melampus*; Chatiza et al., 2011) e macacos-prego (Oliveira et al., 2011).

Apesar dos efeitos benéficos, o glicerol apresenta certa toxicidade às células, sendo necessária a identificação de sua concentração ideal para cada espécie (Holt, 2000). Como exemplo, em catetos, Alves et al. (2012) avaliaram o uso do glicerol (3 e 6%) e da gema de ovo (5, 10 e 20%) para criopreservação do sêmen e verificaram que a associação de 20% de gema com 6% de glicerol apresentou melhores resultados. Ainda, outros crioprotetores como o etilenoglicol (*Cervus elaphus hispanicus*; Fernandez-Santos et al., 2006), dimetilsulfóxido (*Macaca mulatta*; Si et al., 2004), propilenoglicol (*Elephas maximus*; Saragusty et al., 2009), e dimetilacetamida (*Dromaius novaehollandiae*; Sood et al., 2012) foram testados em espécies selvagens, porém com resultados menos satisfatórios que aqueles obtidos com o glicerol.

Em contraposição aos efeitos benéficos da gema, sabe-se que algumas substâncias que a compõem dificultam a respiração celular, interferindo no sistema de transporte de elétrons nas mitocôndrias (Bousseau et al., 1998). Além disso, por se tratar de um produto de origem biológica, o qual poderia propagar microrganismos patogênicos, alguns países impõem restrições à circulação de sêmen, quando a gema está presente na composição do diluente (Linde-Fosberg, 2001). Desta forma, como a crioproteção da gema é promovida pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL; Bergeron et al., 2004), o uso da LDL purificada surge como uma alternativa eficiente para criopreservação de sêmen em cães (Benchariff et al., 2010), equinos (Martin, 2005) e bovinos (Hu et al., 2011). Nas espécies selvagens, porém, a LDL não tem apresentado benefícios à criopreservação do sêmen conforme demonstrado em macacos rhesus (Dong et al., 2011) e veados (*Cervus elaphus hispanicus*), sendo necessários outros estudos que objetivem a padronização de seu uso.

No intuito de reduzir eventuais problemas de contaminação e disseminação de doenças causadas por produtos de origem animal, têm-se buscado substâncias de origem vegetal que possam conferir proteção ao sêmen. O *Aloe vera* apresenta-se como uma alternativa por possuir, em sua composição, substâncias similares aos crioprotetores convencionais, além de conter diversas propriedades antioxidantes e de regeneração celular (Aires et al., 2003). Os primeiros estudos com a utilização do gel de *Aloe vera* como diluente seminal para inseminação artificial em ovelhas são datados da década de 80 (Rodriguez et al., 1988). Em 2006, Gutiérrez et al. utilizaram 40% de *Aloe vera* para congelamento do sêmen ovino e observaram 85% de espermatozoides viáveis imediatamente após a diluição e, com 48 h após a descongelamento, a taxa atingiu 60%. Recentemente, o uso da *Aloe vera* sp. tem sido associado a trabalhos de refrigeração de sêmen de caprinos (Aguiar et al., 2012) e caninos (Lima et al., 2013). Nos animais selvagens, no entanto, a *Aloe Vera* permanece como uma alternativa ainda inexplorada.

Substâncias detergentes

A incorporação de substâncias detergentes ao meio de congelamento tem melhorado a qualidade, a longevidade e a fertilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (Penã et al., 2003). O detergente parece atuar tanto sobre a gema, solubilizando os fosfolípidos, quanto sobre a membrana espermática, aumentando a permeabilidade e, com isso, tem causado redução no estresse osmótico, o que resulta em aumento na integridade da membrana e na motilidade pós-descongelamento (Maia et al., 2008). Compostos que têm como princípio ativo o dodecil-sulfato de sódio (SDS) têm sido largamente utilizados em espécies domésticas (Maia et al., 2008). Nas



Selvagens. Morton et al. (2010) demonstraram que a presença de SDS (Equex[®] STM - Nova Chemical Sales, Scituate Inc., MA, EUA) na concentração de 1% em meios para congelação favorece a motilidade, mas afeta negativamente a integridade acrossomal de espermatozoides de alpacas (*Vicugna pacos*). Ao contrário, em lhamas (*Lama glama*; Von Baer e Hellemann, 1999) e lobos-cinzentos (*Canis lupus*; Zindl et al., 2006), verificou-se uma melhora nos resultados de integridade e viabilidade de membrana após a descongelação do sêmen. Em adição, De Mercado et al. (2010) relataram que o efeito do Equex[®] STM na criopreservação de sêmen do porco ibérico (*Sus Scrofa domesticus*) depende da concentração utilizada, o que instiga pesquisas neste sentido.

Antioxidantes

Os processos de refrigeração e congelação do sêmen podem resultar em lesões espermáticas causadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), que inviabilizam a célula espermática para uma posterior inseminação artificial (IA). Como forma de diminuir esses danos, os antioxidantes fornecem hidrogênio para o radical livre, promovendo sua estabilização, e interrompendo a reação de propagação (Swenson e Reece, 1996). Os antioxidantes são classificados em primários e secundários. Os primários incluem os compostos fenólicos poli-insaturados, e os fenóis com impedimento estrutural (butil hidroxianisol - BHA, butil hidroxitolueno - BHT, butil hidroxiquinona - TBHQ e tocoferóis). Os secundários ou sinérgicos são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o principal antioxidante desse grupo (Araujo, 2001).

Em caprinos, demonstrou-se que a adição de antioxidantes, em especial do ácido ascórbico e do BHT, promove melhores resultados de integridade de membrana, de acrossoma e de viabilidade pós-descongelação, bem como de fertilidade, quando se compara à ausência desses compostos no meio diluente (Memon et al., 2012). De fato, antioxidantes como o BHT têm tido ampla utilização para a conservação espermática em várias outras espécies, como búfalos (Ijaz et al., 2009) e cães (Sahashi et al., 2011). Em animais selvagens, até o presente momento, não existem relatos de seu uso.

Considerações finais

A criotecnologia tem permitido significativos avanços na preservação e multiplicação de várias espécies. No entanto, o processo apresenta distintas limitações, sendo necessárias a evolução e a adaptação de diferentes protocolos de criopreservação de gametas de acordo com as características de cada espécie. De modo geral, a aplicabilidade dos resultados, tanto no Brasil como no mundo, apesar de estes serem promissores, apresenta baixa repetitividade, provavelmente devido à não padronização de protocolos adequados que garantam a viabilidade celular.

Nos últimos anos, tem-se observado um amplo desenvolvimento de substâncias adicionadas ao diluente no processo de criopreservação de sêmen em animais domésticos. Com base nesta premissa, considera-se investir no aprimoramento de protocolos que foram eficazes nestes e que possam ser estendidos ao uso em animais selvagens com a realização de adaptações necessárias a cada espécie. Dessa forma, esta evolução será essencial para aumento da eficiência dos programas de enriquecimento e manutenção de germoplasma, contribuindo para a manutenção da biodiversidade.

Referências

- Aguiar GV, Santos BMB, Cavalcante JMM, Rodrigues FRN, Salgueiro CCM. Adição de *Aloe vera* ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4°C. In: Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal Ciência Animal, 6, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: CONERA, 2012. p.283-286.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v.60, p.269-279, 2003.
- Akhter S, MS Ansari MS, Andrabi SMH, Rakha BA, Ullah N, Khalid M. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.815-819, 2012.
- Alves HM, Oliveira IRS, Castelo TS, Lima GL, Souza ALP, Moreira MAP, Paula VV, Silva AR. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.506-511, 2012.
- Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Araujo JMA. Química de Alimentos. 2.ed Viçosa, MG: Editora UFV, 2001.
- Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton MSE, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrie`re P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for



- Souza et al. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens cryopreservation of canine semen. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.189-200, 2010.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant L, Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699-706, 1998.
- Blume H, Marques Jr AP. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Ver Bras Reprod Anim*, v.18, p.97-104, 1994.
- Castelo TS, Praxedes ECG, Souza ALP, Peixoto GCX, Lima GL, Sousa PC, Santos EAA, Campos LB, Bezerra JAB, Silva AR. Criopreservação de sêmen de cutias (*Dasyprocta aguti*) em diluente à base de água de coco em pó - ACP-109c®. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, 2013, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013. CD-ROM.
- Chatiza FP, Pieterse GM, Bartels P, Nedambale TL. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphologym and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Anim Reprod Sci*, v.126, p.234-244, 2011.
- De Mercado E, Rodríguez A, Gómez E, Sanz E. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa: Comparison of diferente freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.54-61, 2010.
- Domingues SFS, Lima JS, Oliveira KG, Santos RR. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.124-129, 2011.
- Dong QX, Rodenburg SE, Hill D, Vandevoort CA. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl*, v.13, p.459-464, 2011.
- Fernandez-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *J Androl*, v.27, p.734-745, 2006.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.73, p.480-487, 2010.
- Gañán N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sánchez I, Aguilar JM, Gomendio M, Roldan ERS. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*, v.72, p.341-352, 2009.
- Gutiérrez AJ, Cosme RW, Jiménez y CJA, Ramírez GJA. Agua de coco, suero fetal bovino, *aloe vera* y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Arch Zootec*, v.55, p.101-104, 2006.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Blottner S, Walzer C, Silinski S, Patton ML, Wibbelt G, Schwarzenberger F, Göritz F. Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, C.s. *cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, v.63, p.219-238, 2005.
- Herrick JR, Campbell M, Levens G, Moore T, Benson K, D'Agostino J, West G, Okeson DM, Coke R, Portacio SC, Leiske K, Kreider C, Polumbo PJ, Swanson WF. In vitro fertilization and sperm cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*). *Biol Reprod*, v.82, p.552-562, 2010.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiol.: the importance of soecies and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, Li YK, Li X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, v.62, p.83-87, 2011.
- Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, Rehman H. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.71, p.1326-1329, 2009.
- Johnston SD, Ward D, Lemon J, Gunn I, MacCallum CA, Keeley T, Blyde D. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Anim Reprod Sci*, v.100, p.338-355, 2007.
- Karow AM. Cryobiology for mammalian embryologists. 2001. Disponível em: www.xytextinternational.com/pdf/cryobiology.pdf. Acesso em: 29 abr. 2013.
- Lima CF, Melo CCS, Ramos RP, Neves AKR, Nery LTB, Andrade TGF, Oliveira ECS. *Aloe vera* sp. é uma alternativa à gema de ovo na refrigeração do sêmen canino a 5°C: resultados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 20, Uberlândia, MG. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2013. CD-ROM.
- Linde-Forsberg C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: www.ivis.org.
- Maia MS, Azevedo HC, Bicudo SD, Sousa DB, Rodello L. Efeito da adição do equex-STM ao diluente tris-gema na

motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci Vet*, v.33, suppl.1, p.311, 2008. (resumo).

Martin CEG. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. 2005. 27f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Pelotas, RS, 2005.

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of boer goat spermatozoa in tris egg yolk glycerol extender. *Anim Reprod Sci*, v.136, p.55-60, 2012.

Minter LJ, DeLiberto TJ. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.1898-1912, 2005.

Morton KM, Evans G, Maxwell WMC. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*, v.74, p.311-316, 2010.

Okano T, Nakamura S, Komatsu T, Murase T, Miyazawa K, Asano M, Tsubota T. Characteristics of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved with different concentrations of glycerol in Captive Japanese Black Bear (*Ursus Thibetanus Japonicus*). *J Vet Med Sci*, v.68, p.1110-1104, 2006.

Oliveira KG, Miranda SA, Leão DL, Brito AB, Santos RR, Domingues SFS. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.75-80, 2011.

Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, De Vita B, Trinque C, Puoli-Filho JNP, Dell'Aqua Jr JA. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.73-77, 2011.

Peña A, Lugilde LL, Barrio M, Herradón PG, Quintela LA. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, v.59, p.1725-1739, 2003.

Pukazhenthi B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelican KM, Bush M, Howard JG, Wildt DE. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1790-1796, 2006.

Rodriguez F, Baldassarre H, Simonetti J, Aste F, Ruttle JL. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with *Aloe vera* gel. *Theriogenology*, v.30, p.843-854, 1988.

Sahashi Y, Otsuki T, Higaki S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinima M. Effect of Butylated Hydroxytoluene on dog sperm longevity in chilling storage and cryopreservation. *J Vet Med Sci*, v.73, p.895-899, 2011.

Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.255-266, 2009.

Si W, Zheng P, Li Y, Dinnyes A, Ji W. Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. *Am J Primatol*, v.62, p.301-306, 2004.

Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva AR. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, v.78, p.605-611, 2012.

Sood S, Malecki IA, Tawang A, Martin GB. Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology*, v.78, p.1557-1569, 2012.

Swenson MJ, Reece WO. Dukes' Fisiologia dos Animais Domésticos. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Thiangtum K, Swanson WF, Howard J, Tunwattana W, Tongthainan D, Wichasilpa W, Patumrattanathan P, Pinyopoommintr T. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous in vitro fertilization in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.373-382, 2006.

Uchoa DC, Silva TFP, Cardoso JFS, Mota Filho AC, Jucá RP, Silva AR, Silva LDM. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology*, v.77, p.1959-1963, 2012.

Valle RR. Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). 2007. 535f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, SP, 2007.

Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial Insemination in Alpacas (*Lama pacos*). Barton, ACT, Austrália: Rural Industries Research and Development Corporation. 2003. (Publication, nr. 03/104).

Von Baer L, Hellemann C. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.95, 96, 1999.

Wilson EO. Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

Zindl C, Asa CS, Günzel-Apel AR. Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C.l. baileyi*). *Theriogenology*, v.66, p.797-1802, 2006.

**Comparison of egg yolk and different purified low-density
lipoprotein (LDL) concentrations for the collared peccary
(*Pecari tajacu*) semen freezing**

**Comparison of egg yolk and different purified low-density lipoprotein (LDL)
concentrations for the collared peccary (*Pecari tajacu*) semen freezing**

Ana Liza Paz Souza^I, Gabriela Liberalino Lima^I, Gislayne Christianne Xavier Peixoto^I,
Thibério de Souza Castelo^I, Maria Glaucia Carlos Oliveira^{II}, Valéria Veras de Paula^{II},
Alexandre Rodrigues Silva^{I*}

^ILaboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil, *Corresponding author. Tel.: +55 84 88571964; fax: +55 84 33151778. *E-mail address*: legio2000@yahoo.com.

^{II}Laboratory of Veterinary Surgical Technique and Anesthesiology, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of purified low-density lipoprotein – LDL – as a substitute for egg yolk on the cryopreservation of *Pecari tajacu* semen. Eleven ejaculates derived from different individuals were obtained by electroejaculation and evaluated for sperm motility, vigor, viability, morphology, and membrane integrity. The ejaculates were divided in four aliquots that were diluted in a Tris extender plus egg yolk (20%) or 5, 10 or 20% LDL, and 3% glycerol. Samples were frozen in liquid nitrogen and thawed at 37 °C/1 min after one week. After thawing, treatment using 20% LDL provided significantly better results for sperm motility ($36.4 \pm 5.3\%$) than the other groups ($P < 0.05$). Furthermore, the highest values for membrane integrity ($27.4 \pm 6.5\%$) were achieved in the use of the same treatment ($P < 0.05$). In conclusion, purified LDL (20%) can be used to replace the egg yolk *in natura*, improving the sperm quality conservation.

Keywords: Electroejaculation, Semen cryopreservation, *Tayassu tajacu*.

1. Introduction

As one of the most hunted species in the tropical areas, collared peccaries (*Pecari tajacu*) represent a major source of meat and income for local inhabitants (BODMER et al., 2004). Due to the growing interest for its meat and leather in the international market, several efforts have been established to its reproduction under captivity (MAYOR et al., 2007), and for the development of protocols for its

germplasm multiplication and conservation (CASTELO et al., 2010; SILVA et al., 2013).

The egg yolk is one of the most important ingredients for freezing extenders. However, some yolk contents are suspected to have negative effects on sperm quality (THERIEN et al., 1999). Additionally, egg yolk is a component of animal origin and represents a potential risk of bacterial contamination for artificial insemination doses (PILLET et al., 2011), causing the restriction of its use in diluents for commercialization (OLAR AND PICKET, 1980). Aiming to overcome these challenges, various studies have demonstrated the possibility to remove some of the egg yolk components by centrifugation, isolating the beneficial ones, as the low density lipoprotein (LDL) (WALL AND FOOTE, 1999). To the LDL, it is attributed the resistance against cold shock and the improved sperm motility after semen storage (BENCHARIF et al., 2011).

Various studies confirmed the efficiency of the LDL supplementation in extenders for semen cryopreservation of swine (HU et al., 2008), the domestic species more closely related to peccaries (MAYOR et al., 2006). Even though the collared peccaries look like pigs, they do not belong to the Suidae family. Instead, they are members of the family Tayassuidae (XX). In this sense, recent studies demonstrated that parameters standardized for swine semen technology could not be directly extrapolated for the peccaries (Silva et al. 2013; Campos et al. 2014).

Up to now, the protocols developed for collared peccaries semen cryopreservation focused on the use of different extenders based on Tris (ALVES et

al., 2013; CASTELO et al., 2010) or coconut water (SILVA et al., 2012), both added by the whole egg yolk. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of different concentrations of purified LDL as a replacement for egg yolk in the Tris extender used for collared peccary semen freezing.

2. Materials and Methods

The ethics committee of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA has approved the experimental protocols as well as the animal care procedures adopted (Process no. 23091.0253/114). The reagents used in this study were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, United States), except when cited.

2.1. Animals

Eleven sexually matured male collared peccaries, aging 40.7 ± 1.6 mo and weighting 22.5 ± 2.8 kg, were used. The animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals from Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, located in the northeast Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5 °10=S, 37 °10=W). The climate is typically semi-arid, with an average annual temperature of 27°C. Experiment was conducted during dry season, and the animals were maintained under a 12 h natural photoperiod in outdoors in a group of six in paddocks (20 m - 3 m) with a covered area of (3 - 3 m). They fed sow food and fruits with water available *ad libitum*.

2.2. Anesthesia

Animals were fasted 12 h before the experiments began. Then, they were physically restrained using a hand net and anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brazil), given as a bolus (5 mg/kg) (Souza et al., 2009). When the animal showed signs of awakening, additional propofol (approximately 1.25 mg/kg) was given to prolong anesthesia. During the procedure, an indwelling venous catheter was inserted into the cephalic vein for fluid therapy (0.9% physiological saline solution), and vital signs were monitored.

2.3. Semen collection and evaluation

Animals were kept in lateral recumbency and the semen was collected with an electroejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil) connected to a 12 V source. The stimulatory cycle comprised of 10 stimuli in each voltage, starting from 5 V, followed by a voltage increase in steps of 1 V up to 12 V. Each electrical stimulus lasted for 3 s, with intermittent breaks of 2 s. The stimuli cycle was maintained for 10 min duration from the beginning of the procedure. The electroejaculator probe was – 15 cm, 1.3 cm, and 12 cm – was inserted into the rectum (Castelo et al., 2010). Semen was collected in plastic tubes and immediately evaluated.

Semen volume, aspect and color were noted. Sperm motility and vigor (0–5) was assessed using a light microscope at 100× and 400× magnification. Bengal Rose-stained smears were prepared with 5 µL of semen to evaluate sperm morphology and acrosome integrity using light microscopy (1000×), counting 200 cells per slide (Sousa et al., 2013). Sperm viability percentage was established by analyzing a slide,

stained with Brome-phenol Blue under light microscopy (400×), counting 200 cells per slide. Following initial assessment, 10 µL semen aliquot was diluted with 10% buffered formalin (2 mL), and sperm concentration was determined using a Neubauer chamber. The functional integrity of sperm membrane was evaluated by a hypo-osmotic swelling (HOS) test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypoosmotic solution (Santos et al., 2013). Plasma membrane integrity was evaluated by using a fluorescent solution consisting of fluorophores diacetate 6-carboxy-fluorescein (CFDA) and propidium iodide (PI) under epifluorescence microscopy analysis. Sperm entirely stained in green (CFDA) were considered as having an intact plasmalemma, whereas those completely or partially stained in red (PI) were considered as non-intact (Souza et al., 2013).

2.4. Extraction low-density lipoprotein – LDL

The LDL was extracted by using the method described by Moussa et al. (2002), which guarantee a LDL purity of 97%. This extraction technique is currently protected under the patent no. 0100292 held by the ENVN and INRA of Nantes. Briefly, the yolks derived from fresh hen eggs were separated from the albumen, and collected into a beaker placed on ice and diluted with an isotonic saline solution (0.17 M NaCl) (w/w), being stirred for 1 h before centrifugation at 11.400 g for 45 min at 4°C. The supernatant was separated from the sediment (granules). The plasma was centrifuged again to remove all traces of contamination with granules; it was then mixed with 50% ammonium sulfate to precipitate out livetins. After 1 h of stirring at 4–8°C, the mixture was centrifuged at 11.400 g for 45 min. The sediment was discarded and the supernatant dialyzed against distilled water to eliminate the

ammonium sulfate. The solution was centrifuged (11,400 *g*, 45 min, 4°C) and the LDL-rich supernatant collected.

2.5. Semen processing

Based on the previous studies conducted for collared peccaries semen freezing (Alves et al., 2012; Castelo et al., 2010), we used a Tris-based extender constituted of 3.028 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris), 1.78 g monohydrated citric acid, and 1.25 g D-fructose dissolved in 100 mL ultrapure water (Tris-fructose). The osmolarity of Tris extender was 295 mOsm/L and pH was 6.6. Semen samples were divided into four aliquots that were diluted in Tris extender supplemented of egg yolk (20%), as a control group, or purified LDL at 5, 10, or 20%, as the treatment groups. Dilution was conducted at room temperature (27°C).

After dilution, semen samples were stored in the water jacket at 27°C and equilibrated for 40 min to reach 15°C in a biological oxygen demand (BOD) incubator (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Further, BOD incubator was adjusted to establish at 5 °C for 30 min. At that point, the sample was added to the extender with 6% glycerol (also at 5°C), which resulted in a final concentration of 3% glycerol in the extender and 100×10^6 sperm /mL. Samples were evaluated at this moment. Finally, the samples were packed in 0.25 mL plastic straws (IMV Technologies; L'Aigle, France) that were placed horizontally in an insulated box for 5 min, at 5 cm above the nitrogen (N₂) vapors, and then plunged into N₂ for storage at -196 °C,

following a fast freezing rate at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Silva et al., 2013). After 1 week, frozen straws were thawed by immersion in a water bath at 37°C for 1 min. Semen was evaluated as described for fresh semen.

2.6. Statistical analysis

A total of 11 replicates was conducted for each treatment. The results were expressed as mean and standard error (SEM). The data were checked for normality by the Shapiro–Wilk test, and for homoscedasticity by Levene’s test using the Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, United States). The values expressed in percentages were Arcsine transformed. The effect of each step of the procedure (fresh, dilution, glycerol addition or post-thawing) on subjective sperm motility was evaluated by variance analysis – ANOVA – for repeated measures. Comparisons among different treatments (Tris plus whole egg yolk or LDL 5, 10, or 20%) on the semen parameters were made by ANOVA, followed by the Student Newman Keul’s *t* test. The same effects on vigor were evaluated by the nonparametric Mann–Whitney test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

A total of 11 ejaculates was obtained from 11 different males. Samples presented white color, watery aspect, and an average volume of $2.8 \pm 0.7\text{ mL}$. The other fresh semen characteristics are shown in Table 1.

We verified a significant decrease ($P < 0.05$) on the values for sperm motility and vigor at each step of the procedure (Table 2). In general, no differences exist among treatments regarding the preservation of both parameters ($P > 0.05$), except at using 20% LDL that provided the highest values for sperm motility after thawing ($P < 0.05$).

Regarding the evaluation of other semen characteristics (Table 3), no effect of LDL concentration on functional membrane integrity, sperm morphology or acrosome integrity was verified ($P > 0.05$). Nevertheless, samples extended in Tris plus 20% LDL presented the higher values for membrane integrity evaluated by fluorescence ($P < 0.05$).

4. Discussion

Over the past 60 years, the egg yolk was an indispensable compound of practically all media used for sperm preservation. In peccaries, a previous study tested different egg yolk concentrations (5, 10, and 20%) for its semen freezing, demonstrating that 20% concentration provided the highest efficiency for semen protection after thawing (ALVES et al., 2013). In fact, egg yolk was commonly used at the concentration of 20% (w/v) for freezing the semen of various species (Lopes et al. 2009; Crichton et al. 2015). However, this concentration makes results difficult to standardize and interferes with biochemical assays and metabolic investigations, which can be overcome by removing some components in the egg yolk by centrifugation. Moreover, it is known that some of these components could impair the sperm respiration and motility, thus increasing a demand to replace whole egg yolk by its cryoprotective fraction (Akal et al., 2014). In this sense, the egg yolk could be centrifuged and divided into two fractions: plasma and granules. Plasma is mainly constituted by 85% LDL and 15% livetin; and granules by

70% high-density lipoproteins (HDL), 16% phosphatidylcholine and 12% LDL (McCully et al., 1962). Therefore, LDL are the main egg yolk constituent, thus representing 2/3 of yolk dry matter and 22% of yolk proteins (Cook and Martin, 1969). However, as a product of animal origin, its composition is not uniform (BERGERON AND MANJUNATH, 2006), and could vary according to the different eggs' sources (Dong et al. 2011).

In order to overcome the challenges provided by the use of whole egg yolk, this research shows, for the first time, the possibility for its substitution by the purified LDL for semen cryopreservation of collared peccaries. During semen processing, we verified that both egg yolk and LDL were equally able to preserve sperm characteristics immediately before freezing. However, the treatment containing 20% LDL provided the highest values for sperm motility and membrane integrity after thawing. It is known that LDL are constituted of lipids and proteins. During freezing and thawing processes, LDL are disrupted and its triglycerides and phospholipids are liberated in the medium. Such phospholipids can form a protective film at the surface of sperm membranes (Hu et al 2006), which prevents the efflux of phospholipids and cholesterol, being responsible for membrane stability. The LDL also forms a complex with seminal plasma proteins (BERGERON et al., 2004) that interacts with membrane, avoiding the output of phospholipids and cholesterol, conferring more resistance to the sperm against thermal shock (THERIEN et al., 1999).

In peccaries, the addition of LDL at 20% concentration to the extender provided the higher values for sperm motility and membrane integrity as verified by fluorescence and hyposmotic swelling test. According to MANJUNATH et al. (2002), when semen is diluted with an extender containing egg yolk, sperm have fewer interactions with seminal

plasma and more interaction with surrounding extender. The authors demonstrate that LDL binds seminal plasma proteins involved in physiologic modifications of the sperm membrane, thus allowing its stabilization. Recently, it was demonstrated that seminal plasma from peccaries contains 34.1 ± 14 mg/mL protein, including the presence of a spermadhesin, the porcine seminal plasma protein – PSP-1 (SANTOS et al., 2014). Therefore, interactions among LDL and seminal plasma proteins could also exist during semen processing and provide a beneficial effect on peccaries' sperm.

Many studies have been looking for the ideal purified LDL concentration that fosters satisfactory results after the freeze-thaw process to different species. In swine, it has been proposed that any LDL concentration varying from 6 to 10% were effective for semen cryopreservation (HU et al., 2006). However, the increase of LDL concentration in the extender above 10% leads to a decrease in sperm performance after freeze-thaw for both swine (Hu et al. 2006) and bovine (Moussa et al. 2002). Such findings are different from the present verified for peccaries in which the amount of 20% LDL provided the best results for sperm protection. In fact, the action of LDL can vary among species. In Rhesus monkey, for instance, a wide range of LDL (2%–20%) yielded similar post-thaw survival compared to 20% egg yolk, but LDL did not offer any additional benefits for sperm freezing (Dong et al. 2011). According to Bencharif et al. (2008), differences in optimal LDL concentrations for various species could be due to their difference in composition of the sperm plasma membrane, which remains unknown in peccaries.

In general, when LDL was used as a cryoprotectant in any concentration, the sperm evaluation was easier to perform when compared to the treatment containing egg yolk. In fact, it was previously reported that interactions between

whole egg yolk and freezing extenders results in a lot of debris that difficult the sperm visualization (SILVA et al., 2013). It is hypothesized that the formation of debris occurs because of the presence of a granular fraction into the egg yolk, composed of irregular, microscope and insoluble structures (NEVES AND HENRY, 2012). Therefore, the exclusive use of LDL presents the advantage of providing a better visualization of sperm under microscopy in comparison with the use of whole egg yolk.

In conclusion, this *in vitro* assay demonstrate that LDL can be efficiently used to substitute the egg yolk *in natura*, as a cryoprotectant for the collared peccaries sperm. Based on the LDL concentrations tested in the experiment, we suggest the supplementation 20% LDL to the Tris extender for this purpose. We emphasize that functional tests, as the *in vitro* sperm-oocytes interactions assays or even fertility trials by using the artificial insemination, should be used to confirm the efficiency of LDL for peccary's semen freezing in the future, but such tests are unfortunately not available for the species until this moment.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Marc Roger Jean Marie Henry and the team of the Model farm (Pedro Leopoldo-MG) of the Veterinary School – Federal University of Minas Gerais, for scientific advice and support. Ana Liza P. Souza and Alexandre R. Silva are supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq).

REFERENCES

Akal, E., Koçyijit, A., Selçuk, M. Role of low density lipoproteins in semen preservation. *Kocatepe Veterinary Journal*, v.7, p.69-74, 2014.

Alves H.M, Oliveira I.R.S, Castelo T.S, Lima G.L, Souza A.L.P, Moreira M.A.P, Paula V.V, Silva A.R (2012) Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to Tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. *Reprod Domest Anim* 1-6.

Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S et al. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 2008; 70: 1478–88.

Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D (2011) The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex - STAMP extenders in the cryopreservation of canine sêmen. *Res Vet Sci* 93, 440–447.

BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, v.70, p.708-717, 2004.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanism of sperm protection by egg yolk and milk. **Mol Reprod Dev**, v.73, p.1338 – 1344, 2006.

BIANCHI, I. Comparação de crioprotetores extracelulares na criopreservação de sêmen suíno. 2006. Proc. UFPEL Undergraduate Students Meeting. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/nupeec/anexos/bd9c05ce60.pdf>>. Acesso em 11 Jun 2014.

BODMER, R.E. et al. Economic analysis of wildlife use in the Peruvian Amazon. In: SILVIUS, K. et al. **People in Nature: Wildlife Conservation in South and Central America**, Columbia University Press New York, p.191–210, 2004.

CASTELO, T.S. et al. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*TAYASSU TAJACU*). **Cryobiology**, v.61, p.275–279, 2010.

COOK, W. H. and MARTIN, W.G. (1969) Egg lipoproteins in: Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems. (E. Tria, and A.M. Scanu eds), pp 579-615, London and New York: Academic Press.

Crichton EG, Pukazhenthil BS, Billah M, Skidmore JA. Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2015 Jan 15;83(2):168-74.

Dong QX, Rodenburg SE, Hill D, VanderVoot CA. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian Journal of Andrology* (2011) 13, 459–464.

Hu J, Li OW, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ. The Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. *Asian Australas J Anim Sci*. 2006; 19(4): 486-494.

HU, J.H. et al. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. **Cryobiology**, v.57, p.257–262, 2008.

Lopes K.R.F., Costa L.L.M., Lima G.L., Souza A.L.P., Silva A.R. 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 72 (2009) 650–654 .

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod**, v.67, p.1250–1258, 2002.

MAYOR, P. et al. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the northeastern Peruvian Amazon. **Gen Comp Endocrinol**, v.147, p.268–275, 2006.

MAYOR, P. et al. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. **Anim Reprod Sci**, v.102, p.88–97, 2007.

McCULLY, K.A., MOK, C.C. and COMMON, R.H. (1962) Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 40:937-952.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695–1706, 2002.

NEVES, M.M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.209-214, 2012.

OLAR, T.T.; PICKETT, B.W. Fertility of bovine spermatozoa frozen in a “chemically defined” extender. **Proc 8th Tech Conf: Artif Insem Reprod**, p.89 –91, 1980.

PILLET E. et al. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, v.75, p.05–114, 2011.

- SANTOS, E.A.S. et al. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.65, p.1257-1260, 2013.
- SANTOS, E.A.S. et al. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Reproduction**, v.147, p.753-764, 2014.
- SOUSA, P.C. et al. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesq Vet Bras**, v.33, p.924-930, 2013.
- SOUZA, A.L.P. et al. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. **Anim Reprod Sci**, v.116, p.370-375, 2009.
- SOUZA, A.L.P. et al. Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*). **Proc XX Braz Cong Anim Reprod**, p.121, 2013.
- SILVA, M.A. et al. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v.78, p.605-611, 2012.
- SILVA, M.A. et al. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, v.67, p.50-55, 2013.
- SILVA, et al. Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*). **Ciência Rural**, v.44, p.1494-1498, 2014.
- THERIEN, I. et al. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod**, v.61, p.590-598, 1999.
- WALL, R.J.; FOOTE, R.H. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. **J Dairy Sci**, v. 82, p.817-821, 1999.

Table 1: Semen characteristics in fresh ejaculates of collared peccaries (*Pecari tajacu*) collected by electroejaculation (n=11).

	Mean $\pm$ EP	Range
Concentration ($\times 10^6$ sperm/mL)	649 $\pm$ 390	100 – 4.490
Motility (%)	94.1 $\pm$ 3.0	70 – 100
Vigor (0-5)	4.7 $\pm$ 0.2	3 – 5
Viability (%)	80.4 $\pm$ 3.1	65 – 93
Functional membrane integrity (%)	78.1 $\pm$ 2.8	61 – 89
Membrane integrity evaluated by fluorescence (%)	73.4 $\pm$ 6.0	34 – 95
Morphology		
Normal (%)	87.4 $\pm$ 2.3	75 – 97
Head defects (%)	1.3 $\pm$ 0.4	0 – 4
Midpiece defects (%)	1.6 $\pm$ 0.4	0 – 4
Tail defects (%)	9.7 $\pm$ 1.9	1 – 20
Normal acrosome (%)	99 $\pm$ 0.3	98 – 100

Table 2: Values for sperm motility and vigor (Mean $\pm$ EP) in collared peccaries (*Pecari tajacu*) (n=11) semen collected by electroejaculation through the freezing – thawing process, using Tris extender added of 20% egg yolk (EY) or low-density lipoprotein (LDL) at 5%, 10% or 20%.

	Sperm motility (%)				Vigor (0-5)			
	EY 20%	LDL 5%	LDL 10%	LDL 20%	EY 20%	LDL 5%	LDL 10%	LDL 20%
Extended	90.9 $\pm$ 2.7 ^{Aa}	90.9 $\pm$ 2.7 ^{Aa}	90.9 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	90.9 $\pm$ 2.4 ^{Aa}	4.1 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	4.4 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	4.5 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	4.3 $\pm$ 0.3 ^{Aa}
Cooled	79.1 $\pm$ 5.7 ^{ABa}	79.1 $\pm$ 5.3 ^{Ba}	80.0 $\pm$ 5.0 ^{Ba}	81.8 $\pm$ 5.3 ^{Aa}	3.5 $\pm$ 0.4 ^{ABa}	3.5 $\pm$ 0.3 ^{ABa}	3.7 $\pm$ 0.3 ^{ABa}	3.7 $\pm$ 0.3 ^{ABa}
Glycerol-added	71.4 $\pm$ 7.3 ^{Ba}	72.1 $\pm$ 7.0 ^{BCa}	72.1 $\pm$ 7.0 ^{BCa}	69.1 $\pm$ 7.5 ^A	2.9 $\pm$ 0.3 ^B	3.1 $\pm$ 0.2 ^B	3.3 $\pm$ 0.3 ^B	3.1 $\pm$ 0.3 ^B
Thawed	21.8 $\pm$ 6.9 ^{Cb}	23.2 $\pm$ 6.4 ^{Cab}	19.5 $\pm$ 5.0 ^{Db}	36.4 $\pm$ 5.3 ^{Ba}	1.4 $\pm$ 0.3 ^C	1.7 $\pm$ 0.3 ^C	1.7 $\pm$ 0.3 ^C	2.3 $\pm$ 0.3 ^B

^{a,b} Within a row, means without common superscript letters differed;

^{A,B,C} Within a column, means without common superscript letters differed

P<0.05.

Table 3: Characteristics (mean $\pm$ EP) semen from collared peccaries (*Peccari tajacu*) collected by electroejaculation (n=11), after freezing-thawing procedures, at using Tris extender added of 20% egg yolk (EY) or low-density lipoprotein (LDL) at 5%, 10% or 20%.

	EY 20%	LDL 5%	LDL 10%	LDL 20%
Functional membrane integrity (%)	34.1 $\pm$ 7.0	37 $\pm$ 6.1	42.4 $\pm$ 7.0	43.5 $\pm$ 6.5
Membrane integrity evaluated by fluorescence (%)	8.4 $\pm$ 3.0 ^b	19.1 $\pm$ 5.1 ^b	13.6 $\pm$ 4.3 ^b	27.4 $\pm$ 6.5 ^a
Morphology				
Normal (%)	79.0 $\pm$ 4.4	76.3 $\pm$ 8.0	77.3 $\pm$ 3.9	81.4 $\pm$ 5.3
Head defects (%)	2.0 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.4
Midpiece defects (%)	2.0 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.4
Tail defects (%)	17.0 $\pm$ 3.8	20.5 $\pm$ 5.2	19.4 $\pm$ 3.9	16.4 $\pm$ 5.3
Normal acrosome (%)	97.7 $\pm$ 0.7	98.7 $\pm$ 0.6	96.4 $\pm$ 1.1	99.1 $\pm$ 0.5

^{a,b} Within a row, means without common superscript letters differed (P<0,05).

**Innovative use of *Aloe vera* for collared peccary (*Pecari tajacu*)
semen conservation**

Innovative use of *Aloe vera* for collared peccary (*Pecari tajacu*) semen conservation

ALP Souza^a, GL Lima^a, GCX Peixoto^a, AM Silva^a, MF Oliveira^a, AR Silva^{a*}

^aLaboratory of Animal Germplasm Conservation - LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

*Corresponding author. Tel.: 55 84 33178374. *E-mail address*: legio2000@yahoo.com (AR Silva).

Abstract

As an alternative cryoprotectant for improving the conservation of collared peccary semen, this research aims at evaluating the use of *Aloe vera* (AV) extract as a cryoprotectant for semen chilling and freezing. Five ejaculates were divided in two aliquots that were diluted in Tris plus egg yolk—EY (20%) or AV extract (20%)—and chilled at 5 °C. In both treatments, an adequate semen conservation was achieved and values higher than 50% motile sperm were found after 48 h of storage. Moreover, twelve other ejaculates were diluted in Tris plus EY (20%) or AV extract (5, 10, or 20%), or its combination (EY-10%:AV-10%). Samples were frozen in liquid nitrogen and thawed after one week. In general, the group containing AV-20% presented values for sperm motility parameters similar to the EY group ($P > 0.05$); however, the highest values for VSL, VAC, straightness and rapid sperm subpopulation, and also for sperm viability and membrane integrity were achieved in the use of the combination EY-AV ($P < 0.05$). In conclusion, we demonstrate that *Aloe vera* extract at a 20% concentration could substitute the egg yolk in the formulation of Tris extenders for collared peccaries' semen chilling or freezing. However, the combination of

egg yolk 10% and *Aloe vera* extract 10% in Tris extender increases the efficiency in obtaining adequate post-thawing sperm quality in collared peccaries.

Keywords: *Tayassu tajacu*, sperm chilling, sperm freezing, germplasm bank, cryoprotectant.

1. Introduction

With the advent of semen conservation, the possibility of germplasm storage enables posterior manipulation and use of assisted techniques such as *in vitro* fertilization or artificial insemination [1]. In spite of this, the decrease in temperature rates during semen chilling and freezing procedures is critical to maintain the sperm quality after rewarming, with the sperm sensitivity being variable according to the different species in which it is applied [2].

Aiming at reducing the cryoinjuries, several substances have been used as cryoprotectants, and the hen's egg yolk has been showing satisfactory results for both domestic [3] and wild species [4]. Egg yolk presents beneficial effects on sperm cryopreservation as a protectant of the plasma membrane and acrosome against temperature-related injury [3]. It is believed that the phospholipids, cholesterol, and low-density lipoproteins present in egg yolk may be factors that provide protection to the sperm against cold shock during the freeze-thaw process [5]. However, since it is a product of animal origin, there is the possibility of bacterial contamination [6], which contributes to the difficulty of exchanging semen among different regions or countries [7]. Furthermore, egg yolk can interfere with microscopic observations or biochemical assays, as it contains granular material of the same size and shape as the sperm [8].

Several authors search for alternative media free from animal products for semen conservation. In this sense, the *Aloe vera* appears as an alternative from vegetal origin for this purpose, as it is constituted for some substances that can act as the conventional cryoprotectants [9]. Along the years, *Aloe vera* has been used in the cosmetic and toiletry industry due to its curative and therapeutic properties [10]. In addition, several studies show the positive action of *Aloe vera* extract on spermatogenesis [11], as it can stimulate not only germinal cell division and physiological activity but also testosterone production by Leydig cells [12]. The use of *Aloe vera* extract for an effective semen conservation, however, is restricted to the caprine semen chilling [13] and ovine semen freezing [14]. Therefore, it presents a potential as a good alternative for sperm cryoprotection, and should be better explored and extrapolated to other species, including wild animals.

The collared peccary (*Pecari tajacu*) is a wild species whose meat and pelt has great international demand, but the number of individuals in some of its natural habitats, such as the Caatinga and Atlantic Forest [15], is critically decreasing due to the poaching, which stimulates its bred under captivity [16]. The development of assisted techniques that make its conservation viable besides the implementation of germplasm banks is very important for its multiplication, which have been generating some studies on its semen conservation. By this moment, it was demonstrated that its semen could be chilled at 17 °C for only 24h by using the Beltsville Thawing Solution as extender [17]. At freezing, however, several studies demonstrated that the sperm quality could be efficiently preserved using Tris [18] or coconut water extenders [4], both plus egg yolk. In order to present an alternative cryoprotectant for improving the conservation of its semen, this research aims at evaluating the use of *Aloe vera* extract as a cryoprotectant for the peccaries' semen chilling and freezing.

2. Materials and methods

The ethics committee of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA has approved the experimental protocols as well as the animal care procedures adopted (Process no. 23091.0253/114). The reagents used in this study were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, United States), except when cited.

2.1. Animals and semen collection

Samples were obtained from 12 sexually mature male collared peccaries with an average (SD) age and weight of 40.7 ± 1.6 mo and 22.5 ± 2.8 kg, respectively. The animals belonged to the Center of Multiplication of Wild Animals from UFERSA, located in the northeast of Brazil (Mossoró, RN, Brazil; $5^{\circ}10'S$, $37^{\circ}10'W$). The climate is typically semi-arid, with an average annual temperature of $27^{\circ}C$. The animals were isolated from the females at 6 months before the commencement of the study and maintained under a 12-h natural photoperiod. They were maintained outdoors in groups of six in paddocks (20 m - 3 m) with a covered area of (3 - 3 m) and fed sow food and fruits (with water available *ad libitum*).

Animals were fasted 12 h before the experiments began. They were then physically restrained using a hand net and anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brazil), which was given as a bolus (5 mg/kg) [19]. They were kept in lateral recumbency, and semen was collected with an electroejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil) that was connected to a 12-V source. The stimulatory cycle comprised 10 stimuli in each voltage, starting from 5 V, followed by a voltage increase in steps from 1 V till 12 V. Each electrical stimulus lasted 3 s, with intermittent breaks of 2 s. The stimuli cycle was maintained for a 10-min duration from the

beginning of the procedure. The electroejaculator probe was 15 x 1.3 cm, and it was inserted 12 cm into the rectum. Semen was collected into plastic tubes and immediately evaluated [18].

2.2. Experimental design

The execution of the study was divided into two steps. At first, we verified the effect of *Aloe vera* (AV) extract on short-term preservation at 5 °C of collared peccaries' semen by comparing it with the egg yolk (EY), both at a 20% concentration added to the Tris extender. Afterward, we verified the effect of AV extract at different concentrations (5, 10, and 20%) and also combined to the EY (10%:10%) added to Tris-extender for the collared peccaries' semen freezing. For both experiments, we used the Tris-based extender formulation previously described for collared peccaries [18].

2.3. Extraction of Aloe Vera

The plant *Aloe vera* was cultured in sandy clay soil type at the UFERSA campus, located in the northeast of Brazil (Mossoró, RN, Brazil; 5 °10=S, 37 °10=W), under a typical semi-arid climate, with an average annual temperature of 27 °C. In order to obtain the crude extract of *Aloe vera*, we extracted the parenchyma of its leaves as a colorless gel. It was filtered through a sieve; then, it was packed in a glass container till its use.

2.4. Semen chilling

After electroejaculation of 5 individuals, semen samples were divided into two aliquots. The first was diluted in Tris plus EY (20%) and the other was diluted in Tris plus AV extract (20%), reaching a concentration of 100×10^6 sperm /mL. Samples were stored in the water jacket at 27°C and equilibrated for 40 min to reach 15°C in a biological oxygen demand (BOD) incubator (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Further, the BOD incubator was adjusted to establish a temperature at 5 °C for 30min. Samples were rewarmed at 37 °C and evaluated for sperm total motility, viability, and osmotic response every 12h till 48h.

2.5. Semen freezing

Semen samples derived from 12 individuals were divided into 5 aliquots. These were diluted in Tris extender supplemented with EY (20%), as a control group, or AV extract at 5, 10, or 20%; also, the final aliquot was diluted in Tris plus a combination of EY (10%) and AV extract (10%). All the dilutions were conducted at room temperature (27 °C), and the samples were then equilibrated for 40 min to reach 15°C in a BOD incubator (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Further, the BOD incubator was adjusted to establish a temperature at 5 °C for 30min. At that point, the sample was added to the extender with 6% glycerol (also at 5°C), which resulted in a final concentration of 3% glycerol in the extender and 100×10^6 sperm /mL. The samples were evaluated at this moment. Finally, the samples were packed in 0.25-mL plastic straws (IMV Technologies; L'Aigle, France) that were placed horizontally in an insulated box for 5 min, at 5 cm above the nitrogen (N₂) vapors, and then plunged into N₂ for storage at -196 °C, following a fast freezing rate at -40 °C/min. After 1 week, frozen straws were thawed by immersion in a water bath at 37°C for 1 min [4].

Samples were evaluated for sperm motility parameters, viability, morphology, osmotic response, and membrane integrity.

2.6. Semen evaluation

Fresh ejaculates were evaluated for aspect, color, and volume. The sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber [20]. After electroejaculation, rewarming, and freezing-thawing, samples were evaluated for sperm morphology, viability, and osmotic response. Bengal Rose-stained smears were prepared to evaluate sperm morphology using light microscopy (1000x), counting 200 cells per slide [21]. Percentage of viable sperm was established by analyzing a slide stained with Bromophenol Blue under light microscopy (400x), counting 200 cells per slide. Functional integrity of the sperm membrane was verified by evaluating the sperm osmotic response under a hypo-osmotic swelling (HOS) test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypoosmotic solution [22].

In order to accomplish the evaluation of the plasma membrane integrity in frozen-thawed samples, we used a fluorescent solution consisting of the fluorophores diacetate 6-carboxy-fluorescein (C-FDA) and propidium iodide (PI), as previously validated for the species [23].

2.7. Computer-assisted sperm assessment

Sperm motility parameters were analyzed by computer-assisted sperm assessment (IVOS 7.4G, (Hamilton-Thorne Research™, Beverly, MA, USA)) in fresh, rewarmed, and

frozen-thawed semen. The settings of the instrument were validated for collared peccaries semen before analysis, including temperature 37 °C; 60 frames/s; minimum contrast, 45; straightness threshold, 30%; low-velocity average pathway (VAP) cut-off, 30; and medium VAP cut-off, 30. Five independent and nonconsecutive microscopic fields were randomly selected and scanned. The following endpoints were analyzed: number of counted cells, total motility (%), VAP (mm/s), velocity straight line (VSL; mm/s), curvilinear velocity (VCL; mm/s), amplitude of lateral head (ALH; mm), beat cross frequency (BCF; Hz), straightness (STR;%), and linearity (LIN;%). According to low VAP cut-off (LVV) and medium VAP cut-off (MVV), the overall sperm population was subdivided into four categories: rapid, with $VAP > MVV$; medium, with $(LVV < VAP < MVV)$; slow, with $VAP < LVV$; and static, the proportion of cells that were not moving [24].

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as mean and standard error and analyzed by Statview 5.0 software (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA). Data were checked for normality by the Shapiro–Wilk test, and for homoscedasticity by Levene’s test. The values expressed in percentages were Arcsine transformed. The effect of incubation time (0, 12, 24, 36, and 48h) during chilling on sperm parameters was evaluated by variance analysis ANOVA for repeated measures. Comparisons among treatments for chilled or frozen-thawed semen were evaluated by ANOVA, followed by the Student Newman–Keul’s t test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

Fresh ejaculates presented a watery aspect, white color, and a volume of 2 ± 0.4 mL with a concentration of $259.2 \pm 29.3 \times 10^6$ sperm/mL. Average values of $97.5 \pm 1.0\%$ motile sperm, being $83.4 \pm 23\%$ viable and $88.1 \pm 1.5\%$ morphologically normal, with $84.5 \pm 3.8\%$ osmotic response were found in fresh samples.

3.1. Semen chilling

On evaluating the peccary chilled semen during 48 h, no statistical differences were found between samples diluted in Tris plus EY or AV extract for sperm viability, morphology, and osmotic response (Figure 1) at any time ($P > 0.05$). In addition, the evaluation of the kinematic parameters of sperm motility generated by CASA (table 1) confirmed the similarity between the cryoprotectants used for cooling semen of peccaries till 48 hours ($P > 0.05$), but EY provided a higher percentage of static sperm at 24h and AV vera provided a similar situation only at 48 h ($P < 0.05$).

In spite of good values for sperm motility and morphology being verified at 48 h for both treatments, we verify a significant linear reduction in the preservation of sperm viability and osmotic response during the experiment for both treatments ($P < 0.05$). In addition, a reduction in the ALH values was verified during the AV extract use at 48h ($P < 0.05$).

3.2 Semen freezing

After thawing (Table 2), all the treatments containing EY or AV isolated or in combination provided similar values for osmotic response ($P > 0.05$). The EY group and the EY-AV combination provided the most efficient preservation of normal sperm morphology

($P < 0.05$). Furthermore, such EY-AV combination provided the highest values for sperm viability and membrane integrity after thawing ($P < 0.05$).

Regarding CASA results (Table 3), we verify similar data for total motility in all the treatments ($P > 0.05$). In general, the group containing AV-20% presented values for kinetic parameters similar to those found in EY-20% group ($P > 0.05$); however, the highest values for VSL, VAC, and straightness were achieved in the use of the EY-AV combination ($P < 0.05$). For sperm subpopulation analysis, this combination also provided the highest values for rapid sperm and the lowest values for static sperm after thawing ($P < 0.05$).

4. Discussion

Conservation sperm through the temperature reduction is a usual way to inhibit the cell metabolism and to extend its productive life, enabling its storage and use for a longer time than it would be used for fresh semen. According to Bicudo et al. [25], semen could be extended in order to provide an efficient protection to the sperm during the reduction of the temperature till cooling temperatures are reached. In this sense, the establishment of a good cryoprotectant for sperm chilling may minimize the damage caused by the physical and chemical stress caused by the conservative processes [2]. As previously shown for caprine [13], the AV extract showed an effective cryoprotective effect during peccaries' semen chilling, providing similar results as the extender containing EY.

Chauhan et al. [26] revealed the *Aloe vera*'s chemistry and reported the presence of more than 200 different biologically active substances, including vitamins, minerals, enzymes, sugars, anthraquinones or phenolic compounds, lignin, saponins, sterols, amino acids, and salicylic acid. In such components, the presence of polysaccharides such as pectins, hemicelluloses, glucomannan, and acemannan is highlighted [27], with the majority presence of glucose and mannose derivatives [28]. These sugars are known as important

energy sources for the sperm [29], thus contributing to its short-term preservation. Moreover, the presence of substances presenting antioxidant capability such as polyphenols, indoles, and alkaloids was recently proved in the AV extract [30], which can contribute to the prevention of the sperm oxidative damage derived from hypothermic storage of liquid semen [31].

The peccaries' semen storage at 5 °C provided the maintenance of sperm quality till 48h. This study provides a sperm lifespan longer than that previously reported for the same species by using the Beltsville Thawing Solution (BTS) as extender, but storing the samples at 17 °C [17]. In fact, it is known that the cooling rate is a factor that influences the sperm cell preservation protocol [2]. According to Decuadro-Hansen [32], the storage of semen in temperatures closer to 4 °C promotes a reduction in the sperm metabolism, saving its energy reserves, thus contributing to a good preservation of sperm motility. Otherwise, the use of storing temperatures varying from 15 to 20 °C maintains the cellular activity, making them more sensitive to toxic metabolic agents.

We emphasize that not all animals show the same resistance to conservative protocols. This is obvious from the results for semen chilling, as the values found for sperm parameters from a unique individual drastically fell after 36h, whereas the samples from the other four animals were efficiently preserved till 48h. The existence of variability regarding fresh ejaculates derived from different individuals was recently described [33]. Possibly, this variation could also be reflected in the resistance of the semen to conservation under lower temperatures.

Regarding peccaries' semen freezing, we verify that extenders containing AV extract, especially at 20% concentration, provide values for post-thawing sperm

parameters similar to those obtained in the EY use. Moreover, such results are similar to those previously reported in other studies using EY on peccaries' semen freezing using Tris [18] or coconut water [4] extenders. In spite of the rich constitution of AV extract, the substance that provides a specific cryoprotective effect remains unknown. It is known that it contains the folic acid and the zinc [34] that can act as antioxidants, thus improving the semen quality at reducing semen apoptosis [35]. Furthermore, it contains various polysaccharides [27], which, besides serving as an energy source, are known to present some extracellular cryoprotective effects, thus contributing to the sperm membrane stability [36].

In this research, we tested AV at 5, 10, and 20% concentrations for collared peccaries' semen freezing, with the best results being achieved in the use of 20% AV. In ovine, Gutiérrez et al. [14] tested AV extract in concentrations varying from 10 to 70% added to coconut water extender. They demonstrate that the best semen preservation is achieved when this extract is used from a 20 to 50% concentration, but if the concentration is increased above 50%, it will present significant detrimental effects on semen quality. In collared peccaries, other higher AV concentrations remain to be tested in order to determine the existence of any detrimental activity on the sperm.

The AV extract also contains phenol, saponin, and anthraquinones components that have antiviral and antifungal properties [26], and it was recently demonstrated for its antibacterial property against gram-positive and gram-negative pathogens [30]. In this sense, the use of AV extract could be stimulated as an alternative to EY, once its use as a content of some extenders has found some obstacles for the semen exchange between countries, especially due to possible risks of contamination [8]. However, it would be still

necessary to elucidate whether AV could really reduce or avoid microbial contamination in semen samples.

The most efficient post-thawing preservation of peccary's semen was surprisingly achieved in the use of an EY-AV combination. As demonstrated by CASA, the EY-AV combination provided the highest values for VSL, VAC, and straightness, which are parameters strongly correlated to the sperm penetration ability [24]. As largely known, the EY presents a low-density lipoprotein that forms a film around the membrane, thereby preventing the efflux of phospholipids and cholesterol, which are responsible for membrane stability [37]. Thus, such results could be a sum of the EY lipoprotein activity combined to the various positive AV effects. However, this combined use presents the advantage of not being appreciated for semen exchange due to the EY presence.

The use of computerized systems (CASA) has been presented as a useful tool for the monitoring of sperm quality in samples subjected to different experimental treatments, as new seminal extenders and cryoprotectants [38]. All along the years, CASA was validated for the use in several species [39]. In collared peccaries, the first use of this system was reported by Castelo et al. [18], who empirically applied the settings determined for domestic swine [40]. However, there are structural differences among sperm cells from different species [41], such as the cell size, which could interfere with the accuracy of the results [42]. In this research, we validate the settings for CASA use in collared peccaries, based on a sperm morphometric study preconized for the species [21] that showed that the head length of sperm in collared peccaries (6.34 μm) is inferior to that in domestic pigs, which present an average of 8.82 μm of length [43]. Besides allowing settings adequacy, such morphometric information also contributed to a correct differentiation between sperm heads and debris [42]. Moreover, the instrument settings were adjusted for capturing an average of 60 frames/s, whereas Castelo et al. [18] used only 25 frames/s in a previous

evaluation of the same species semen, which increases the image capture frequency, resulting in more accurate information on the sperm trajectory [42].

In a previous study using Tris and ACP®116 extenders plus EY-20% [4], authors reported that EY was not totally dissolved in extenders, especially in the use of ACP, thereby increasing the amount of debris that could interfere with the computerized analysis of semen. In fact, the CASA system cannot always discriminate between the sperm and properties of similar-sized semen particles, which may lead to an incorrect estimate [44]. In this study, the samples diluted in Tris-EY presented large amounts of debris, making necessary the re-dilution of the sample in salt solution before computerized analysis. However, such debris formation was not observed when using the AV extract. Furthermore, even the EY-AV combination provided a significant reduction in debris formation, allowing that semen analysis could be performed without additional dilution.

In conclusion, we demonstrate that *Aloe vera* extract at a 20% concentration could be efficiently used as a substitute for egg yolk in the formulation of Tris extenders for collared peccaries' semen chilling or freezing. Furthermore, the chilling process at 5 °C provided a sperm longevity till 48 h by using egg yolk or *Alloe vera* in Tris extender. Finally, the combination of egg yolk 10% and *Aloe vera* extract 10% in Tris extender increases the efficiency in obtaining adequate post-thawing sperm quality in collared peccaries.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Council of Scientific Development - CNPq (Process nº 552327/2011-5) for financial support; and CEMAS/UFERSA for providing the animals. Ana Liza Paz Souza, Gislayne Christianne Xavier Peixoto, and Andreia Maria Silva were

recipients of a grant from CAPES. Moacir Franco de Oliveira and Alexandre Rodrigues Silva were recipients of a grant from CNPq.

5. References

- [1] Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000;62:113-141.
- [2] Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008;70:1225-1233.
- [3] Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004;61:895 – 907.
- [4] Silva MA, Peixoto GCX, Castelo TS, Lima GL, Silva AM, Oliveira MF, Silva AR. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. *Cryobiology* 2013;67:50–55.
- [5] Kulaksız R, Çigdem Ç, Ebi C, Akcay E, Daskın A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram sêmen. *Small Rumin Res* 88;2010:12–15.
- [6] Iaffaldano N, Di Iorio M, Rosato MP, Manchisi A. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Anim Reprod Sci* 2014. Article in press.

- [7] Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 1998;50:699-706.
- [8] Pillet E, Duchamp G, Batellierc F, Beaumald V, Antond M, Deshercese S, Schmitte E, Magistrini M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 2011;75:105–114.
- [9] Boudreau MD, Beland FA. Uma avaliação das propriedades biológicas e toxicológicas de *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*". *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2006;24:103-54.
- [10] Hamman JH. Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel. *Molecules* 2008;13: 1599-1616.
- [11] Estakhr J, Javdan N. Spermatogenic activity of aloe vera in adult male rats. *Pharmacologyonline* 2011;2:886-889.
- [12] Modaresi M, Khodadadi A. The Effects of Aloe vera Extract on Reproductive Parameters in Mice. *International Conference on Biological, Environment and Food Engineering*; 2014.
- [13] Aguiar GV, Santos BMB, Cavalcante JMM, Rodrigues FRN, Salgueiro CCM. Adição de *Aloe vera* ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4°C. In: *Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal Ciência Animal*, 6, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: CONERA 2012:283-286.
- [14] Gutiérrez AJ, Cosme RW, Jiménez Y CJA, Ramírez GJA. Agua de coco, suero fetal bovino, *aloe vera* y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Arch Zootec* 2006;55:101-104.

- [15] Gongora J, Biondo C, Cooper JD, Taber A, Keuroghlian A, Altrichter M, Nascimento FF, Chong AY, Miyaki CY, Bodmer R, Mayor P, González S. Revisiting the species status of *Pecari maximus* van Roosmalen et al., 2007 (Mammalia) from the Brazilian Amazon. Bonn zoological Bulletin 2011; 60:95-101.
- [16] Oliveira SD, Mendes A, Nogueira SSC, Nogueira-Filho SLG. A Criação de *Caititus* (*Tayassu tajacu*) como alternativa de diversificação de produção e renda na região Cacaueira da Bahia, Brasil. MEMORIAS: Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica 2011: 247 – 256.
- [17] Garcia AR, Kahwage PR, Guimarães DAA, Ohashi OM. Chilled Semen of Captive Collared Peccaries (*Pecari tajacu*): Effects of Preservation at 17 °C on Semen Quality. J Agric Sci Technol A2 2012:921-929.
- [18] Castelo TS, Bezerra FS, Lima GL, Alves HM, Oliveira IR, Santos EA, Peixoto GC, Silva AR. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). Cryobiology 2010;61:275-9.
- [19] Souza, A.L.P., Castelo, T.S., Queiroz, J.P.A.F., Barros, I.O., Paula, V.V., Oliveira, M.F., Silva, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. Anim Reprod Sci 2009;116:370–375.
- [20] Silva AM, Peixoto GCX, Bezerra JAB, Castelo TS, Santos EAA, Silva AR. Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*). Cienc Rural 2014;44:1494-1498.
- [21] Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). Pesq Vet Bras 2013;33:924-930.

- [22] Santos EAS, Sousa PC, Peixoto GCX, Simão BR, Oliveira MF, Silva AR. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). Arq Bras Med Vet Zootec 2013;65:1257-1260.
- [23] Souza ALP, Lima GL, Peixoto GCX, Castelo TS, Bezerra JAB, Silva AR. Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*). XX Braz Cong Anim Reprod 2014;121.
- [24] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 2002;57:149-179.
- [25] Bicudo SD, Sousa DB, Takada L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. Rev Bras Reprod Anim 2003;27:120-127.
- [26] Chauhan S, Gupta KC, Agrawal M. Application of Biodegradable Aloe vera gel to control post harvest decay and longer the shelf life of Grapes. Int J Curr Microbiol App Sci 2014;3:632-642.
- [27] Reddy Uma CH, Reddy SK, Reddy J. Aloe vera -A wound healer. Asian J Oral Health All Sci 2011;1:91- 92.
- [28] Leung MYK, Liu C, Zhu LF, Hui B, Fung KP. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from Aloe vera L. var chinensis (Haw) Berg. Glycobiology 2004;14:501-510.
- [29] King SS, Speiser SA, Jones KL, Apgar GA, Wessels SE. Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of d-(+)-mannose into semen extender. Theriogenology 2006;65:1171-1179.

- [30] Nejatzadeh-Barandozi F. Antibacterial activities and antioxidant capacity of Aloe vera. *Org Med Chem Lett* 2013;3:5.
- [31] Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. *Theriogenology* 2001;56:577-589.
- [32] Decuadro-Hansen, G. La réfrigération et La congélation du sperme: expérience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience. *Gynécol Obstet Fertil* 2004;32:887-893.
- [33] Peixoto GCX, Silva MA, Castelo TS, Silva AM, Bezerra JAB, Souza ALP, Oliveira MF, Silva AR. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccarie (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). *Anim Reprod Sci* 2012;134:191– 196.
- [34] Shahraki A, Mojahed AS, Afshar-Goli J. The effects of hydroalcoholic extract of Aloe vera gel on spermatogenesis of adult male rats. *Int J Biosci* 2014;5:158-165.
- [35] Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *The FASEB J* 2001;15:1236-1238.
- [36] Hu JH, Li QW, Zhang T, Jiang ZL. Effect of *Gynostemma Pentaphyllum* Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Cryobiology* 2009;59:244-249.
- [37] Bergeron A, Crête M, 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 membrane. *Biol Reprod* 2004;70:708-717.
- [38] Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA After 25 Years. *J Androl* 2004;25:317-325.

- [39] Verstegen JP, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2001;57:149-157.
- [40] Vizcarra JA, Ford JJ. Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions, *Theriogenology* 2006;66:109-116.
- [41] Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 2006;37:597-612.
- [42] Matos DI, Araújo AA, Roberto LG, Toniolli R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* 2008;32:225-232.
- [43] Villalobos DG, Quintero-Moreno A, López-Brea JJG, Esteso MC, Fernández-Santos MR, Rubio-Guillén J, Silva WM, Marval YG, Atencio GL, Bohórquez CL. Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (Resultados Preliminares). *Revta Cient. FCV-LUZ* 2008;18:570-577.
- [44] Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NK, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod* 2000;15:1562- 67.

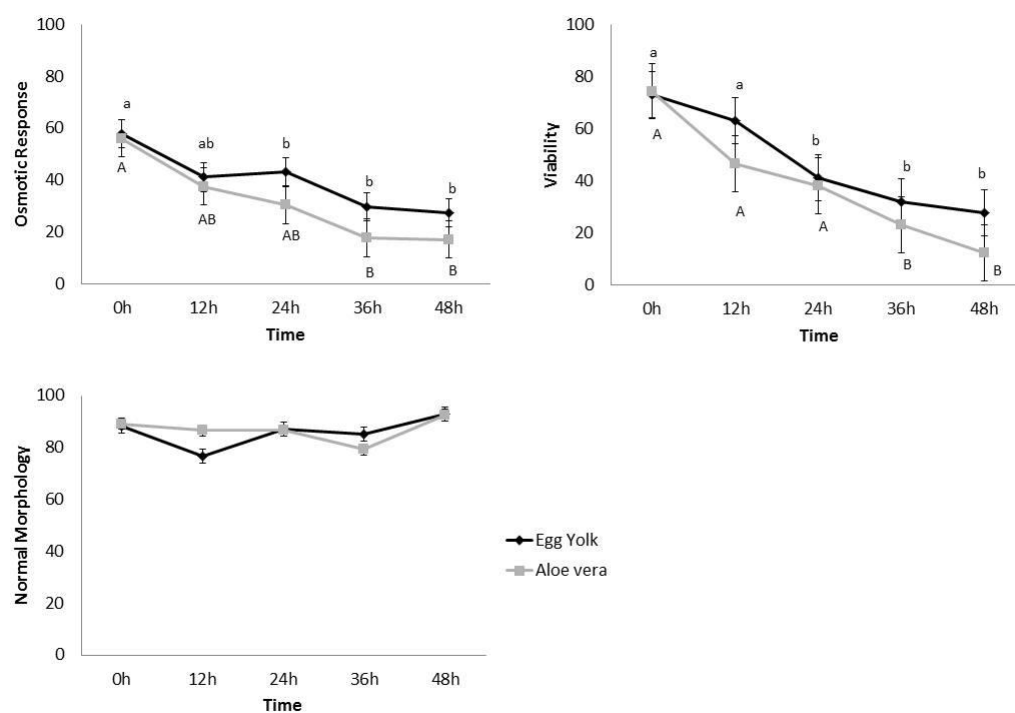


Figure 1: Values (means $\pm$ SEM) for sperm viability, morphology and osmotic response in collared peccaries (*Pecari tajacu*) chilled semen (n=5) diluted in Tris plus egg yolk (20%) or *Aloe vera* extract (20%), storage during 48h at 5 °C. (a,b) case letters indicate significant differences for the treatment egg yolk over time and (A,B) case letters indicate significant differences for the treatment Aloe Vera over time ($P < 0.05$).

Table 1: Values (means $\pm$ SEM) for kinematic parameters of sperm motility in collared peccaries (*Pecari tajacu*) chilled semen diluted in Tris plus egg yolk (EY) or *Aloe vera* extract (AV), storage during 48h at 5 °C.

	0h (n=5)		12h (n=5)		24h (n=5)		36h (n=5)		48h (n=4)	
	EY 20%	AV 20%	EY 20%	AV 20%	EY 20%	AV 20%	EY 20%	AV 20%	EY 20%	AV 20%
Total motility (%)	62.4 $\pm$ 5.9	71.4 $\pm$ 9.7	48.6 $\pm$ 11.7	44.4 $\pm$ 16.1	45 $\pm$ 11.5	39.2 $\pm$ 11.0	45.5 $\pm$ 9.0	40.2 $\pm$ 17.2	68 $\pm$ 14.3	54.2 $\pm$ 21.3
Velocity curvilinear (lm/s)	107.1 $\pm$ 7.3	107.9 $\pm$ 8.9	113 $\pm$ 11.1	102.0 $\pm$ 4.5	113.7 $\pm$ 6.2	83.1 $\pm$ 22.1	80.4 $\pm$ 20.5	65.2 $\pm$ 26.7	68.9 $\pm$ 20.2	58.8 $\pm$ 20.0
Velocity average pathway (lm/s)	51.7 $\pm$ 5.8	47.3 $\pm$ 5.6	51.8 $\pm$ 4.3	41.4 $\pm$ 2.6	48.6 $\pm$ 3.6	32.8 $\pm$ 10.2	35.6 $\pm$ 9.3	29.6 $\pm$ 12.2	37.4 $\pm$ 9.6	23.9 $\pm$ 10.1
Velocity straight line (lm/s)	32.3 $\pm$ 5.6	30.1 $\pm$ 3.6	32.5 $\pm$ 3.3	23.6 $\pm$ 3.0	31.1 $\pm$ 2.5	18.4 $\pm$ 7.0	20.5 $\pm$ 5.4	17.6 $\pm$ 7.4	23.9 $\pm$ 6.1	19.8 $\pm$ 6.8
Amplitude lateral head (lm)	6.86 $\pm$ 0.4	7.32 $\pm$ 0.3 ^a	6.85 $\pm$ 0.4	8.9 $\pm$ 1.7 ^{ab}	7.86 $\pm$ 1.1	5.28 $\pm$ 2.3 ^{ab}	4.68 $\pm$ 1.4	4.42 $\pm$ 1.9 ^{ab}	4.6 $\pm$ 1.4	2.74 $\pm$ 1.7 ^b
Beat cross frequency (Hz)	33.7 $\pm$ 3.1	35.8 $\pm$ 2.7	28.25 $\pm$ 1.4	37.4 $\pm$ 2.3	31.44 $\pm$ 2.3	31.3 $\pm$ 9.6	22.84 $\pm$ 6.1	18.7 $\pm$ 7.7	18.76 $\pm$ 5.0	20.4 $\pm$ 7.5
Straightness (%)	60.2 $\pm$ 4.7	61.6 $\pm$ 1.9	62.75 $\pm$ 3.1	54.6 $\pm$ 2.4	62.4 $\pm$ 5.2	42.8 $\pm$ 11.6	44.8 $\pm$ 11.5	33.4 $\pm$ 13.7	48.2 $\pm$ 12.2	36.4 $\pm$ 15.9
Linearity (%)	28.6 $\pm$ 3.6	3.0 $\pm$ 0.7	30.3 $\pm$ 2.1	29.0 $\pm$ 3.8	29 $\pm$ 2.9	22.0 $\pm$ 6.7	21.2 $\pm$ 5.6	15.8 $\pm$ 6.7	28.8 $\pm$ 8.6	22.4 $\pm$ 10.0
Subpopulations										
Rapid (%)	29.6 $\pm$ 7.5	38.6 $\pm$ 11.5	31.2 $\pm$ 11.2	25.6 $\pm$ 12.8	25.2 $\pm$ 10.1	33.6 $\pm$ 11.8	21.5 $\pm$ 7.1	20.2 $\pm$ 9.8	37.7 $\pm$ 9.3	12.2 $\pm$ 7.0
Medium (%)	22.4 $\pm$ 10.6	23.8 $\pm$ 4.7	10.4 $\pm$ 3.8	13 $\pm$ 6.1	13.8 $\pm$ 8.9	8.8 $\pm$ 3.2	11 $\pm$ 2.0	9.7 $\pm$ 4.9	15.7 $\pm$ 9.8	10.7 $\pm$ 3.0
Slow (%)	10.6 $\pm$ 1.8	11.8 $\pm$ 3.3	11.6 $\pm$ 3.7	9 $\pm$ 4.5	6.2 $\pm$ 1.5	17 $\pm$ 6.9	12.7 $\pm$ 4.2	10.2 $\pm$ 7.0	14.7 $\pm$ 4.8	31.7 $\pm$ 17.2
Static (%)	35.6 $\pm$ 7.6	25.8 $\pm$ 9.5	47 $\pm$ 13.1	52.6 $\pm$ 17.9	55 $\pm$ 11.5 ^A	40.8 $\pm$ 15.9 ^B	54.5 $\pm$ 9.1	59.7 $\pm$ 17.2	32 $\pm$ 14.3 ^A	45.2 $\pm$ 21.6 ^B

^{a,b} Superscript low case letters indicate significant differences found into the same treatments in different times ($P < 0.05$); ^{A,B} Superscript upper case letters indicate significant differences between treatments at each time ($P < 0.05$); When no letter is indicated, no significant difference was found ($P > 0.05$).

Table 2: Values (means $\pm$ SEM) for sperm morphology, viability, osmotic response and plasma membrane integrity in collared peccaries (*Pecari tajacu*) frozen-thawed semen (n=12) diluted in Tris plus egg yolk or *Aloe vera* extract in different concentrations.

	EY 20%	AV 20%	AV 10%	AV 5%	EY10AV10%
Normal morphology (%)	76.6 $\pm$ 1.4 ^a	66.9 $\pm$ 4.2 ^{ab}	67.6 $\pm$ 2.7 ^b	72.2 $\pm$ 3.2 ^{ab}	78.2 $\pm$ 3.4 ^a
Viability (%)	25.1 $\pm$ 2.9 ^{ab}	23.3 $\pm$ 5.5 ^{ab}	21 $\pm$ 5.5 ^b	20.7 $\pm$ 2.4 ^b	32.7 $\pm$ 2.3 ^a
Osmotic response (%)	34.8 $\pm$ 3.7 ^a	31.4 $\pm$ 5.6 ^a	30.8 $\pm$ 4.9 ^a	28.7 $\pm$ 4.8 ^a	37.8 $\pm$ 4.2 ^a
Membrane integrity (%)	27.5 $\pm$ 3.1 ^{ab}	27 $\pm$ 3.7 ^{ab}	27.6 $\pm$ 4.2 ^{ab}	24.7 $\pm$ 3.6 ^b	40.2 $\pm$ 3.1 ^a

^{a,b} Within a row, means without common superscript letters differed (P<0,05).

Table 3: Semen characteristics in after freezing-thawing procedures in analyses computer (CASA) collared peccaries (*Pecari tajacu*) collected by electroejaculation (n=12), (p<0.05).

	EY 20%	AV 20%	AV 10%	AV 5%	EY10AV10%
Total motility (%)	22.2 $\pm$ 5.03 ^a	26.3 $\pm$ 3.9 ^a	30.6 $\pm$ 7.6 ^a	21.5 $\pm$ 7 ^a	38.8 $\pm$ 8.4 ^a
Velocity straight line (μ m/s)	24.3 $\pm$ 3.6 ^a	20.5 $\pm$ 4.7 ^{ab}	14.9 $\pm$ 1.5 ^b	18.4 $\pm$ 2.3 ^{ab}	22.5 $\pm$ 2.7 ^a
Velocity average curvilinear (μ m/s)	86.8 $\pm$ 7.9 ^a	64.7 $\pm$ 8.9 ^{ab}	67.3 $\pm$ 3.1 ^b	69 $\pm$ 6.3 ^a	75.6 $\pm$ 8.8 ^a
Velocity average pathway (μ m/s)	37.8 $\pm$ 4.8 ^a	28.6 $\pm$ 5.0 ^{ab}	24.8 $\pm$ 1.9 ^b	28.2 $\pm$ 2.8 ^{ab}	32.5 $\pm$ 4.2 ^{ab}
Linearity (%)	32.1 $\pm$ 2.1 ^a	33.7 $\pm$ 2.4 ^a	26 $\pm$ 1.2 ^b	30.5 $\pm$ 1.7 ^{ab}	33.2 $\pm$ 1.4 ^a
Straightness (%)	64.2 $\pm$ 1.9 ^{ab}	71.6 $\pm$ 2.6 ^a	60.5 $\pm$ 2.1 ^b	64.5 $\pm$ 2.8 ^{ab}	69.2 $\pm$ 2.0 ^a
Amplitude lateral head (μ m)	6.4 $\pm$ 0.6 ^a	6.6 $\pm$ 0.3 ^a	5.8 $\pm$ 0.3 ^a	6.6 $\pm$ 0.3 ^a	6.6 $\pm$ 0.2 ^a
Beat cross frequency (Hz)	34.8 $\pm$ 2.0 ^a	35.1 $\pm$ 1.7 ^a	38.7 $\pm$ 1.4 ^a	37.4 $\pm$ 1.4 ^a	37.9 $\pm$ 0.7 ^a
Subpopulation					
Rapid (%)	10.1 $\pm$ 5.3 ^{ab}	6.4 $\pm$ 0.7 ^{ab}	5.3 $\pm$ 1.3 ^b	10.2 $\pm$ 4.9 ^{ab}	11.8 $\pm$ 2.3 ^a
Medium (%)	9.7 $\pm$ 2.8 ^c	30.4 $\pm$ 3.9 ^a	27.7 $\pm$ 6.3 ^a	18.2 $\pm$ 5.6 ^{bc}	34.5 $\pm$ 8.3 ^{ab}
Slow (%)	7.3 $\pm$ 1.9 ^b	9.6 $\pm$ 1.5 ^a	7.5 $\pm$ 1.4 ^a	7.3 $\pm$ 1.7 ^a	8.5 $\pm$ 2.0 ^a
Static (%)	73 $\pm$ 6.5 ^a	53.3 $\pm$ 4.1 ^b	59.4 $\pm$ 8.2 ^a	60.3 $\pm$ 9.2 ^a	45.2 $\pm$ 9.9 ^b

^{a,b} Within a row, means without common superscript letters differed (P<0,05).

**Uso do detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex®
STM) na criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*)**

Uso do detergente a base de dodecil sulfato de sódio (Equex® STM) na criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*)

[Use of detergent the basis of sodium dodecyl sulfate (Equex® STM) in peccaries semen cryopreservation (Pecari tajacu)]

A.L.P. Souza^a, A.E.A. Lago^a, L.G.P. Bezerra^a, L.B. Campos^a, T.L. Nunes^b, V.V. Paula^b,
A.R. Silva^{a*}

^a Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil;

^b Laboratório de Técnica Cirúrgica Veterinária e Anestesiologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil

* Autor para correspondência, endereço de e-mail: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva)

Resumo

A demanda internacional da carne e pele de cateto e a degradação do meio ambiente têm gerado grandes interesses quanto à conservação da espécie. Neste sentido, o aprimoramento de biotécnicas como a criopreservação de sêmen torna-se uma ferramenta valiosa. Assim, o uso de aditivos como o detergente a base de Duodecil Sulfato de sódio (SDS) seria de grande relevância por já ter promovido um aumento na qualidade e longevidade da célula espermática de espécies domésticas e selvagens. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do Equex® STM no sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*). Para tanto, foram utilizados ejaculados, obtidos por eletroejaculação (n=12). O detergente Equex (0,5 e 1,0%) foi adicionado ao diluente à base de Tris-gema 10% *Aloe vera* 10%. A coleta e a criopreservação foram realizadas de acordo com procedimentos estabelecidas para a espécie. Após a descongelação as amostras foram submetidas ao teste de termorresistência no decorrer de 120 min para avaliação da longevidade espermática. Após a análise dos dados, foi verificado que a adição do Equex® STM em nenhuma concentração proposta aumentou a longevidade da célula espermática que se manteve por até 15 minutos apresentando melhores resultados de motilidade total no tratamento sem a adição do detergente quando comparado com os tratamentos com 0,5% e 1,0 % de Equex respectivamente (25,8±5,1, 20,7±5,5 e 23,9±5,3). Conclui-se que a adição do Equex ao sêmen de catetos não aumentou a

longevidade das células espermáticas nem melhorou a qualidade da mesma em nenhuma das concentrações avaliadas.

Palavras-chave: *Pecari tajacu*, Detergente, SDS, teste de termorresistência, criopreservação de sêmen.

1. Introdução

Os catetos (*Pecari tajacu*) são mamíferos ungulados pertencentes à família dos Tayassuídeos. Estes possuem ampla distribuição geográfica, no entanto, vem sofrendo impactos nos diferentes territórios brasileiros. A avaliação dos Tayassuídeos por biomas traçou um quadro grave, com ocorrência de extinção regional e espécies criticamente ameaçadas, a exemplo dos biomas Caatinga e Mata Atlântica (Dezbiez et al., 2012). Esta espécie está entre as mais caçadas dada a sua carne e pele de alto valor no mercado internacional além de ser excelente fonte de proteína (Gongora et al., 2014), o que ocasionou redução da população existente (Nogueira e Nogueira Filho, 2011). Neste sentido, a criopreservação de sêmen torna-se uma ferramenta valiosa podendo ser considerada uma estratégia de conservação. Além disso, a conservação de espécies silvestres, consequentemente, gera aumento do estoque populacional, sendo ainda indicada para a diversificação de produção e renda para produtores rurais, sobretudo em regiões onde as condições locais limitam o potencial produtivo de espécies domésticas (Santos et al., 2009).

Protocolos de criopreservação têm sido testados em catetos utilizando diluentes a base de Tris (Alves et al., 2013) ou água de coco, ACP® (Silva et al., 2013), apresentando promissores resultados. Ainda assim, permanece à busca de protocolos que reduzam os danos causados pelo processo de criopreservação, mantendo a qualidade espermática satisfatória. Assim, dada a necessidade de melhorar a qualidade e longevidade espermática após a descongelação, autores tem proposto em diferentes espécies, o uso de

detergentes derivados do dodecil sulfato de sódio (SDS), como o Equex® STM (Nova Chemical, Scituate, MA, USA), (Bencharif et al., 2012) e o Orvus ES (Nova Chemical, Scituate, MA, USA), (Tsutsui et al., 2000).

O SDS protege à membrana plasmática do espermatozoide, contra o choque térmico e demais alterações promovidas pelo processo de criopreservação (Bittencourt et al., 2008), melhorando os índices qualitativos, sobrevivência, longevidade e fertilidade dos espermatozoides pós descongelação (Maia et al., 2005) garantindo desta forma a utilização do sêmen descongelado por um maior tempo e melhorando a sua utilização para uma possível inseminação artificial. Estudos com a incorporação de detergentes contendo SDS aos diluentes tem sido relatado em várias espécies domésticas, como cães (Costa et al., 2013), gatos (Axner et al., 2004) e selvagens, como lobo cinzento (Zindl et al., 2006), alpacas (Morton et al., 2010) e ursos (Anel et al., 2010).

Assim, tendo em vista a necessidade de melhorar a qualidade da célula espermática pós-descongelação de catetos e o efeito benéfico do uso do SDS descrito em algumas espécies, este estudo teve como objetivo avaliar o uso de Equex® STM quanto a sua capacidade de aumentar a longevidade espermática pós-descongelação, bem como determinar a concentração para uso na criopreservação de sêmen da referida espécie.

2. Metodologia

O protocolo experimental, bem como os procedimentos adotados para os animais, foram aprovados pela comissão de ética de uso de animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA (CEUA/UFERSA nº 23.091,0253 / 114.). Os reagentes utilizados foram obtidos no Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.1 Local do experimento

O estudo foi realizado no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). O CEMAS está registrado no IBAMA como criadouro científico sob o número 12.492-0004. O sêmen dos animais foi processado no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) da UFERSA.

2.2 Animais e coleta de sêmen

Foi utilizado um grupo de doze catetos machos adultos, criados em cativeiro em recintos coletivos, previamente selecionados para o experimento através de exame clínico-geral. A alimentação dos mesmos correspondeu a uma ração balanceada para suínos, fabricada na própria UFERSA, acrescida de vegetais. Os animais foram inicialmente submetidos à contenção mecânica utilizando-se um puçá, após um jejum alimentar de 12 h. Para a contenção química, foi utilizado o Propofol, por via endovenosa, na dose 5 mg/Kg (Souza et al., 2009). Durante o procedimento, os animais foram mantidos sob fluidoterapia com parâmetros fisiológicos monitorados. Todo o procedimento realizado nos animais foi realizado às 6:00h da manhã.

Quando os animais se encontraram em plano anestésico, foi realizada a tricotomia e higienização da região prepucial. Para a coleta do sêmen foi utilizado um eletroejaculador (Autojac ®, Neovet, Campinas, SP, Brasil), conectado a uma fonte de 12-V, com eletrodo retal com fibras longitudinais, previamente lubrificados. Antes do procedimento, foi realizado o esvaziamento da ampola retal do animal, para a retirada de fezes. Foi procedido um protocolo de eletroejaculação contínuo, onde foram

administrados estímulos iniciando-se com dez repetições de 5 V, sendo a intensidade aumentada em 1 V, até serem atingidos 12 V. Nesta voltagem, os estímulos continuaram até que o tempo desde o início do protocolo completasse dez minutos, quando o procedimento foi finalizado, quer o animal tivesse ou não ejaculado (Castelo et al., 2010a). O ejaculado foi coletado no interior de tubos plásticos de 50 mL e imediatamente submetido à avaliação.

2.3 Congelação e descongelação de sêmen

As amostras de sêmen provenientes dos 12 catetos foram divididos em 3 alíquotas. Estes foram diluídos em diluente de Tris suplementado com gema (10%) e *Aloe vera* (AV), (10%), (Souza et al., 2014b) e adicionado duas concentrações de equex (0,5 e 1,0%) bem como o grupo controle sem a adição do detergente. Todas as diluições foram realizadas à temperatura ambiente (27 °C) e, em seguida, as amostras foram equilibradas durante 40 minutos para atingir 15 °C em uma incubadora de demanda biológica de oxigênio, BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil). Após este período, a incubadora foi ajustada para manter a temperatura a 5 °C durante 30 minutos. Nesse ponto, foi adicionada a amostra o glicerol a 6% (também a 5 °C), que resultou numa concentração final de 3% de glicerol. Finalmente, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV Technologies; L'Aigle, França) e colocadas horizontalmente em caixa termica durante 5 min, a 5 cm acima do nível do nitrogênio (N₂) líquido. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após 1 semana, as amostras congeladas foram descongeladas por imersão em banho maria a 37 °C durante 1 min (Silva et al., 2013).

2.4 Avaliação de sêmen

Os ejaculados frescos foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, cor e volume. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros de motilidade espermática, vigor, viabilidade, morfologia, resposta osmótica e integridade da membrana. A concentração de espermatozóides foi determinada utilizando câmara de Neubauer para contagem celular (Silva et al., 2014).

Esfregaços corados com rosa bengala foram preparados para avaliar a morfologia espermática usando microscopia de luz (1000x), contando 200 células por lâmina (Sousa et al., 2013). O percentual de espermatozóides viáveis foi estabelecido através da análise de uma lâmina corada com azul de Bromefenol avaliada sob microscopia de luz (400x), contando 200 células por lâmina. A integridade funcional da membrana espermática foi verificada através da avaliação da resposta osmótica sob teste hiposmótico (HOS), utilizando água destilada (0 mOsm/L) como solução hiposmótica (Santos et al., 2013). A fim de realizar a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada uma solução composta pelos fluoróforos diacetato de 6-carboxi-fluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídio (PI), tal como foi previamente validado para a espécie (Souza et al., 2014b).

Os parâmetros de motilidade espermática foram analisados por análise computadorizada de sêmen (IVOS 7.4G, Hamilton-Thorne Research™, Beverly, MA, EUA). As configurações do instrumento foram validadas para a espécie antes da análise, apresentando temperatura de 37 °C; 60 frames/s; contraste mínimo, 45; limiar de retidão, 30%; velocidade média da trajetória (VAP), 30. Para a avaliação foram selecionados cinco campos aleatórios e não consecutivos. Os seguintes pontos foram analisados: número de células contadas, motilidade total (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), a velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude de

deslocamento linear da cabeça (ALH; μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR;%), e linearidade (LIN;%). Ainda, a população total espermática foi subdividida em quatro categorias: rápida (%), média (%), lenta (%) e estática (%), (Souza et al., 2014 – dados não publicados).

Apenas nas amostras descongeladas, foi procedido o teste de termorresistência com o intuito de avaliar o tempo de sobrevivência das células espermáticas. O teste consistiu na incubação das amostras de sêmen descongelado, em banho-maria a 37 °C por 120 minutos.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e analisadas pelo software Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, EUA). Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade pelo teste de Levene. Os valores expressos em percentuais foram transformados em arcoseno. O efeito do tempo (0, 15, 30, 60 e 90 e 120min.) durante o teste de termorresistência quanto aos parâmetros espermáticos foram avaliados por meio de análise de variância ANOVA, para medidas repetidas. As comparações entre os tratamentos para o sêmen descongelado foram avaliados por análise de variância, seguida pelo teste t de Student de Newman-Keul. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Foi coletado um total de 12 ejaculados, (1/animal) no qual todos apresentaram cor branca, aspecto leitoso-aquoso e volume médio de $2,8 \pm 1,4$ mL. Com relação às

características microscópicas, verificou-se que a concentração espermática foi de $304,2 \pm 24,4 \times 10^6$ espermatozoides/mL; motilidade espermática de $95,4 \pm 1,4\%$; vigor de $4,8 \pm 1,4$; viabilidade de $85,3 \pm 1,6\%$; integridade de membrana de $82,6 \pm 1,9\%$, resposta osmótica de $86,2 \pm 2,5\%$ e morfologia espermática normal de $83,8 \pm 2,5\%$. Em todas as amostras coletas foi observada a presença de gel no final da fração. As características do sêmen fresco pela análise computadorizada estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Características (média $\pm$ E.P) do sêmen fresco de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), (n=12), (P<0.05).

	MÉDIA $\pm$ E.P
Motilidade Total (%)	89,2 $\pm$ 2,6
Motilidade Progressiva (%)	63,7 $\pm$ 5,6
Velocidade Curvilínea (VCL - μ m/s)	115,3 $\pm$ 8,2
Velocidade linear Progressiva (VSL - μ m/s)	43,8 $\pm$ 4,6
Velocidade Média da Trajetória (VAP - μ m/s)	58,9 $\pm$ 5,0
Amplitude de Deslocamento Linear da cabeça (ALH - μ m)	5,9 $\pm$ 0,3
Frequência de Batimento Flagelar Cruzado (BCF - Hz)	36,1 $\pm$ 0,8
Retilinearidade (STR - %)	72 $\pm$ 2,6
Linearidade (LIN - %)	39,6 $\pm$ 3,0
Subpopulações	
Rápido (%)	77 $\pm$ 5,7
Médio (%)	12,3 $\pm$ 3,2
Lento (%)	3,2 $\pm$ 0,6
Estático (%)	7,7 $\pm$ 2,4

Na avaliação de espermatozoides viáveis, verificou-se que o tratamento sem a presença de Equex apresentou o maior tempo de manutenção, com declínio significativo verificado aos 30 minutos, enquanto nos demais, este declínio já era observado aos 15 minutos. Quanto à análise da integridade de membrana por fluorescência, todos os tratamentos se comportaram da mesma maneira, com declínio aos 15 minutos. No entanto, neste tempo o tratamento sem a presença de Equex mostrou-se superior aos demais (Tab. 2).

Tabela 2: Valores (média $\pm$ E.P) de Viabilidade e Fluorescência (IP/CFDA) verificada no sêmen descongelado de catetos (Pecari tajacu) diluído em Tris gema/*Aloe vera*, acrescida de diferentes concentrações (0, 0,5 ou 1,0%) de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	Viabilidade Espermática (%)			Fluorescência (%)		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	31,4 $\pm$ 5,9 ^{aA}	29,9 $\pm$ 3,9 ^{aA}	33,9 $\pm$ 4,5 ^{aA}	31,4 $\pm$ 5,9 ^{aA}	29,9 $\pm$ 3,9 ^{aA}	33,9 $\pm$ 4,5 ^{aA}
15min.	24,7 $\pm$ 4,7 ^{abA}	21,9 $\pm$ 3,3 ^{bA}	25,3 $\pm$ 5,1 ^{bA}	33,8 $\pm$ 7,2 ^{bA}	26,6 $\pm$ 3,7 ^{baB}	37,4 $\pm$ 5,3 ^{bB}
30min.	17,9 $\pm$ 4,7 ^{ba}	18,6 $\pm$ 2,6 ^{ba}	23 $\pm$ 6,0 ^{ba}	24,7 $\pm$ 4,7 ^{ba}	21,9 $\pm$ 3,3 ^{ba}	25,3 $\pm$ 5,1 ^{ba}
60min.	16,3 $\pm$ 5,4 ^{bcA}	17 $\pm$ 2,6 ^{ba}	13,7 $\pm$ 3,4 ^{cA}	17,9 $\pm$ 4,7 ^{cA}	18,6 $\pm$ 2,6 ^{cA}	23 $\pm$ 6,0 ^{cA}
90min.	9,6 $\pm$ 1,6 ^{ba}	9 $\pm$ 1,5 ^{cA}	15,6 $\pm$ 5,7 ^{cdA}	16,3 $\pm$ 5,4 ^{cA}	17 $\pm$ 2,6 ^{da}	13,7 $\pm$ 3,4 ^{cA}
120min.	7,2 $\pm$ 2,2 ^{cA}	6,8 $\pm$ 1,4 ^{cA}	10,2 $\pm$ 3,6 ^{da}	9,6 $\pm$ 1,6 ^{cA}	9 $\pm$ 1,5 ^{dB}	15,6 $\pm$ 5,7 ^{dAB}

a,b,c Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05); A,B Letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas (P<0,05).

A resposta osmótica e a porcentagem de células morfológicamente normais foram avaliadas imediatamente após a descongelação e a cada 1h como verificado na tabela 3.

Tabela 3: Valores (média $\pm$ E.P) de resposta osmótica e Morfologia (normais) verificada no sêmen descongelado de catetos (Pecari tajacu) diluído em Tris gema/*Aloe vera*, acrescida de diferentes concentrações (0, 0,5 ou 1,0%) de Equex® STM , submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	Hiposmótico (%) [*]			Morfologia (Normais - %) [*]		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	40 $\pm$ 4,1 ^a	37,7 $\pm$ 4,2 ^a	26,2 $\pm$ 7,1 ^a	68,7 $\pm$ 4,4 ^a	69,3 $\pm$ 2,9 ^a	75,1 $\pm$ 3,5 ^a
60min.	24,4 $\pm$ 5,4 ^b	16,3 $\pm$ 4,2 ^b	15,8 $\pm$ 5,7 ^b	64,3 $\pm$ 5,4 ^a	72,6 $\pm$ 3,2 ^a	73,2 $\pm$ 3,5 ^a
120min.	28,7 $\pm$ 13,8 ^{ab}	15,7 $\pm$ 4,3 ^b	20,4 $\pm$ 9,5 ^b	75,1 $\pm$ 3,5 ^a	73,2 $\pm$ 3,5 ^a	64,4 $\pm$ 5,0 ^a

a,b,c Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05);

* Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (P<0,05).

Os dados referentes às características do sêmen descongelado analisados pelo computador (CASA) no decorrer dos tempos estão expressos nas tabelas 4, 5, 6, e 7. A Velocidade da trajetória do espermatozoide apresentou maior tempo de manutenção nos tratamentos sem Equex e no tratamento com 0,5% ambos com declínio significativo no tempo 30 enquanto o tratamento com 1,0% de Equex apresentou declínio no tempo 15. No tempo zero, o melhor tratamento verificado foi com Equex 0,5%, nos demais tempos não foi observada diferença entre os tratamentos (Tab. 5). Para a linearidade (LIN), o tratamento com 0,5% de Equex apresentou-se superior aos demais tratamentos no tempo zero (Tab. 7).

4. Discussão

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a ação do SDS (Equex® STM) sobre as células espermáticas de cateto. De forma geral o uso do Equex não aumentou a longevidade da célula espermática de cateto que se manteve há até 15 minutos como pode ser observado pela análise de motilidade total e progressiva (Tab. 4). Campos et al. (2014) quando avaliaram a longevidade da célula espermática da mesma espécie sem o uso de aditivos também descreveu que o tempo máximo para a utilização do sêmen da referida espécie seria de 15 minutos, sugerindo que os espermatozoides de catetos são sensíveis ao processo de criopreservação assim como os espermatozoides de suínos, a espécie filogeneticamente mais próxima do cateto (Cavalcante-filho et al., 1998).

Axner et al. (2004), também relataram efeito negativo que o Equex parece exercer sobre a membrana espermática, e motilidade após a descongelação de sêmen de gatos, sugerindo no entanto que este fato não exclui a possibilidade do uso do Equex. Segundo Peña & Linde-Forsberg, 2000, na avaliação de sêmen de cães o efeito do Equex sobre as células espermáticas é mais pronunciado quando o tempo de pré-congelação é menor. Diante disso, sugere-se a realização de novos estudos na criopreservação de sêmen de catetos com o intuito de avaliar o efeito do Equex a ser acrescentada ao final do processamento ou ainda após a descongelação.

Ainda, neste estudo foi verificado que não houve diferença estatística entre os tratamentos na maioria dos testes avaliados demonstrando desta forma que a adição do Equex em qualquer concentração (0,5 ou 1,0%), não melhora a qualidade da célula espermática. Em lobos cinzentos, a adição de 1,0% de Equex não apresentou efeitos benéficos sendo sugerido o uso de 0,5% (Zindl et al. , 2006). Em contrapartida, Maia et

al. (2005) ao avaliarem o efeito de duas concentrações de Equex (0,5 e 1,0%) no sêmen de carneiro relataram seu efeito benéfico sobre a motilidade espermática após a descongelação em ambas concentrações.

De acordo com o presente trabalho, embora não tenha apresentado diferenças estatísticas entre os tratamentos, os melhores resultados foram observados no tratamento sem a presença do Equex quando comparado com outros trabalhos na mesma espécie sem o uso do detergente. Possivelmente, o uso do gel de *Aloe vera* com a gema de ovo tenha impossibilitado a ação do Equex em solubilizar as proteínas da gema fazendo – se necessário estudos com outros crioprotetores, visto que o efeito crioprotetor do Equex só é visto na presença da gema do ovo e acredita-se ser exercida por modificações das lipoproteínas da gema (Peña & Linde-Forsberg, 2000) e como a ação do gel de *Aloe vera* sobre a célula espermática ainda não é conhecido a sua presença pode ter interferido direta ou indiretamente na ação do Equex. Pursel et al. já em 1978 descreveu que a adição de SDS (Orvus ES Paste (OEP)) na sua concentração mínima (0,1%) em um diluente desprovido de gema teve efeito deletério na motilidade espermática de suínos.

Embora o Equex não tenha melhorado a qualidade espermática nem aumentado à longevidade da mesma, o seu uso não trouxe nenhum efeito tóxico para a célula espermática de catetos que manteve seus valores de viabilidade, resposta osmótica e morfologia (tab. 2 e 3) dentro do padrão previsto para a espécie (Peixoto et al., 2012). Segundo Peña e Linde-Forsberg (2000), uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS pode conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática, ocasionando um prejuízo à qualidade espermática, o que não foi observado no presente estudo visto que Campos et al. (2014) ao avaliar o teste de termorresistência no cateto sem a adição de Equex verificou resultados semelhantes de integridade funcional de membrana ($15,9 \pm 7,7$) e viabilidade espermática ($14,6 \pm 7$) no tempo máximo testado (60min.) quando

comparado com qualquer concentração de Equex utilizada neste estudo no mesmo tempo (tab. 2 e 3).

De acordo com os dados observados pela análise computadorizada, o uso do Equex apresentou resultados superiores ao já reportado para a espécie por castelo et al. (2010b) e Silva et al. (2012) para VCL e o ALH. Esta melhora talvez se deva a interação entre gema e o gel de *Aloe vera* pela capacidade do mesmo em prevenir o dano oxidativo causado à célula espermática pela presença de antioxidantes (Nejatzadeh-Barandozi F. 2010). Ainda, a adição do Equex não exerceu efeito tóxico para a célula podendo considerar que o este não interagiu com a membrana da célula espermática do cateto.

5. Conclusão

Diante dos dados observados conclui-se que a adição do detergente Equex® STM ao diluente Tris – Gema/*aloe vera* 10% no sêmen de catetos (*Pecari tajacu*) não aumenta a longevidade da célula espermática que se manteve há até 15 minutos. Ainda, a presença do Equex não interferiu na qualidade da célula não apresentando efeito tóxico.

6. Referências

- Alves, H.M.; Oliveira, I.R.S.; Castelo, T.S.; Lima, G.L.; Souza, A.L.P.; Moreira, M.A.P.; Paula, V.V.; Silva, A.R. Comparison of different glycerol and egg yolk concentrations added to tris-based extender for the collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen freezing. **Reprod. Domest. Anim.**, v.48, p.506-511, 2013.
- Anel, L.; Gomes-Alvesa, S.; Alvareza, M.; Borraganc, S.; Anela, E.; Nicolasa, M.; Martinez-Pastord, F.; Paz, P. Effect of basic factors of extender composition on post-

- thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, 74, 643–651, 2010.
- Axnér, E.; Hermansson, U.; Linde-Forsberg, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, 84, 179–191, 2004.
- Bencharif, D.; Amirat-briand, L.; Garand, A.; Anton, M.; Schmitt, E.; Desherces, S.; Delhomme, G.; Langlois, M.L.; Barrière, P.; Destrumelle, S.; Vera-Munoz, V.; Tainturier, D. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. **Res. Vet. Sci.**, v.93, p.440-447, 2012.
- Bittencourt, R.F.; Ribeiro Filho, A.L.; Lima, M.C.C.; Alves, S.G.G.; Vasconcelos, M.F.; Biscarde, C.E.; Leal, L.S.; Oba, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 305-312, 2008.
- Campos, L.B.; Silva, M.A.; Bezerra, J.A.B.; Castelo, T.S.; Peixoto, G.C.X.; Silva, A.R. Survival of collared peccaries (*pecari tajacu*) sperm after freezingthawing using different extenders. **Acta Scientiae Veterinariae**, 42: 1217, 2014.
- Castelo, T.S.; Bezerra, F.S.B.; Souza, A.L.P.; Moreira, M.A.P.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, V. 74 1060-1065, 2010a.
- Castelo, T.S.; Bezerra, F.S.; Lima, G.L.; Alves, H.M.; Oliveira, I.R.; Santos, E.A.; Peixoto, G.C.X.; Silva, A.R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the

- semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, 61:275-9, 2010b.
- Cavalcante-Filho, M.F.; Miglino, M.A.; Machado, G.V.; Bevilacqua, E.M.A.F.; Neves W.C. Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). **Brazilian Journal of Morphology Science**. 15: 203-207, 1998.
- Costa, L.L.M.; Castelo, T.S.; Souza, A.L.P.; G.L. Lima, G.L.; Silva, A.R. Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.53-58, jan./mar. 2013.
- Desbiez, A.L.J.; Keuroghlian, A.; Beisiegel, B.M.; Medici, E.P.; Gatti A.; Pontes, A.R.M.; Campos, C.B.; Tofoli, C.F.; Moraes JR., E.A.; Azevedo, F.C.; Pinho, G.M.; Cordeiro, J.L.P.; Santos JR., T.S.; Moraes, A.A.; Mangini, P.R.; Flesher, K.; Rodrigues, L.F.; Almeida, L.B. Avaliação do risco de extinção do cateto (*Pecari tajacu* – Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, ano II, n.3, 74 – 83, 2012.
- Gongora, J.; Biondo, C.; Cooper, J.D.; Taber, A.; Keuroghlian, A.; Altrichter, M.; Nascimento, F.F.; Chong, A.Y.; Miyaki, C.Y.; Bodmer, R.; Mayor, P.; González, S. Revisiting the species status of *Pecari maximus* van Roosmalen et al., 2007 (*Mammalia*) from the Brazilian Amazon. **Bonn zoological Bulletin**, 60:95-101, 2011.
- Maia, M. S.; Azevedo, H.C.; Bicudo, S.D.; Sousa, D.B.; Rodello, L. Efeito da adição do Equex-STM ao diluente Tris-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 311, Suplemento 1, 2005.

- Morton, K.M.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. **Theriogenology**, 74, 311–316, 2010.
- Nejatzadeh-Barandozi, F. Antibacterial activities and antioxidant capacity of Aloe vera. **Org. Med. Chem. Lett.**, 3-5, 2013.
- Nogueira, S.S.C.; Nogueira-Filho, S.L.G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. **Biodivers. Conserv.**, 20: 1385–1397, 2011.
- Peixoto, G.C.X.; Silva, M.A.; Castelo, T.S.; Silva, A.M.; Bezerra, J.A.B.; Souza, A.L.P.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccarie (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Anim. Reprod. Sci.**, 134:191– 196, 2012.
- Peña, A.; Linde-forsberg, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.
- Pursel, V.G.; Schulman, L.L.; Johnson, L.A. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. **J. Anim. Sci.**, 47:198 –202, 1978.
- Santos, E.A.S.; Sousa, P.C.; Peixoto, G.C.X.; Simão, B.R.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*), **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 65, 1257-1260, 2013.

Santos, D.O.; Mendes, A.; Nogueira, S.S.C.; Nogueira Filho, S.L.G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.1, p.1-10, jan/mar, 2009.

Silva, A.M.; Peixoto, G.C.X.; Bezerra, J.A.B.; Castelo, T.S.; Santos, E.A.A.; Silva, A.R. Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1494-1498, 2014.

Silva, M.A.; Peixoto, G.C.X.; Castelo, T.S.; Lima, G.L.; Silva, A.M.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. **Cryobiology**, 67:50–55, 2013.

Silva, M.A.; Peixoto, G.C.X.; Lima, G.L.; Bezerra, J.A.B.; Campos, L.B.; Paiva, A.L.C.; Paula, V.V., Silva, A.R. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol, **Theriogenology**, 78–611, 2012.

Sousa, P.C.; Santos, E.A.A.; Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Barros, F.F.P.C.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesq. Vet. Bras.**, 33:924-930, 2013.

Souza, A.L.P.; Castelo, T.S.; Queiroz, J.P.A.F.; Barros, I.O.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. **Anim. Reprod. Sci.**, 116:370–375, 2009.

Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Peixoto, G.C.X.; Castelo, T.S.; Bezerra, J.A.B.; Silva, A.R. Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática

- de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*). **XX Braz Cong. Anim. Reprod.**, 121, 2014a.
- Souza, A.L.P.; Lima, G.L.; Peixoto, G.C.X.; Bezerra, J.A.B.; Silva, A.M.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Innovative use of Aloe vera as a cryoprotectant for the collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing. **V International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, 2014b.
- Tsutsui, T.; Hase, M.; Tanaka, A.; Fujimura, N.; Hori, T.; Kavakami, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk Tris- fructose citrate. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.603-606, 2000.
- Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, 57:149-179, 2002.
- Zindl, C.; Asa, C.S.; Guñzel-Apel, A.-R. Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C. l. baileyi*). **Theriogenology**, 66, 1797–1802, 2006.

Tabela 4: Características (média $\pm$ E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	Motilidade Total (%) [*]			Motilidade Progressiva (%) [*]		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	25,8 $\pm$ 5,1 ^a	20,7 $\pm$ 5,5 ^a	23,9 $\pm$ 5,3 ^{ab}	8,7 $\pm$ 2,0 ^b	10,3 $\pm$ 3,5 ^b	9,6 $\pm$ 2,8 ^a
5min.	31,7 $\pm$ 5,7 ^a	26,9 $\pm$ 5,7 ^a	31,4 $\pm$ 6,3 ^a	13,2 $\pm$ 2,4 ^a	13,9 $\pm$ 3,5 ^{ab}	13,9 $\pm$ 3,4 ^a
15min.	26 $\pm$ 5,5 ^a	30,2 $\pm$ 5,6 ^a	21,7 $\pm$ 6,4 ^b	12,6 $\pm$ 3,2 ^a	15,8 $\pm$ 3,6 ^a	10,8 $\pm$ 3,9 ^a
30min.	16,4 $\pm$ 4,7 ^b	19,7 $\pm$ 6,2 ^b	20,4 $\pm$ 8,1 ^c	6,2 $\pm$ 1,9 ^c	9,2 $\pm$ 3,6 ^c	6,6 $\pm$ 2,4 ^b
60min.	12,5 $\pm$ 4,1 ^c	12,4 $\pm$ 4,5 ^c	11,2 $\pm$ 3,9 ^d	5,5 $\pm$ 2,4 ^{ce}	3,4 $\pm$ 1,0 ^d	3,3 $\pm$ 1,6 ^c
90min.	6,9 $\pm$ 2,3 ^d	3,7 $\pm$ 1,6 ^d	4,6 $\pm$ 3,1 ^e	2,6 $\pm$ 0,9 ^d	1,2 $\pm$ 1,0 ^e	1,8 $\pm$ 1,4 ^d
120min.	2,2 $\pm$ 1,1 ^e	2,7 $\pm$ 0,7 ^e	5,2 $\pm$ 4,2 ^f	0,7 $\pm$ 0,5 ^{de}	0,7 $\pm$ 0,4 ^e	1,4 $\pm$ 1,4 ^d

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05);

^{*} Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (P<0,05).

Tabela 5: Características (média $\pm$ E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	VAP (μ m/s)			VSL (μ m/s)			VCL (μ m/s)		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	35,2 $\pm$ 2,3 ^{bcdB}	45,6 $\pm$ 4,0 ^{abA}	39,4 $\pm$ 4,0 ^{aA}	23,9 $\pm$ 1,9 ^{aB}	31,8 $\pm$ 3,0 ^{aA}	25,9 $\pm$ 2,7 ^{abAB}	81,1 $\pm$ 4,0 ^{aB}	103,4 $\pm$ 6,8 ^{aA}	93,9 $\pm$ 8,3 ^{aAB}
5min.	41,3 $\pm$ 3,4 ^{aA}	44,6 $\pm$ 3,9 ^{aA}	40,3 $\pm$ 3,2 ^{Aa}	28,7 $\pm$ 2,8 ^{Aa}	31,9 $\pm$ 2,9 ^{aA}	26,7 $\pm$ 2,3 ^{aA}	90,3 $\pm$ 5,9 ^{aA}	99,3 $\pm$ 7,6 ^{aA}	92,6 $\pm$ 6,6 ^{aA}
15min.	42,5 $\pm$ 4,0 ^{abA}	42,8 $\pm$ 3,1 ^{abA}	41,4 $\pm$ 2,9 ^{aA}	29,2 $\pm$ 3,3 ^{aA}	30,1 $\pm$ 2,6 ^{abA}	27,5 $\pm$ 2,3 ^{aA}	94,3 $\pm$ 7,0 ^{aA}	97,5 $\pm$ 5,5 ^{abA}	94,2 $\pm$ 5,5 ^{bA}
30min.	35,5 $\pm$ 3,5 ^{abcdA}	38,3 $\pm$ 3,3 ^{baA}	35,0 $\pm$ 1,8 ^{abA}	23,7 $\pm$ 2,5 ^{abA}	25,2 $\pm$ 2,4 ^{baA}	23,8 $\pm$ 1,3 ^{abA}	83,7 $\pm$ 6,3 ^{baA}	92,5 $\pm$ 6,5 ^{baA}	78,2 $\pm$ 4,7 ^{caA}
60min.	34,5 $\pm$ 3,7 ^{cdA}	29,8 $\pm$ 3,7 ^{caA}	28,4 $\pm$ 3,4 ^{baA}	30,1 $\pm$ 5,6 ^{aA}	17,9 $\pm$ 2,4 ^{caB}	16,8 $\pm$ 1,9 ^{caC}	74,5 $\pm$ 11,4 ^{aA}	78,5 $\pm$ 9,5 ^{aA}	78,5 $\pm$ 9,5 ^{aA}
90min.	30,6 $\pm$ 5,5 ^{daA}	29,1 $\pm$ 4,2 ^{caA}	30,4 $\pm$ 5,7 ^{abA}	20,8 $\pm$ 3,5 ^{aA}	16,6 $\pm$ 3,5 ^{caA}	17 $\pm$ 3,6 ^{bcA}	71,0 $\pm$ 15,0 ^{aA}	79,8 $\pm$ 11,6 ^{abA}	83,2 $\pm$ 14,5 ^{aA}
120min.	27,7 $\pm$ 6,3 ^{daA}	22,2 $\pm$ 4,9 ^{caA}	14,6 $\pm$ 6,7 ^{caA}	14,3 $\pm$ 2,9 ^{baA}	15,1 $\pm$ 3,7 ^{caA}	7,6 $\pm$ 3,5 ^{daA}	71,4 $\pm$ 18,6 ^{baA}	57,9 $\pm$ 12,9 ^{baA}	42,5 $\pm$ 19,3 ^{baA}

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas (P<0,05).

Tabela 6: Características (média ± E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	STR (%)			LIN (%)			ALH (µm)			BCF (Hz)		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	63,7±1,4 ^{aA}	66±1,1 ^{aA}	63,3±1,4 ^{aA}	30,3±1,2 ^{aAB}	31,2±1,0 ^{abA}	28,8±0,6 ^{aB}	6,5±0,3 ^{aA}	6,7±0,4 ^{aA}	6,6±0,1 ^{AaA}	36,1±0,9 ^{aA}	31,9±1,2 ^{cdB}	34,3±1,1 ^{bcAB}
5min.	65,3±1,3 ^{aA}	66±1,8 ^{aA}	62,9±1,5 ^{aA}	31,6±1,0 ^{aA}	31,7±0,8 ^{aA}	29,7±1,3 ^{aA}	6,7±0,2 ^{acA}	6,5±0,2 ^{aA}	6,5±0,2 ^{aA}	33,7±1,1 ^{aA}	33,6±0,9 ^{bdA}	34±0,8 ^{bcA}
15min.	65,2±1,8 ^{aAB}	65,7±2,0 ^{abA}	61,7±1,5 ^{aB}	32,1±1,2 ^{aA}	30,5±1,1 ^{abA}	29,1±1,2 ^{abA}	6,2±0,3 ^{abcA}	6,3±0,3 ^{aA}	6,1±0,3 ^{aA}	35,4±0,8 ^{aA}	36,1±0,8 ^{adA}	36±1,2 ^{acA}
30min.	64,2±1,8 ^{aA}	62,4±1,8 ^{acA}	65,3±1,7 ^{aA}	29,4±1,2 ^{abA}	28,4±1,5 ^{bdA}	33,1±2,1 ^{aA}	5,9±0,3 ^{abcA}	6,3±0,3 ^{aA}	6,6±0,4 ^{aA}	36,9±1,4 ^{aA}	37,2±1,6 ^{aA}	34,5±1,9 ^{abcA}
60min.	63,5±3,5 ^{aA}	54,9±5,8 ^{aA}	60,1±2,1 ^{aA}	36,8±4,1 ^{acA}	23,2±3,0 ^{bcB}	26,4±3,0 ^{acB}	9,1±2,8 ^{abcA}	5,6±0,6 ^{aA}	4,9±0,9 ^{aA}	35,5±4,8 ^{aA}	35,9±3,7 ^{abcA}	36,7±2,6 ^{abA}
90min.	58,7±9,5 ^{aA}	48,5±7,9 ^{aA}	44,3±7,7 ^{aA}	32,7±9,4 ^{aA}	21,2±4,1 ^{abcA}	18±3,9 ^{adA}	5,3±1,1 ^{abcA}	3,6±1,0 ^{aB}	4,3±1,2 ^{abA}	27±6,2 ^{aA}	33,7±5,2 ^{abcdA}	32,2±5,5 ^{bcA}
120min.	64,7±12,4 ^{aA}	55±9,5 ^{aA}	33,6±13,8 ^{aA}	29,7±9,4 ^{aA}	26,1±4,6 ^{adA}	16±6,9 ^{aA}	2,5±1,4 ^{cA}	3,2±1,0 ^{aB}	1,6±1,2 ^{bA}	37,9±3,9 ^{aA}	26,7±4,9 ^{dA}	19,4±8,7 ^{cA}

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas (P<0,05).

Tabela 7: Características (média ± E.P) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) avaliado pela análise computadorizada (CASA), diluído em Tris Gema/ *Aloe vera*, acrescido ou não de Equex® STM, submetido ao teste de termorresistência por 120 minutos, (n=12), (Equex = E).

	Rápido (%)			Médio (%)			Lento (%)			Estático (%)		
	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%	E 0%	E 0,5%	E 1,0%
0min.	11,7±2,6 ^{beA}	12,8±4,2 ^{bcA}	13,7±4,3 ^{bA}	14,1±2,6 ^{abA}	7,9±1,8 ^{aA}	10,1±2,2 ^{aA}	8±1,4 ^{aA}	4,5±1,1 ^{aA}	5,3±0,8 ^{bA}	66,2±6,2 ^{bcA}	5,1±6,2 ^{bA}	70,9±5,7 ^{dA}
5min.	17,5±3,3 ^{aA}	17,4±4,6 ^{acA}	19,3±4,5 ^{aA}	14,2±3,3 ^{aA}	9,5±2,2 ^{aA}	12,2±2,9 ^{aA}	5,7±0,9 ^{abA}	4,4±1,0 ^{aA}	5,5±1,3 ^{abA}	62,6±6,4 ^{beA}	68,6±6,3 ^{bA}	63,1±7,2 ^{dA}
15min.	16±3,9 ^{acA}	19,3±4,3 ^{aA}	14,7±5,3 ^{adA}	9,8±2,6 ^{aA}	10,9±2,1 ^{aA}	7,2±1,7 ^{abcA}	4,1±1,0 ^{bA}	4,5±1,1 ^{aA}	2,9±0,6 ^{acA}	69,6±6,3 ^{bdeA}	64,8±6,1 ^{bA}	75,2±6,2 ^{dA}
30min.	8,7±2,7 ^{adA}	12,7±5,1 ^{adA}	9,4±3,5 ^{acA}	7,7±2,3 ^{acA}	7,2±1,7 ^{aA}	10,8±5,0 ^{abA}	3,9±0,9 ^{bA}	3,6±0,7 ^{aA}	3,4±0,5 ^{abcA}	79,7±5,6 ^{bA}	76,6±6,6 ^{bA}	76,3±8,4 ^{dA}
60min.	7,5±3,0 ^{aA}	4,6±1,4 ^{bdA}	5,7±2,8 ^{aA}	4,8±1,3 ^{bcA}	7,5±3,1 ^{aA}	5,5±1,7 ^{bA}	2,6±0,5 ^{bcA}	5,3±2,4 ^{aA}	2,9±0,8 ^{cA}	84,8±4,4 ^{bcA}	82,7±6,6 ^{abdA}	86,1±4,2 ^{bcA}
90min.	3,9±1,5 ^{afA}	2±1,3 ^{abA}	2,8±2,2 ^{abcA}	2,9±0,8 ^{bcA}	1,5±0,5 ^{bA}	1,6±0,9 ^{bcA}	1,5±0,3 ^{adA}	0,9±0,3 ^{bAB}	0,6±0,4 ^{aB}	91,5±2,5 ^{aA}	95,3±1,8 ^{abcA}	94,7±3,5 ^{abA}
120min.	1,5±0,9 ^{abA}	0,8±0,4 ^{abcA}	2,6±2,6 ^{abA}	1±0,6 ^{bA}	1,6±0,4 ^{bA}	2,8±1,8 ^{abA}	0,5±0,3 ^{bcA}	1,3±0,8 ^{bcA}	1,6±1,1 ^{bcA}	97,2±1,4 ^{aA}	95,8±1,1 ^{aA}	93,4±5,4 ^{bA}

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam comparações entre linhas (P < 0,05); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferenças entre colunas (P<0,05).

De acordo com os resultados apresentados conclui-se que:

- A LDL pode ser usada como substituto da gema de ovo in natura como crioprotetor de sêmen de cateto (*Pecari tajacu*) sugerindo ainda a concentração de 20% para este propósito.
- O gel de *Aloe vera* (20%) pode ser usado de forma eficiente para a refrigeração a 5 °C, mantendo uma longevidade das células de cateto (*Pecari tajacu*) por até 48 horas, além dessa concentração do extrato também ser eficiente no processo de congelação. Ainda, a combinação de gema de ovo 10% com o gel de *Aloe vera* 10% aumentou a qualidade da célula espermática após a descongelação.
- Embora a adição do detergente Equex®STM ao diluente no sêmen de catetos (*Pecari tajacu*) não tenha interferido na qualidade da célula espermática da espécie após a descongelação, o mesmo não causou aumento na longevidade das células a qual se manteve por até 15 minutos.

A pesquisa realizada contribuiu de forma significativa para uma melhor otimização de protocolos de criopreservação de sêmen de catetos (*Pecari tajacu*) sendo o primeiro estudo a padronizar o uso da análise Computadorizada de sêmen (CASA) para a espécie, bem como a validação da avaliação da integridade de membrana espermática por sondas fluorescentes (PI/CFDA). Ainda, foi o primeiro a avaliar o efeito da Lipoproteína de baixa densidade purificada, do detergente a base de Duodecil Sulfato de Sódio (Equex®STM) e do gel de *Aloe vera* na criopreservação de sêmen de catetos.

Ainda, os conhecimentos adquiridos, podem não somente ser útil para a formação de bancos de germoplasma buscando a conservação e a implementação de centros de reprodução da espécie em estudo, como também ser aplicado na conservação de sêmen em outras espécies domésticas ou selvagens.

Diante dos estudos realizados, vislumbra-se a necessidade de um conhecimento mais aprofundado, sobre a membrana da célula espermática da espécie, a respeito da sua interação com as proteínas existentes no plasma seminal, e sua correlação com o processo de criopreservação, bem como o uso de crioprotetores e aditivos.

- I.** Resumo : Efeito da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) na congelação de sêmen de catetos (*Pecari Tajacu*)
- II.** Resumo : Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*)
- III.** Resumo : Aloe Vera use on short-term preservation of Collared Pecari (*Pecari tajacu*) semen
- IV.** Resumo : Innovative use of Aloe vera as a cryoprotectant for the Collared Peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing
- V.** Carta de submissão: Comparison of egg yolk and different purified low-density lipoprotein (LDL) concentrations for the collared peccary (*Pecari tajacu*) semen freezing
- VI.** Carta de submissão: Innovative use of *Aloe vera* for collared peccary (*Pecari tajacu*) semen conservation

EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE CATETOS (*Pecari tajacu*)

[Effect of low density lipoprotein (LDL) on collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing]

Ana Liza Paz Souza^{1*}, Gabriela Liberalino Lima¹, Gislayne Christianne Xavier Peixoto¹, Thibério Sousa Castelo¹, José Artur Brilhante Bezerra¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹ Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal – LCGA, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: aninhavet2@hotmail.com

ABSTRACT – This study aimed to evaluate the effect of low density lipoprotein – LDL on the freezing-thawing of collared peccary (*Pecari Tajacu*) semen. Ejaculates were collected from 11 adult males by electroejaculation. Samples were diluted in Tris plus glycerol 3%, supplemented to 20% egg yolk or LDL 20%, and finally cryopreserved. After thawing, we verify that LDL provided a better preservation of the sperm motility, vigor and membrane integrity than egg yolk ($P < 0.05$). We recommend that LDL can be efficiently used as a substitute for whole egg yolk on collared peccary semen freezing.

Keywords: *Pecari tajacu*; cryopreservation; egg yolk; low density lipoprotein.

Palavras-Chave: *Pecari tajacu*; criopreservação; gema de ovo; lipoproteína de baixa densidade.

INTRODUÇÃO

Os catetos (*Pecari tajacu*) estão entre as espécies mais caçadas, tanto devido aos hábitos alimentares das comunidades locais quanto pelo valor comercial de sua carne e pele no mercado internacional (Sowls 1997). Desta forma, a realização de trabalhos que busquem o aprimoramento de técnicas reprodutivas como a criopreservação de sêmen para futura formação de bancos de germoplasma seria de grande utilidade para a manutenção da espécie. Na busca de um protocolo ideal para a criopreservação de sêmen, pesquisadores tem utilizado a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em substituição da gema de ovo que, embora constitua um dos crioprotetores mais importantes na rotina de criopreservação em animais silvestres, a sua utilização tem demonstrado alguns pontos negativos como o fato de ser produto biológico, verificando-se assim a variação de sua composição, e a presença de grânulos que interferem com avaliações microscópicas (Pillet et al., 2011). Assim, purificando o produto responsável pelo efeito benéfico da gema de ovo, a LDL, poderiam ser obtidos bons resultados e evitar os danos causados pela gema. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição da LDL purificada como um substituto para a gema de ovo, na congelação de sêmen de catetos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados onze catetos machos, criados no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA. Os animais foram contidos com um puçá, e em seguida, quimicamente (Propofol - 5mg/kg/IV- Souza et al., 2009). Após coleta de sêmen realizada por eletroejaculação, procedeu-se avaliação de volume, coloração, motilidade espermática (0-100%), vigor (0-5), concentração espermática, funcionalidade da membrana espermática (teste hiposmótico), e avaliação de integridade de membrana pela associação de fluoróforos (Iodeto de propídeo - IP e Diacetato de carboxifluoresceína -CFDA). Em seguida, o sêmen foi dividido em duas alíquotas que foram diluídas em Tris-frutose adicionado de gema de ovo (20%) ou LDL (20%) a temperatura ambiente (27 °C), ambos acrescidos de glicerol a 3%, atingindo uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. A criopreservação foi realizada segundo o método descrito para sêmen de catetos (Castelo et al., 2010). Após uma semana, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C/1min, e avaliadas de modo similar ao sêmen fresco. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. As comparações entre os tratamentos (Gema 20% e LDL 20%) foram realizadas pela ANOVA seguida do teste t de Student, exceto para o vigor espermático que foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ejaculados apresentaram coloração branca, volume de 1.9 ± 0.2 mL contendo $649 \pm 390 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Foram verificados $94,1 \pm 3\%$ de espermatozoides móveis com vigor $4,7 \pm 0,2$, e $78,1 \pm 2,8\%$ de células com membrana funcional, bem como $73,4 \pm 6\%$ com membrana íntegra determinada por fluorescência. Os resultados do sêmen descongelado estão expressos na tabela 1.

Salienta-se que o uso da LDL como crioprotetor, comparado a gema, permitiu uma melhor avaliação de motilidade e vigor, dada a diminuição da formação de grumos. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os descritos por Hu et al. (2008) que demonstraram que a LDL proporciona melhor preservação de motilidade espermática e integridade acrossoma e de membrana plasmática em espermatozoides suínos, quando comparada a gema de ovo.

Tabela 1. Características (média $\pm$ EP) do sêmen descongelado de catetos (*Pecari tajacu*) submetidos a congelamento em diluente Tris acrescido de gema de ovo ou lipoproteína de baixa densidade purificada a 20% (n=11)

	Gema 20%	LDL 20%
Motilidade (%)	21.8 ± 6.9^b	36.4 ± 5.3^a
Vigor (0-5)	1.4 ± 0.3^b	2.3 ± 0.3^a
Integridade Funcional (%)	34.1 ± 7.0	42.4 ± 6.5
Fluorescência (%)	8.4 ± 3.0^b	27.4 ± 6.5^a

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se a diferenças na mesma linha, $p < 0,05$.

CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos, conclui-se que a LDL (20%) pode ser usada para substituir a gema de ovo integral promovendo, além da remoção dos grumos, melhores resultados de motilidade e vigor, bem como conferindo uma diminuição dos efeitos do choque térmico sobre a célula espermática de catetos coletados por eletroejaculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castelo, T.S.; Bezerra, F.S.B.; Souza, A.L.P.; Moreira, M.A.P.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders, *Theriogenology*, 74, 1060–1065, 2010.

Hu, J.H.; Li, Q.W.; Jiang, Z.L.; Li, W.Y. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology*, 57, 257–262, 2008.

Pillet, E.; Duchamp, G.; Batellier, F.; Beaumal, V.; Anton, M.; Desherces, S.; Schmitt, E.; Magistrini, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, v.75 p.105–114, 2011.

Souza, A.L.P.; Castelo, T.S.; Queiroz, J.P.A.F.; Barros, I.O.; Paula, V.V.; Oliveira, M.F.; Silva, A.R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation, *Anim. Reprod.*, Sci. 116, 370–375, 2009.

Sowls, L. K. *Javelinas and other peccaries: Their biology, management, and use* 2nd ed. Tucson, Arizona: University of Arizona Press, 1997.



Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos (*Tayassu tajacu*)

Use of fluorescent probes for the assessment of plasma membrane integrity of collared peccaries (Peccaries tajacu) sperm

A.L.P. Souza, G.L. Lima, G.C.X. Peixoto, T.S. Castelo, J.A.B. Bezerra, A.R. Silva

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA Mossoró, RN, Brasil.
E-mail: aninhavet2@hotmail.com

Introdução

O emprego de sondas fluorescentes, como a associação do fluoróforo Iodeto de Propídio (IP) ao Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), busca avaliar a integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática. Atualmente, o uso destes fluoróforos garante resultados mais seguros e eficazes quando comparados ao teste de viabilidade utilizando colorações vitais (Yaniz et al., 2012). Assim, o presente estudo teve como objetivo validar a técnica de avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de catetos pela associação de sondas fluorescentes (IP e CFDA) e estabelecer sua relação com o teste de viabilidade utilizando o corante Azul de Bromofenol.

Material e Métodos

Foram utilizados oito catetos machos adultos, mantidos em cativeiro no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA. Os animais foram contidos quimicamente com propofol (5mg/kg) e, posteriormente, submetidos à coleta de sêmen por eletroejaculação. Os ejaculados foram imediatamente avaliados quanto a motilidade, vigor e concentração. A determinação da integridade da membrana das células espermáticas foi realizada por microscopia de fluorescência, utilizando-se os fluoróforos CFDA e IP. A análise da viabilidade espermática foi realizada através da confecção de um esfregaço corado com azul de Bromofenol (AB), servindo para confirmar os dados obtidos por meio do uso dos fluoróforos. Os resultados foram expressos na forma de média e erro padrão. A relação entre a integridade de membrana e viabilidade espermática foi verificada por regressão simples pelo programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA) com $P < 0,05$.

Resultados

O ejaculado apresentou motilidade média de $92 \pm 4,0$ %; vigor $4 \pm 0,2$; concentração de $765 \pm 539 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Foram verificados $67,8 \pm 7,3$ % mostrando fluorescência em verde, decorrente da ação da CFDA, denotando a presença de membrana íntegra, em contraste com aqueles reativos ao IP, os quais se apresentavam em vermelho. Ainda, foram identificados $78,8 \pm 3,6$ % de espermatozoides viáveis, os quais não se apresentavam corados pelo AB, um corante vital que é conhecido por penetrar apenas em membranas não intactas (Derivaux, 1980). Verificou-se uma relação significativa ($p = 0,005$) e positiva ($r = 0,75$) entre os dois métodos. Estes resultados demonstram que a avaliação da integridade da membrana das células espermáticas de cateto pode ser realizada de forma confiável através da associação das sondas fluorescentes IP e CFDA.

Referências

Derivaux J. Reprodução dos animais domésticos. Acribia, 1980.
Yaniz JL, Mateos JA, Santolaria P. 2012. TRIS buffer improves fluorescence yield of ram spermatozoa when evaluating membrane integrity. Microsc Res Tech 75, 520–523.

Palavras-chave: cateto, integridade de membrana, viabilidade espermática.

Keywords: collared peccary, membrane integrity, sperm viability.



Innovative use of *Aloe vera* as a cryoprotectant for the collared peccaries (*Pecari tajacu*) semen freezing

A.L.P. Souza, G.L. Lima, G.C.X. Peixoto, J.A.B. Bezerra, A.M. Silva, M.F. Oliveira, A.R. Silva

Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

The collared peccary (*Pecari tajacu*) is one of the most hunted species in Latin America due to the appreciation of its meat by local populations and the value of its leather in the international market. Once these animals have demonstrated a great potential for captive breeding, the enhancement of reproductive biotechnologies would help the species conservation and the improvement of reproductive management in commercial explorations. In order to improve semen freezing protocols, the search for alternative cryoprotectants has been proposed and the use of *Aloe vera* (AV) is highlighted since it presents a similar action as the conventional cryoprotectants, but also presents the advantage of avoiding the possibility for disease dissemination when using animal substances such as egg yolk. The aim of the study was to evaluate the effect of *Aloe vera* in substitution or association to egg yolk on the cryopreservation of collared peccary semen. Ejaculates from eight sexually mature male collared peccaries were used. These animals belonged to the Centre of Multiplication of Wild Animals from UFERSA. Initially, they were physically restrained using a hand net and then anesthetized using intravenous administration of propofol (Propovan®, Cristalia, Fortaleza, Brazil), given as a bolus (5 mg/kg). Semen collection was performed using an electroejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil) connected to a 12 V source. After collection, semen was evaluated and extended, at room temperature (27 °C), in Tris-fructose and then divided into three treatments: isolated Aloe Vera at 20%, isolated egg yolk at 20%, or associated *Aloe vera* plus egg yolk both at 10%. All the groups were added of 3% glycerol, packed in plastic 0.5 mL straws, and frozen in liquid nitrogen. After two weeks, thawing was performed at 37°C/1 min in a water bath. The total sperm motility was assessed by a Computer Assisted Semen Analysis – CASA (IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, MA, USA). The sperm membrane integrity was evaluated using diacetate 6-carboxy-fluorescein (C-FDA) and propidium iodide (PI) association analyzed under fluorescence microscopy. Comparisons among different treatments on the semen parameters were evaluated by ANOVA, followed by the Student's t-test ($P < 0.05$). As the main results, the association of *Aloe vera* plus egg yolk provided the most efficient preservation of sperm motility ($54\% \pm 6.2\%$) and membrane integrity ($44 \pm 6.0\%$) after thawing ($P < 0.05$). As follows, the isolated use of *Aloe Vera* 20% ($30.6 \pm 4.2\%$ and $27.8\% \pm 70\%$, respectively) was more efficient ($P < 0.05$) than the isolated use of egg yolk 20% ($8.2 \pm 2.3\%$ and $28.6 \pm 4.5\%$, respectively). Interestingly, the best results were achieved in the use of *Aloe vera* that is known for containing a lot of substances such as glucose and xylose, tannin, steroids, organic acids, antibiotics, various enzymes, a protein with 18 amino acids, vitamins, minerals, and others. Its exact mechanism on cell cryoprotection, however, is not fully elucidated. Beyond nutritive action, some of those substances present antioxidant properties that can directly contribute to sperm viability. In addition, on the contrary to egg yolk, we emphasize that *Aloe vera* does not contribute to debris formation on the semen samples, which facilitates the analysis on CASA. In conclusion, we suggest the use of the *Aloe Vera* and egg yolk association as an effective cryoprotectant solution for collared peccary semen cryopreservation.

Financial support: CAPES

E-mail: aninhavet2@hotmail.com



Aloe Vera use on short-term preservation of Collared Pecari (*Pecari tajacu*) semen

A.E.A. Lago¹, H.H.L. Nascimento¹, A.L.P. Souza¹, J.A.B. Bezerra¹, A.M. Silva¹, T.S. Castelo¹, A.R. Silva¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation –LCGA, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

Due to ecological and socio-economic importance, the captive breeding of collared peccaries (*Pecari tajacu*) has been stimulated in order to produce meat and pelts for the international market. Therefore, the improvement of assisted reproductive techniques, such as semen cryopreservation, is needed to help this species' conservation and multiplication. In spite of semen collection, evaluation and freezing being recently demonstrated for this species, studies on short-term liquid preservation remain scarce. Since egg-yolk and *Aloe vera* have been shown as effective cryoprotectants for semen preservation in domestic species, we aimed to evaluate the short-term preservation at 5 °C of collared peccaries' semen using these two substances added to Tris extender media. The ejaculates from 5 collared peccaries, bred under captivity at the Centre of Multiplication of Wild Animals (CEMAS – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil), were collected by electroejaculation. Semen was evaluated for sperm motility (%) and vigor (0 – 5). Samples were divided in two aliquots that were diluted in Tris plus *Aloe vera* (20%) or Tris plus egg-yolk (20%), reaching a final concentration of 100×10^6 sperm/mL. Samples were balanced for 40 minutes on Styrofoam boxes containing biological ice in order to reach 5 °C, and then transferred to a biological oxygen demand incubator also at 5° C. Samples were re-evaluated immediately after initial dilution (0h) and every 12 h up to 36 h. Results were expressed as means $\pm$ SD. The efficiency of the cryoprotectants on the preservation of sperm motility and vigor was compared by Student's t test and non-parametric Mann Whitney's test, respectively ($P < 0.05$). After collection, samples diluted in both treatments presented $92 \pm 1.2\%$ motile sperm with vigor 4.6 ± 0.2 . A significant decrease on sperm motility was noted after 12 h of incubation both for *Aloe vera* and egg yolk, in which values of $53 \pm 9.4\%$ and $67 \pm 7.7\%$ were found, respectively ($P < 0.05$). After 24 h incubation, no significant decline was verified for sperm motility, and values of $35 \pm 13.4\%$ and $37 \pm 12.2\%$ were found for *Aloe vera* and egg yolk, respectively. At 36 h incubation, a significant reduction on sperm motility was found for *Aloe vera* that presented values of $22.5 \pm 8.5\%$ ($P < 0.05$). Otherwise, egg yolk efficiently preserves the sperm motility, providing values of $42.5 \pm 6.3\%$ at 36 h ($P < 0.05$). Regarding vigor, there was no statistical difference ($P < 0.05$) in the egg-yolk treatment throughout the experiment, and a value of 2 ± 0 was reached at 36 h. On the other hand, a significant decline was found for the *Aloe vera* group at 12 h ($P < 0.05$), but vigor remained constant after that, reaching values of 1 ± 0.4 at 36h. By comparing both treatments, we verify that there were no differences regarding sperm motility or vigor preservation throughout the incubation time ($P < 0.05$). Although these preliminary results do not show statistical difference between groups, it is noted that egg yolk provides a more efficient preservation of sperm quality in collared peccaries up to 36 h. The use of *Aloe vera*, however, can be indicated for up to 24 h, since this cryoprotectant provided acceptable values of sperm motility higher than 30% at that time. In conclusion, we verify that *Aloe vera* can be used as an alternative cryoprotectant for short-term liquid preservation of collared peccary semen for up to 24 h. However, further studies should be conducted in order to better evaluate its cryoactivity.

E-mail: arthur_lago@hotmail.com

19/01/2015

legio2000 - Yahoo Mail

[Início](#)
[Mail](#)
[Notícias](#)
[Esportes](#)
[Finanças](#)
[Tempo](#)
[Jogos](#)
[Grupos](#)
[Respostas](#)
[Screen](#)
[Flickr](#)
[Celular](#)
[Mais](#)

[Buscar no Yahoo Mail](#)
[Buscar na Web](#)

[Início](#)

[Alexandre](#)

[Escrever](#)

[Entrada](#)
[Rascunhos](#)
[Enviadas](#)
[Spam \(1\)](#)
[Lixeira \(1\)](#)
[Pastas](#)
[Visualizações inteligentes](#)
[Recente](#)

[Patrocinado](#)


A NET ganhou prêmios
 NET HD com NOW
 por R\$ 59,90/mês
 Assine 3003 3448

[Apagar](#)
[Mover](#)
[Spam](#)
[Mais](#)

[Ciência Rural - Manuscript ID CR-2014-1687](#)
[Pessoas](#)

[cienciarural@gmail.com](#)
20 Nov 2014

Para: eu

CC: aninhavet2@hotmail.com, gabylberafino@yahoo.com.br,
 gypetoto@hotmail.com, thiberio_castelo@hotmail.com,
 glauciacarlos@hotmail.com, e 2 mais...

20-Nov-2014

Dear Dr. Silva:

Your manuscript entitled "Improving the quality of frozen-thawed collared peccary (Pecari tajacu) semen by replacing egg yolk for purified low-density lipoprotein (LDL)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Ciência Rural.

Your manuscript ID is CR-2014-1687.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Ciência Rural.

Sincerely,
 Ciência Rural Editorial Office

[Responder](#), [Responder a todos](#) ou [Encaminhar](#) | [Mais](#)

[Clique para responder para todos](#)

Enviar



<https://br-mg6.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand-epdms521421ug#718784335>

1/1

19/01/2015

legio2000 - Yahoo Mail

Início
 Mail
 Notícias
 Esportes
 Finanças
 Tempo
 Jogos
 Grupos
 Respostas
 Screen
 Flickr
 Celular
 Mais



Início



Alexandre



Escrever

Entrada

Rascunhos

Enviadas

Spam (1)

Lixeira (1)

Pastas

Visualizações Inteligentes

Recente

Patrocinado



A NET ganhou prêmios
 NET HD com NOW
 por R\$ 59,90/mês
 Assine 3003 3448

Apagar
 Mover
 Spam
 Mais
 Coletar

Thank you for your submission to Theriogenology
 Pessoas

Theriogenology
 Jan 14 em 8:54 AM

Para: eu

Dear Prof. Silva,

Thank you for sending your manuscript Innovative use of Aloe Vera for collared peccary (Pecari tajacu) semen conservation for consideration to Theriogenology. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Theriogenology to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can be viewed here: <http://journals.insights.elsevier.com/journals/0093-621X/review-speed>

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".

2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Theriogenology, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at

<http://ees.elsevier.com/THERIO/>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: legio2000@yahoo.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/THERIO/automatic_login.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Theriogenology.

Kind regards,

Dr. Fúlvio Gandolfi

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

Responder, Responder a todos ou Encaminhar | Mais

eu
 Jan 14 em 8:56 AM

Para: Ana Liza

Obrigado por nos ajudar a melhorar a sua experiência no Yahoo

<https://br-mg6.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=epdms521421ug#9135325854>

1/1

