

INFLUÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS NO DILUENTE PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

MATEUS JUNIOR FLACH¹; ÂNDERSON AMAURI DA COSTA GUARISE²;
ELISANGÉLA MIRAPALHETA MADEIRA²; IVAN BIANCHI²;
ARNALDO DINIZ VIEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas, Curso de Zootecnia, ReProPEL - Núcleo de ensino e pesquisa em reprodução animal – flachmateus@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, ReProPEL - Núcleo de ensino e pesquisa em reprodução animal

³Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, ReProPEL - Núcleo de ensino e pesquisa em reprodução animal – vieira_ad@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é a primeira das biotécnicas de reprodução assistida e consiste na coleta do sêmen de um macho doador, seguido da deposição dos espermatozoides (SPTZ) diretamente no trato reprodutivo feminino. Com essa biotécnica foi possível aumentar significativamente a capacidade de produzir descendentes de machos selecionados como genética ou zootécnicamente superiores e também reduzir os índices de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. O controle da contaminação é possível através de adequado manejo sanitário dos doadores e adoção de boas práticas de manipulação do material coletado. Entretanto, a obtenção de ejaculados totalmente isentos de contaminação é impossível devido à existência de uma flora bacteriana normal (AURICH & SPERGSER, 2007; YANIZ, 2010). Tais bactérias podem ou não determinar doenças de acordo com sua concentração, mas sem dúvida influenciam a capacidade de sobrevivência e viabilidade dos SPTZ que serão utilizados na IA.

Em bovinos, vários testes foram realizados para determinar quais eram os antibióticos mais adequados para controlar o desenvolvimento bacteriano no sêmen para uso na IA (LORTON, 1988). Entretanto, trabalhos similares não foram realizados para identificação dos antibióticos que não influenciassem negativamente a viabilidade dos SPTZ na espécie ovina. Desta forma, este trabalho objetivou determinar qual o antibiótico ou suas associações que podem ser utilizados com segurança na constituição dos diluentes do sêmen ovino para utilização na IA.

2. METODOLOGIA

Animais: Cinco machos ovinos da raça Crioula Lanada alojados nas instalações do Biotério Central da UFPEl foram utilizados como doadores de sêmen.

Coleta e processamento do sêmen: Totalizando 60 coletas, semanalmente os animais foram coletados pelo método da vagina artificial e o sêmen diluído 1:1 (v/v) em meio Tris-gema (EVANS & MAXWELL, 1987), sem antibióticos para manutenção durante o transporte até o laboratório. No laboratório foram determinadas as taxas de motilidade (0-100%), vigor (0-5) e concentração espermática (SPTZ x 10⁹/ml) em cada ejaculado. Somente as amostras apresentando motilidade ≥ 80%, vigor ≥ 3 e concentração ≥ 2 x 10⁹ SPTZ/ml (determinado em câmara de Neubauer) foram utilizados. Cada amostra foi

submetida a diluição final em meio de congelamento (Tris-gema-glicerol, EVANS & MAXWELL, 1987) de modo a permitir a obtenção de uma concentração de 5% de glicerol e 200×10^6 SPTZ/ml. Em seguida, as amostras foram associadas constituindo um *pool* com contribuição equivalente de cada macho para formação de cinco grupos homogêneos para uso nos tratamentos:

- Controle: sem inclusão de antibiótico;
- GTLS: 500 µg/ml de gentamicina; 100 µg/ml de tilosina; 300 µg/ml de lincomicina e 600 µg/ml de espectinomicina;
- PENSTREP: 500 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina;
- CEFT: 50 µg/ml de ceftiofur sódico;
- ENRO: 1000 µg/ml de enrofloxacin.

Após a constituição dos tratamentos, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25ml previamente identificadas. Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em equipamento de refrigeração para estabilização térmica a 5°C por 120min. Em seguida, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio a uma distância de cinco centímetros do nível do líquido para congelamento a -80°C em um período de 10min. Ao final desse período as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido para preservação a -196°C. As amostras foram armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso.

Avaliações da viabilidade espermática:

A viabilidade dos SPTZ em cada tratamento foi determinada com base nos parâmetros de motilidade, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática, de acrossoma e de DNA. As avaliações foram realizadas antes do congelamento, imediatamente ao final do período de estabilização a 5°C e após o descongelamento (10 e 30min).

Para a análise de motilidade e morfologia espermática foi utilizada uma alíquota de 10 µl de sêmen sobre uma lâmina coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37°C e a leitura foi feita em microscópio óptico em aumento de 200x, sendo estimado o percentual de células móveis (CBRA, 1998). A morfologia espermática foi avaliada após o descongelamento do sêmen, através de microscópio óptico de contraste de fase em aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células, que foram classificadas conforme descrito por HANCOCK & HOVELL (1959).

A avaliação da integridade de membrana era realizada conforme protocolo descrito por HARRISON E VICKERS (1990), com uso de sonda específica contendo iodeto de propídeo (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), em dois momentos: após a adição dos tratamentos e estabilização a 5°C e após o descongelamento. A avaliação da integridade da membrana é considerada indicativa da viabilidade da célula espermática. A avaliação foi feita com o auxílio do microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, America INC, Sapporo, Japão) em aumento de 400x, em filtro WU em sala escura. Foram avaliados 100 SPTZ de cada amostra. Os que apresentavam fluorescência verde foram considerados como possuindo membrana plasmática íntegra, enquanto que os que apresentavam fluorescência vermelha, ou ambas as cores, foram considerados lesados, devido a entrada do IP através da membrana.

Para a avaliação de integridade do acrossoma foram usadas as sondas fluorescentes, IP e o conjugado de lecitinas de *Arachis hypogaea* (FITC-PNA), sendo a diluição de cada uma das sondas para elaboração da solução estoque, foi realizada conforme o protocolo descrito por KAWAMOTO et al. (1999), com adaptações. Foram avaliados 100 SPTZ por lâmina, também em microscópio de epifluorescência. Os SPTZ que apresentavam fluorescência verde na região do acrossoma foram considerados íntegros, enquanto que, nos que apresentavam

coloração vermelha em toda a região da cabeça e a coloração verde não era aparente, o acrossoma foi considerado lesado.

A integridade do DNA espermático foi avaliada com o uso da sonda Acridine Orange diluída para preparo da solução de trabalho, conforme descrito por LEWIS & AITKEN (2005). As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000x, no mesmo microscópio de epifluorescência. Realizada a contagem de 100 SPTZ por lâmina, foram considerados com DNA normal aqueles que apresentavam fluorescência verde e quando todo o SPTZ estivesse corado de vermelho ou amarelo foi considerado o DNA desnaturado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de motilidade do sêmen refrigerado a 5°C e após o descongelamento estão na Tabela 1. Onde se observa que o tratamento ENRO apresentou a menor motilidade após o período de refrigeração ($P < 0,05$) e mantendo a motilidade mais baixa em relação ao controle mesmo após o descongelamento. Ainda, após o descongelamento, a motilidade das amostras submetidas a este tratamento não diferiu dos tratamentos que continham CEFT e GTLS ($P > 0,05$) e estes não diferiram do controle. Para o controle, a motilidade, tanto durante a refrigeração, quanto após o descongelamento, foi semelhante à observada para os tratamentos que apresentaram a motilidade mais alta ($P > 0,05$).

Tabela 1: Motilidade espermática do sêmen refrigerado a 5°C e 10 e 30 min após o descongelamento, de acordo com os tratamentos com ou sem antimicrobianos ($n = 12$).

Tratamentos*	Motilidade (%)		
	Refrigerado a 5 °C	Descongelado (10 min)	Descongelado (30 min)
Controle	75,0 ± 2,9 ^a	42,5 ± 1,5 ^a	41,5 ± 1,6 ^a
GTLS	71,0 ± 2,9 ^a	32,5 ± 1,5 ^{ab}	26,9 ± 1,6 ^{ab}
PENSTREP	72,0 ± 2,9 ^a	40,0 ± 1,5 ^a	37,1 ± 1,6 ^a
CEFT	73,0 ± 2,9 ^a	35,8 ± 1,5 ^{ab}	31,7 ± 1,6 ^{ab}
ENRO	65,0 ± 2,9 ^b	25,8 ± 1,5 ^b	15,4 ± 1,6 ^b

^{a, b} Média ± erro padrão da média (EPM) na coluna com expoentes diferentes ($P < 0,05$)

*Controle: sem antibiótico; GTLS: 500 µg/ml de gentamicina; 100 µg/ml de tilosina; 300 µg/ml de lincomicina e 600 µg/ml de espectinomicina; PENSTREP: 500 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomina; CEFT: 50 µg/ml de ceftiofur sódico; ENRO: 1000 µg/ml de enrofloxacina.

Após o descongelamento, o percentual de SPTZ com DNA íntegro foi maior ($P < 0,05$) no tratamento PENSTREP (92,1 ± 1,0) do que no GTLS (84,2 ± 1,0) que foi o pior, porém o controle não diferiu de nenhum destes dois tratamentos podendo esta diferença ter sido causada pelo processo de criopreservação e não pela adição dos tratamentos. Pois não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quanto a integridade de membrana e de acrossoma, a 5°C e após o descongelamento, e quanto a integridade de DNA a 5°C (Tabela 2), apenas no descongelamento que observou-se este desvio.

O percentual de SPTZ com morfologia normal após o descongelamento não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$), sendo de: 78,4 ± 1,0; 78,6 ± 1,0; 79,1 ± 1,0; 82,1 ± 1,0 e 84,3 ± 1,0, para os tratamentos controle, GTLS, PENSTREP, CEFT e ENRO, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

Os antibióticos/associações de gentamicina+tilosina+lincomicina+espectinomomicina, penicilina+estreptomicina ou ceftiofur não são prejudiciais aos espermatozoides ovinos. Entretanto, a enrofloxacin afeta a viabilidade espermática e não deve ser utilizada em diluentes para congelamento de sêmen ovino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, C.; SPERGSEER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.912-918, 2007.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49, 1998.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1987. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd, p.194, 1987.

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

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p.497-501, 1999.

LEWIS, S.E.M.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v.322, p.33-41, 2005.

LORTON, S.P.; SULLIVAN, L J.J.; BEAN, L B.; KAPROTH,M.; KELLGREN, H.; MARSHALL, C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Evaluation of seminal quality. **Theriogenology**, v.29, n. 3, p.593-607, 1988.

YANIZ, L.J.; AGUADO, M.A.M.; MATEOS, A.J.; SANTOLARIA, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**. v.122, p.142-149, 2010.