

O ANTIBIÓTICO UTILIZADO NO DILUENTE PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO PODE AFETAR A QUALIDADE ESPERMÁTICA?

MADEIRA, Elisângela Mirapalheta¹; GOULARTE, Karina Lemos¹; GASTAL, Gustavo A. D¹; FERNANDES, Claudia P. H²; BIANCHI, Ivan¹.

¹Grupo de pesquisa ReproPel – PigPel – Faculdade de Veterinária – UFPel

² Professora Adjunta – Faculdade de Veterinária – UFPel

Campus Universitário s/n – caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS

E-mail: elisangelamadeira@yahoo.com.br

Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel/>

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen ovino permite a criação de bancos de material genético para preservação de raças e linhagens biológica ou economicamente importantes. Essa tecnologia permite a difusão dos genes de machos selecionados, mas também pode veicular determinados agentes patogênicos. Por ser um fluido biológico, uma pequena carga de bactérias que fisiologicamente colonizam o trato reprodutivo é tolerável. Entretanto, é preciso considerar a necessidade de limitar ou até combater o desenvolvimento bacteriano nos meios utilizados para preservação do sêmen. Essa estratégia é importante para evitar problemas sanitários além de que algumas bactérias podem afetar negativamente a qualidade dos espermatozoides congelados. Para minimizar estes problemas, além do controle sanitário dos doadores de sêmen e higiene na coleta, usualmente são adicionados antibióticos aos meios de congelamento. Em bovinos, diferentes estudos foram realizados para determinar a eficiência de antibióticos no controle bacteriano e do efeito dos antibióticos sobre os espermatozoides (SONE & BAMBÁ, 1982). Entretanto, trabalhos similares não foram desenvolvidos na espécie ovina, para qual foram adotados os mesmos produtos e concentrações padronizados para bovinos. Como existem diferenças de flora bacteriana entre as espécies e as bactérias são capazes de adquirir resistência a determinados antibióticos, é necessário definir qual o tipo de antibiótico que deve ser usado na criopreservação de sêmen ovino. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é determinar a prevalência dos tipos de bactérias encontrados no trato reprodutivo de machos ovinos e avaliar diferentes antibióticos no seu controle, considerando os potenciais impactos desses antibióticos sobre a viabilidade espermática.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A partir de cinco machos ovinos da raça crioula lanada alojados nas dependências do Biotério Central da UFPel, foram realizadas duas coletas de sêmen por semana mediante o uso de vagina artificial. Durante um período de seis semanas, no momento da coleta dos ejaculados foram obtidas amostras para determinação dos tipos bacterianos prevalentes mediante cultivo por 48 horas em

ágar com 5% de sangue de ovino. O sêmen obtido foi inicialmente diluído na proporção 1:1 com diluente (tris-gema) para transporte ao laboratório.

No laboratório foram realizadas as avaliações de motilidade, vigor e concentração espermática. As amostras consideradas viáveis tiveram sua concentração ajustada para que cada macho contribuísse igualmente para constituição de um *pool* de sêmen para o congelamento. Depois de constituído o *pool*, procedeu-se seu fracionamento entre os diferentes tratamentos: controle sem antibiótico (T1); associação de gentamicina, tilosina, espectinomicina e lincomicina (T2); associação de penicilina e estreptomicina (T3); ceftiofur sódico (T4) e enrofloxacina (T5). A concentração final para congelamento (50×10^6 espermatozoides/palheta) foi ajustada pela adição de diluente acrescido de crioprotetor (glicerol).

Para o congelamento, todas as palhetas inicialmente foram resfriadas a 5°C por duas horas antes de serem congeladas a -80°C em vapor de nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico a -196°C.

Para realização das avaliações pós-descongelamento, duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Foram determinadas a motilidade e vigor espermático e coletadas amostras para determinação da integridade de membrana, acrossoma e DNA segundo Harrison *et al.* (1990), KAWMOTO *et al.* (1999) e NUR *et al.* (2010), respectivamente. Adicionalmente, amostras do sêmen de cada palheta foram incubadas por 48 horas em ágar com 5% de sangue ovino desfibrinado para determinação do número de bactérias que sobreviveram à criopreservação com ou sem antibióticos.

Os parâmetros de motilidade e vigor foram determinados em microscópio de campo claro (Nikon E200) e as características morfológicas de integridade de membrana, acrossoma e DNA em microscópio de epifluorescência (Olimpus BX 51). Os tipos de bactérias foram determinados por características morfofuncionais e de coloração das colônias e os gêneros bacterianos foram determinados mediante provas bioquímicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados encontrados mostraram que no T5 (enrofloxacina), a motilidade espermática foi inferior ($P < 0,05$) (17,1%), quando comparada ao T1 (controle, sem antibiótico) (40,9%) e ao T3 (penicilina e estreptomicina) (37,5%). Em relação aos demais tratamentos não foram verificadas diferenças estatística. A integridade de membrana espermática não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos como podem ser vistos os dados na tabela 1, sendo que o T1, T2, T3, T4 e T5 apresentaram 20,1%, 18,5%, 19,1%, 20,1% e 13,3%, respectivamente, de células com membrana íntegra.

Da mesma forma, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos em relação à integridade acrossomal (T1 = 83,2%, T2 = 82,0%, T3 = 85,3%, T4 = 82,0% e T5 = 80,0%). Resultado muito semelhante encontrado por (AKHTER *et al.*, 2008) para amostras de sêmen de Búfalos (*Bubalus bubalis*). Pois um percentual de acrossoma normal é essencial para a reação de fertilização (THOMAS *et al.*, 1997), a presença de microorganismos principalmente bactérias podem afetar diretamente o espermatozoide quanto as

suas funções durante o processo de fertilização (MORRELL 2006) através da indução da reação acrossomal antes do momento desejado.

Nas análises de integridade de DNA espermático foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) para o T2 (84,1%) comparado com T3 (92,0%), associação de penicilina e estreptomicina (T3). É importante ressaltar que a associação contida no T2 é recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e, apesar de conter antibióticos de largo espectro, como a gentamicina (ALTHOUSE *et al.*, 2000), pode estar ocasionando lesões de DNA espermático.

A necessidade de adicionar substâncias antimicrobianas ao meio diluidor é evidente (TONIOLLI *et al.*, 2001), pois é impossível a obtenção de um ejaculado livre de contaminação (WALTZ *et al.*, 1968). No entanto, REIS *et al.*, 1999 afirmaram ser desnecessária a adição de antibióticos na dose inseminante quando a coleta e o processamento do sêmen forem feitos em condições higiênicas apropriadas, levando-se também em consideração o período de estocagem do sêmen. Entretanto, sabe-se que a eliminação total da possibilidade de contaminação da dose de sêmen é um trabalho de difícil aplicação rotineiramente, onde diversos são os fatores que favorecem a contaminação. Estas constatações só reafirmam a necessidade de definir tipos e concentrações antibióticas ideais para a dose de sêmen.

As bactérias que foram isoladas e identificadas nas amostras de sêmen descongelado foram às mesmas encontradas no sêmen fresco: *Klebsciella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Bacillus spp.* Esses resultados são semelhantes aos descritos por SOUZA *et al.*, (2006) em sêmen de caprinos. No T1 (controle) houve crescimento em todas as partidas descongeladas. Já os demais tratamentos tiveram variação de acordo com a coleta. Sendo o T2 e o T5 responsáveis pelos melhores resultados, pois não houve crescimento em 11 das 12 partidas descongeladas.

Tabela 1. Dados das análises realizadas no descongelamento.

Parâmetros	Tratamentos				
	T1 Controle	T2	T3	T4	T5
Motilidade % móveis	40,8 ^a	25,4 ^{ab}	37,5 ^a	31,5 ^{ab}	17,1 ^b
Integ. Mem. % íntegros	20,1	18,5	19,1	20,1	13,3
Integ. Acros. % íntegros	83,2	82	83,3	81,8	79,9
Integ. DNA % íntegros	88,9 ^{ab}	84,2 ^b	92,1 ^a	90,9 ^{ab}	90,0 ^{ab}

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados o (T2) seria até o presente momento o tratamento de eleição por não afetar a viabilidade espermática e conter a multiplicação bacteriana.

5 REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G. C., KUSTER, C. E., CLARK, S. G., WEISIGER, R. M. Field Investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, v.53, p.1167-1176, 2000.

AKHTER, S; ANSARI, M. S; ANDRABI, S. M. H; ULLAH, N; QAYYUM, M. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 43, p. 272-278, 2008.

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

MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction Domestic Animals**. V. 41, p. 63-67. 2006.

NUR, Z.; ZIK, B.; USTUNER, B.; SAGIRKAYA, H.; OZGUDEN, C. G.; Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. **Theriogenology**, In Press, 2010.

KAWMOTO, 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.

REIS, G. R.; CASTAGNA, C. D.; DIAS, C.P.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Motilidade espermática e integridade de acrossoma de sêmen suíno resfriado com ou sem o uso de gentamicina. In: **IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS**, 01, 1999, Belo Horizonte. Anais ... 1999. p. 339-340.

SONE, M.; CHIKYU, M.; YOSHUDA, M.; BAMBA, K.; OGASA, A. Prolonged storage of boar semen in liquid form. **Journal of Swine Science**. v.29, p.41-50, 1982.

SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; COLETO, Z. F.; MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G.; LEÃO, A. E. D. S.; SOBRINHO, E. S. N. Avaliação microbiológica de sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci**, v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; JANETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessment of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 880-887. 1997.

TONIOLLI, R.; FIÚZA, R.F.; JATAHY, P. C.; BARROS, D. Q.; SANTOS, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle do ejaculado do varrão. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.39-45, 2001.

WALTZ, F.A.; FOLEY, C.W.; HERSCHLER, R.C.; TIFFANY, L.W.; LISKA, B.J. Bacteriological studies of boar semen. **Journal of Animal Science**, v.27, p.1357-1362, 1968.