

PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DOS ESPERMATOZOIDES DE CATETOS CRIOPRESERVADOS COM DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

(Morphofunctional parameters of collared peccary sperm frozen with different antimicrobials)

Samara Sandy Jerônimo MOREIRA*; Tayná Moura MATOS; Luana Grasielle Pereira Bezerra ARAÚJO; Érica Camila Gurgel PRAXEDES; Náyra Rachel Nascimento LUZ; Ana Glória PEREIRA; Alexandre Rodrigues SILVA

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal Animal da Universidade Federal do Semi-Árido (UFERSA), BR110, Km 47, Mossoró/RN, CEP: 59.625-900.

*E-mail: samara.sandy@bol.com.br

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effects of the addition of antimicrobials to the diluent for the cryopreservation of the semen of collectors, especially on the morphofunctional parameters. Ten ejaculates from adult males were obtained by electroejaculation. The samples were evaluated for volume, concentration, motility, morphology, membrane functionality, sperm viability, mitochondrial activity and binding capacity. Subsequently, they were cryopreserved in Tris with egg yolk (20%) and glycerol (3%) added or not (control) with gentamicin (70µg/mL), or with the penicillin (1000 IU/mL) + streptomycin (1mgE/mL). After one week, the samples were thawed and evaluated according to the fresh semen. As for the results, no significant differences were observed between the control treatment and those added with antimicrobials, emphasizing that these do not damage the sperm morphofunctional parameters during cryopreservation. In this sense, it is suggested that both gentamicin and the penicillin/streptomycin combination could be added to the extender for the cryopreservation of the collared peccary semen.

Key words: Biobank, Semen, Cryopreservation, Antimicrobials.

INTRODUÇÃO

O cateto (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) é um taiassuídeo silvestre cuja população vem diminuindo em biomas como a Mata Atlântica. Diante disso, seu desaparecimento nos ecossistemas ocasionaria significativas perdas ecológicas, visto sua importância para a manutenção da fauna e flora (Gongora *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação de germoplasma masculino, poderia repercutir na conservação e multiplicação da espécie (Domingues *et al.*, 2011). No entanto, durante as etapas que envolvem a congelação de sêmen, pode haver contaminação por agentes bacterianos, os quais podem sobreviver à baixas temperaturas (-196 °C) (BIELANSKI e VAJTA, 2009) e causar danos às células espermáticas (Prieto-Martínez *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o uso de antimicrobianos contribuiria para o controle da população bacteriana, bem como minimizaria possíveis danos que a contaminação poderia acarretar. Porém, a depender das concentrações, eles podem acarretar danos aos parâmetros espermáticos. Dentre os antimicrobianos mais usados em diluentes para sêmen de diferentes espécies, destacam-se a associação penicilina/estreptomicina e a gentamicina (Câmara *et al.*, 2018). Assim, o presente trabalho objetivou investigar a ação dos antimicrobianos:

gentamicina (70 µg) e penicilina/estreptomicina (1000 UI/mL/ 1mgE/mL) sobre a qualidade espermática de catetos no processo de congelação/descongelação do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFERSA (nº. 05/2020). Foram utilizados dez ejaculados oriundos de machos sexualmente maduros, mantidos sob fotoperíodo natural de 12h. Os animais receberam alimentação comercial para suínos e frutas da estação, e água à vontade. Antecedendo ao período de coleta, os animais foram mantidos em jejum alimentar de 12h e contidos com auxílio de propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) a 5mg/kg em bolus, via endovenosa. Posteriormente, foi realizada a coleta mediante aplicação do protocolo de eletroejaculação estabelecido para a espécie (Castelo *et al.*, 2010).

Após a coleta, as amostras foram avaliadas quanto ao volume, concentração espermática (em milhões de espermatozoides/mL) por contagem em câmara de Neubauer (400x), morfologia espermática em esfregaços corados com Rosa Bengala, contando-se 200 células (1000×), funcionalidade da membrana pelo teste hipo-osmótico com água destilada (0 mOsm/L) (400x). Em adição, verificou-se a viabilidade espermática e a atividade mitocondrial por marcação com Hoechst 342, Mito Tracker red® e Iodeto de Propídio, contando-se 200 células em microscópio de epifluorescência (Episcopic Fluorescent attachment EFA Halogen Lamp Set. Leica. Kista, Sweden). Os espermatozoides com cabeça marcada em azul foram considerados com membrana intacta e aqueles com cabeça marcada em vermelho com membrana não intacta e com peça intermediária marcada em vermelho foram considerados com função mitocondrial (SOUSA *et al.*, 2013). A análise da capacidade ligante das células espermáticas também foi investigada, utilizando-se o teste de ligação à membrana perivitelina do ovo de galinha conforme descrito por Campos *et al.* (2017).

Alíquotas do sêmen foram criopreservadas em diluente Tris-gema (20%) e glicerol (6%) seguida da adição dos antimicrobianos, consistindo nos seguintes grupos: (A) Controle (sem antimicrobiano/C), (B) 70µg/mL de gentamicina (G) e (C) 1000 UI/mL de penicilina + 1 mgE/mL de estreptomicina (P+E). Após uma semana, as amostras foram descongeladas e submetidas às mesmas avaliações do sêmen fresco.

Os dados obtidos foram expressos em média±erro padrão (média±SEM). O teste de Dunnett comparou o sêmen fresco com os demais tratamentos. Posteriormente, foi realizada uma ANOVA one-way, seguida teste de Tukey para avaliar as diferenças entre os tratamentos (descongelados). Foi utilizado o software Statistical Analysis Software, versão 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os ejaculados apresentaram coloração normal, com um volume de $5,0 \pm 1,2$ mL, com concentração espermática de $461,0 \pm 59,2$ espermatozoides/mL, e motilidade total de $95,3 \pm 0,8\%$. Os demais parâmetros morfofuncionais estão representados na Tab. 01.

Tabela 01: Parâmetros espermáticos morfofuncionais (média±EP) de catetos antes e após a congelação de sêmen (n=10), no grupo controle e utilizando os antimicrobianos, gentamicina ou penicilina/estreptomicina (P+E).

Parâmetros espermáticos	Fresco	Descongelado		
		Controle	Gentamicina	P + E
Morfologia normal (%)	80,0±4,3 ^a	79,4±2,2 ^a	75,1±3,5 ^a	79,1±3,3 ^a
Funcionalidade membrana (%)	69,4±8,62 ^a	50,0±3,6 ^b	59,4±6,1 ^b	50,5±4,3 ^b
Integridade de membrana (%)	80,9±2,2 ^a	37,6±5,4 ^b	40,1±5,8 ^b	31,3±2,5 ^b
Atividade mitocondrial (%)	79,3±2,8 ^a	31,3±5,4 ^b	34,9±5,9 ^b	30,6±2,8 ^b
Nº de espermatozoides ligados	212,0±22,6 ^a	105,0±16,1 ^b	100,7±8,1 ^b	95,8±13,4 ^b

^{abc} Letras minúsculas sobrescritos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

Conforme esperado, as amostras submetidas à congelação/descongelação tiveram seus parâmetros espermáticos reduzidos (p<0,05) em relação às amostras frescas, exceto quanto a morfologia espermática (p>0,05). Apesar disso, entre os tratamentos não houve diferenças significativa (Tab. 01), salientando que ambos os antimicrobianos não causaram danos aos parâmetros espermáticos morfofuncionais.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a adição de antimicrobianos ao diluente seminal de catetos não tem efeito significativos sobre seus parâmetros morfofuncionais após o processo de congelação/descongelação. Assim, sugere-se que tanto a gentamicina como a associação penicilina/estreptomicina poderiam ser adicionados ao diluente para a criopreservação do sêmen de catetos.

REFERÊNCIAS

- BIELANSKI, A.; VAJTA, G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, Canada, v.24, n.10, p.2457- 2467, 2009.
- CÂMARA, T.S.; NUNES, T.G.P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v.28, n.2, p.67-83, 2018.
- CAMPOS, L.B.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.M.; SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S.; MAIA, K.M.; PEREIRA, A.F., SILVA, A.R. Estimating the binding ability of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) sperm using heterologous substrates. *Theriogenology*, Mossoró, v.92, p.57-62, 2017.
- 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, n.6, p.1060-1065, 2010.

DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.124-129, 2011.

GONGORA, J.; REYNA-HURTADO, R.; BECK, H.; TABER, A.; ALTRICHTER, M.; KEUROGHLIAN, A., 2011. *Pecari tajacu*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011:e.T41777A10562361.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20112.RLTS.T41777A10562361.en>. Downloaded on 13 August 2018.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; BUSSALLEU, E.; GARCIA-BONAVILA, E.; BONET, S.; YESTE, M. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17 °C. *Animal Reproduction Science*, v.148, n.1/2, p.72–82, 2014.

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*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.924-930, 2013.

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO, Z.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; NASCIMENTO SOBRINHO, E.S. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, Recife, v.43, n.3, p.329-336, 2006.