

IMPACTO DE ANTIMICROBIANOS NOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CATETOS

(Impact of antimicrobials on the kinetic parameters of collared peccary frozen sperm)

Tayná Moura MATOS*; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA; Andreza Vieira BRAZIL;
Maiko Roberto Tavares DANTAS; Andréia Maria da SILVA; João Batista
Freire SOUZA-JUNIOR; Alexandre Rodrigues SILVA

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Rua Francisco Mota Bairro, 572, Presidente Costa e Silva, Mossoró/RN.
CEP: 59.625-900. *E-mail: taynamouramatos@gmail.com

ABSTRACT

The objective was to verify the impact of the addition of antimicrobials on the kinetic parameters of sperm in the cryopreserved semen of collared peccaries. Ejaculates from 10 adult male, obtained by electroejaculation, were used. The samples had their kinetic parameters evaluated by computer analysis (CASA). Subsequently, they were cryopreserved in Tris plus egg yolk (20%) and glycerol (3%), whether or not (control) added gentamicin (70µg/mL) or the combination penicillin (1000 IU/mL) and streptomycin (1mgE/mL) (P+E). After one week, the samples were thawed and evaluated similarly to fresh semen. In fresh semen, total motility of 95.3±0.8% and 72.1±3.5% progressive motility were observed. After thawing, there were no differences between treatments, except for the cross-beat frequency (BCF) parameter, which was negatively influenced by P+E, in relation to fresh semen ($p<0.05$). In conclusion, it is suggested the use of gentamicin as an antimicrobial for the cryopreservation of semen from peccaries.

Key words: Biobank, semen, cryopreservation, antimicrobials.

INTRODUÇÃO

O cateto (*Pecari tajacu*) é um Tayassuídeo silvestre presente em diferentes biomas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Sua população é descrita como globalmente estável, mas em declínio no bioma Mata Atlântica (Gongora *et al.*, 2011). Além de sua importância ecológica, destaca-se por seu potencial científico, sendo amplamente utilizado em pesquisas conservacionistas, que podem ser extrapoladas para espécies ameaçadas filogeneticamente próximas como o Taguá (*Catagonus wagneri*).

A criopreservação do sêmen tem sido a principal biotécnica aplicada na conservação de material genético da espécie (Souza *et al.*, 2016). A execução do processo pode acarretar contaminações microbianas que podem afetar a qualidade das amostras armazenadas. Para controlar crescimento bacteriano, vários agentes, dentre eles a gentamicina, e a associação penicilina/estreptomicina, têm sido utilizados nos diluentes seminais. Entretanto, os próprios antimicrobianos, a depender de sua concentração, podem afetar a motilidade e a viabilidade espermáticas (Rurangwa *et al.*, 2004).

Os sistemas de análise computadorizada (CASA) permitem uma avaliação objetiva não só da motilidade, mas também de demais parâmetros cinéticos do espermatozoide. Ele pode fornecer informações acuradas, precisas e significativas a respeito do movimento individual de cada célula bem como de suas subpopulações espermáticas (AMANN e KATZ, 2004). Desse modo, possibilitando a identificação de sutis efeitos de variáveis sobre o sêmen,

como por exemplo o uso de drogas adicionadas aos diluentes. Assim, objetivou-se verificar o impacto dos antimicrobianos sobre os parâmetros cinéticos dos espermatozoides de catetos após congelação/descongelação de sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFERSA (nº. 05/2020). Foram utilizados 10 ejaculados provenientes de machos sexualmente maduros, mantidos em grupo, e alimentação para suínos e frutas, além de água à vontade. Na ocasião da coleta, os animais foram contidos com um puçá, e anestesiados com 5mg/kg propofol (Propovan[®], Cristália, Fortaleza, Brasil) em bolus endovenoso. O sêmen foi coletado por eletroejaculação conforme protocolo estabelecido para a espécie (Castelo *et al.*, 2010).

Os ejaculados foram avaliados imediatamente quanto aos seus parâmetros cinéticos por meio da análise computadorizada de sêmen (CASA – IVOS 7.4G, Hamilton-Thorne ResearchTM, Beverly, MA, USA), em câmaras Leja de quatro canais (20µm), com configurações pré-estabelecidas para a espécie (Souza *et al.*, 2016). Os parâmetros avaliados incluíram: número de células contadas, motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade média da trajetória (VAP; mm/s), velocidade linear progressiva (VSL; mm/s), velocidade curvilínea (VCL; mm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH; mm), frequência de batimento cruzado (BCF; Hz), índice de progressão (STR; %) e índice de linearidade (LIN; %). A população de espermatozoides foi subdividida em quatro categorias: rápida, com VAP > VMV; médio, com (VLV < VAP < VMV); lento, com VAP < VLV; e estáticos (Souza *et al.*, 2016).

As amostras foram congeladas em Tris + gema (20%) + glicerol (3%) (controle sem antimicrobianos) ou este diluente adicionado de 70µg/mL de gentamicina (G) ou 1000 UI/mL de penicilina/1mgE/mL de estreptomicina (P+E), e armazenadas em nitrogênio líquido (Souza *et al.*, 2016). Após uma semana, as amostras foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 1 minuto e submetidas novamente à avaliação dos seus parâmetros cinéticos, conforme descrito para o sêmen fresco.

Os dados foram expressos em média±erro padrão (média±SEM). O teste de Dunnett foi aplicado para comparar o sêmen fresco com os demais tratamentos. Posteriormente, foi realizada ANOVA one-way, seguida do 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

O sêmen fresco dos animais, conforme mostrado na Tab. 01, apresentou parâmetros cinéticos com valores dentro da normalidade para a espécie (Castelo *et al.*, 2010).

Conforme esperado, verificou-se que a descongelação provocou a redução de alguns dos parâmetros cinéticos (Tab. 01) quando comparados ao sêmen fresco (p<0,05), exceto a VCL, ALH, STR e subpopulação espermática média e lenta (p>0,05). Os parâmetros cinéticos obtidos pelo sistema CASA são importantes para prever a fertilidade de machos,

destacando-se a motilidade total e a motilidade progressiva, as quais não sofreram influência da ação dos antimicrobianos no presente estudo (Tab. 01). Resultados semelhantes também foram verificados em búfalos (ANDRABI *et al.*, 2016).

Tabela 01: Padrões cinéticos (média±EP) da motilidade de espermatozoides criopreservados em Tris-gema-glicerol adicionado ou não (Controle) dos antibióticos gentamicina ou penicilina/estreptomicina (P+E) em catetos (n=10).

Parâmetros	Sêmen Fresco	Sêmen Descongelado		
		Controle	Gentamicina	P + E
Motilidade total (%)	95,3±0,8 ^A	34,1±3,7 ^{Ba}	37,2±6,1 ^{Ba}	32,6±4,0 ^{Ba}
Motilidade Progressiva (%)	72,1±3,5 ^A	20,2±2,4 ^{Ba}	23,2±4,6 ^{Ba}	20,0±2,8 ^{Ba}
Veloc. média da trajetória (mm/s)	69,2±4,8 ^A	46,1±2,7 ^{Ba}	47,7±2,8 ^{Ba}	45,8±2,5 ^{Ba}
Veloc. linear progressiva (mm/s)	56,8±4,4 ^A	35,7±3,1 ^{Ba}	36,0±3,4 ^{Ba}	33,2±3,0 ^{Ba}
Veloc. curvilínea (mm/s)	119,4±8,0 ^A	100,6±5,5 ^{Aa}	100,2±4,4 ^{Aa}	99,7±5,0 ^{Aa}
Amplitude lateral da cabeça (mm)	5,3±0,3 ^A	5,4±0,2 ^{Aa}	5,6±0,1 ^{Aa}	5,7±0,2 ^{Aa}
Frequência de batimento cruzado (Hz)	37,2±0,6 ^A	35,6±0,9 ^{Aa}	34,1±0,5 ^{Bab}	31,7±1,0 ^{Bb}
Índice de progressão (%)	77,5±2,0 ^A	72,7±2,4 ^{Aa}	70,9±3,5 ^{Aa}	69,0±2,2 ^{Aa}
Índice de linearidade (%)	47,0±2,4 ^A	34,4±1,5 ^{Ba}	34,8±2,3 ^{Ba}	33,3±1,5 ^{Ba}
Subpopulações espermáticas				
Rápido (%)	81,0±3,6 ^A	23,5±3,0 ^{Ba}	27,7±4,9 ^{Ba}	23,4±3,0 ^{Ba}
Médio (%)	14,4±3,0 ^A	10,6±1,8 ^{Aa}	9,4±1,4 ^{Aa}	9,1±1,6 ^{Aa}
Lento (%)	2,0±0,2 ^A	2,7±0,7 ^{Aa}	2,6±0,4 ^{Aa}	2,4±0,6 ^{Aa}
Estático (%)	3,0±0,6 ^A	63,1±4,2 ^{Ba}	60,3±6,4 ^{Ba}	65,0±4,1 ^{Ba}

^{AB}Letras maiúsculas sobrescritos indicam diferença significativa entre os grupos frescos e descongelados (p<0,05); ^{ab}Letras minúsculas sobrescritos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p<0,05).

Apenas sobre a BCF, observou-se um efeito negativo da adição de penicilina/estreptomicina em relação ao grupo controle sem antimicrobianos (p<0,05). Segundo Gil *et al.* (2009), a BCF, em associação com ALH e VCL são considerados parâmetros indicadores do vigor espermático, sendo importantes para a fertilidade.

Neste caso, a gentamicina, por ser um aminoglicosídeo de amplo espectro de ação, atua sobre bactérias gram-negativas, especificamente sobre sua síntese proteica. Desta forma, seu mecanismo de ação se dá em virtude de erros causados ao RNA mensageiro, o qual contribui para a morte celular (Tortora *et al.*, 2017), sem causar danos aos espermatozoides.

CONCLUSÕES

Neste sentido, sugere-se a utilização da gentamicina (70µg/mL) como antimicrobiano a ser adicionado ao diluente Tris-gema-glicerol para a criopreservação do

sêmen de catetos, no intuito de se obter uma maior eficiência na conservação de todos os parâmetros cinéticos espermáticos.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ANDRABI, S.M.H., KHAN, L.A., SHAHAB, M. Isolation of bacteria in semen and evaluation of antibiotics in extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, v.48, n.10, p.1166-1174, 2016.
- 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.
- GIL, M.C.; GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F.J.; APARICIO, I.M.; SANTOS, A.J.; GARCÍA-MARÍN, L.J. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, v.71, n.2, p.254-263, 2009.
- 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.
- RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Review article. *Aquaculture*, Amsterdam, v.234, n.1/4, p.1-28, 2004.
- SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. *Theriogenology*, v.85, n.8, p.1432-1438, 2016.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 12^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2017. 962p.