

## Diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®)

*Different concentration of benzylpenicillin benzatin addition on cryopreserved canine semen using a powdered coconut water extender (ACP-106®)*

BARBOSA, Claudia da Cunha<sup>1\*</sup>; MADEIRA, Victor Leão Hitzchly<sup>1</sup>; JUCÁ, Ricardo Parente<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Ângela Cristina de<sup>1</sup>; UCHOA, Daniel Couto<sup>1</sup>; PINHEIRO, Adriana de Queiroz<sup>2</sup>; SILVA, Lúcia Daniel Machado da<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Microbiologia Veterinária.

\*Endereço para correspondência: clauvet\_cb@yahoo.com.br

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina em diferentes concentrações, sobre a motilidade, morfologia e integridade funcional de membrana do espermatozoide, e o controle do crescimento bacteriano no sêmen canino criopreservado em ACP-106®. Foram utilizados treze ejaculados, avaliados e posteriormente divididos em quatro alíquotas. Cada alíquota foi diluída em ACP-106® com 20% de gema de ovo e quatro concentrações de benzilpenicilina benzatina, de maneira a formar os quatro grupos experimentais: G0 (diluído sem antibiótico); G500 (com 500UI/mL); G1000 (com 1000UI/mL); e G1500 (com 1500UI/mL). Em seguida, as amostras foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Após cerca de uma semana, foram descongeladas e submetidas à avaliação espermática e microbiológica. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos após descongelação, com relação aos parâmetros seminais avaliados de morfologia, acrossoma intacto e percentual de espermatozoides vivos, bem como para ao número de UFC/μL. Na avaliação computadorizada, também não foi evidenciada diferença entre os grupos para todos os parâmetros avaliados. Conclui-se que a benzilpenicilina benzatina quando adicionada ao ACP-106® não controla o crescimento bacteriano e não influencia a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen canino.

**Palavras-chave:** antibiótico, cão, criopreservação, espermatozoide

### SUMMARY

This research aimed at analyzing the effect of benzylpenicillin benzatin addition in different concentrations, on semen motility, morphology and functional spermatic membrane integrity, and of control of bacterial growth on canine semen cryopreserved in ACP-106®. Thirteen ejaculates were used, evaluated and further divided into four aliquots. Each aliquots was extended in ACP-106® with 20% egg yolk and four concentrations of benzylpenicillin benzatin, forming four experimental groups: G0 (without antibiotic); G500 (with 500UI/mL); G1000 (with 1000UI/mL); and G1500 (with 1500UI/mL). After then, the samples were frozen and stored in liquid nitrogen. After about one week, samples were thawed and submitted to spermatic and microbiology evaluations. No differences were observed among groups after thawing regarding seminal parameters, morphology, intact acrossoma and percentual of live spermatozoa, as well for the number of UFC/μL. In computerized analyzes, it was also evidenced no differences for all seminal parameters. In conclusion, benzylpenicillin benzatin added to ACP-106® does not control bacterial growth and does not influence spermatic quality after canine semen cryopreservation.

**Keywords:** antibiotic, cryopreservation, dog, spermatozoa

## INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica que permite o armazenamento por tempo indeterminado de material genético de machos com alto padrão racial, além de facilitar a troca de material genético dentro e entre países, o que reduz custos com transportes de animais e evita o estresse dos reprodutores e a transmissão de doenças (CARDOSO et al., 2000).

Apesar de os ejaculados serem estéreis, esses podem se contaminar durante o processo de coleta, bem como durante seu processamento para congelamento por meio da gema de ovo utilizada nos diluidores (BOUSSEAU et al., 1998), com o próprio diluidor, as palhetas, o álcool polivinílico (MARINOV & BOHNEL, 1972) e com o nitrogênio líquido e sua fase de vapor (LEVY et al., 2004).

A contaminação bacteriana pode afetar negativamente a fertilidade do espermatozoide pela própria presença das bactérias, pela produção de toxinas e por degradação dos componentes do meio.

A fim de se controlar o crescimento bacteriano, antibióticos têm sido adicionados aos diluidores seminais para criopreservação do sêmen de bovinos (MOUSSA et al., 2002), equinos (VIDAMENT et al., 2000), suínos (KAWANO et al., 2004) e caninos (PEÑA et al., 2003), e a associação clássica de penicilina e estreptomicina foi a mais utilizada (ÁLAMO et al., 2005; MARTINS-BESSA et al., 2006).

Para o resfriamento do sêmen equino, foi verificado que a utilização de doses elevadas de antibióticos pode prejudicar a motilidade e a membrana acrossômica, quando a conservação é feita por até 72 horas (VIEIRA et al., 2002).

Apesar de alguns autores já utilizarem antibióticos em diluidores para criopreservação do sêmen canino (RIJSSELAERE et al., 2002; PEÑA et al., 2003; SCHÄFER-SOMI et al., 2006), ainda há carência de estudos sobre a concentração

ideal desses e dos efeitos sobre a qualidade espermática canina. Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de benzilpenicilina benzatina, em diferentes concentrações sobre a motilidade, morfologia e integridade funcional de membrana do espermatozoide canino criopreservado em um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106<sup>®</sup>), e ainda verificar seu efeito sobre o controle do crescimento bacteriano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Seis cães clinicamente saudáveis foram selecionados, dois da raça Boxer, um Rottweiler, um American Pit Bull Terrier, um Bullmastiff e um Sharpei, com idade entre 18 meses e 9 anos. Os cães pertenciam a canis particulares e eram mantidos em boxes individuais com livre acesso à água e alimentados com ração comercial uma vez ao dia.

Foi utilizado um total de 13 ejaculados, com uma média de dois ejaculados por cão. A coleta foi realizada por meio da técnica de manipulação digital, sendo as frações seminais separadas por mudança na coloração. A fração rica em espermatozoide foi destinada às avaliações e à posterior criopreservação. No sêmen a fresco, foram observados os parâmetros macroscópicos de cor, pH e volume. Os parâmetros microscópicos de motilidade (percentual de espermatozoides com motilidade progressiva e retilínea) e vigor espermático, mensurado em uma escala de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimento vigoroso, retilíneo e progressivo) (CBRA, 1998), foram

avaliados com auxílio de microscópio óptico (100x).

A morfologia espermática e a integridade acrossomal foram avaliadas através da contagem de 200 células coradas com rosa de bengala, e as células classificadas como normais ou alteradas e o acrossoma, como intacto ou danificado. Essas avaliações foram realizadas através da microscopia óptica, em aumento de 1000x.

A concentração espermática foi mensurada através de contagem em câmara de Neubauer (CARDOSO et al., 2003).

Somente amostras com motilidade  $\geq 85\%$ , vigor  $\geq 4$  e alterações morfológicas totais espermáticas  $\leq 15\%$  foram utilizadas para o experimento.

Para o trabalho, foi utilizado o diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106<sup>®</sup>, ACP BIOTECNOLOGIA<sup>®</sup>, Fortaleza, Ceará, Brasil), preparado segundo recomendações do fabricante. O ACP-106<sup>®</sup> é um diluidor para a congelação de sêmen de cães. O meio é composto de água de coco desidratada e reguladores de pH. É um produto natural, de composição complexa, à base de carboidratos (frutose e glicose, sem a presença de sacarose), sais minerais (potássio, sódio, cálcio, ferro, cobre, fósforo, magnésio, manganês, selênio e zinco), vitaminas (B1, B2, B3, B6, C), proteínas, aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina e valina), fibra alimentar, baixíssimas quantidades de ácidos graxos (<1%), com destaque para o ácido graxo monoinsaturado, ácido oleico e o polinsaturado ácido linoleico, sem gorduras trans. Apresenta ainda quantidades reduzidas de ácidos graxos saturados (ácido caprílico, cáprico, láurico, mirístico e palmítico). O peso líquido é de 18,55g e deve ser diluído em 250mL de água destilada. Após o preparo, o diluidor tem pH de 7,22 e osmolaridade de 355mOsm/Kg.

20% do diluidor ACP-106<sup>®</sup> foram substituídos por 20% de gema de ovo, o que possibilitou a constituição do diluidor base. A partir do diluidor base, foram preparados quatro diluidores: D0 (diluidor base sem benzilpenicilina benzatina), D500 (diluidor base + 500UI/mL de benzilpenicilina benzatina), D1000 (diluidor base + 1000UI/mL de benzilpenicilina benzatina) e D1500 (diluidor base + 1500UI/mL de benzilpenicilina benzatina). Esses quatro diluidores foram divididos em duas partes, A e B. À parte B, foi acrescido glicerol, na concentração de 12%.

Inicialmente, o sêmen após prévia avaliação, foi dividido em quatro alíquotas de igual volume, o que possibilitou a formação de quatro grupos experimentais. Cada grupo foi diluído com o diluidor A; G0 (diluído com D0), G500 (diluído com D500), G1000 (diluído com D1000) e G1500 (diluído D1500).

Após a primeira diluição, os grupos armazenados em tubos de vidro foram colocados em um recipiente com água e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável (15°C) por 40 minutos. Em seguida, os grupos foram transferidos para um refrigerador até atingir 4°C e lá permaneceram por 30 minutos. A segunda diluição foi realizada a 4°C com a parte do diluidor B de cada grupo, o que totalizou, após essa diluição, uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após 15 minutos dessa segunda diluição, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL, dispostas horizontalmente em rampa de congelação a uma altura de 5cm do nível de nitrogênio líquido por cinco minutos e, finalmente, foram armazenadas em nitrogênio líquido (CARDOSO et al., 2005).

Após cerca de uma semana, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 1 minuto, depositado em um microtubo de 1mL e mantido em banho-maria a 37°C para posteriores avaliações.

Após a descongelação e com 60 minutos de incubação, foi realizada a avaliação do percentual de espermatozoides vivos, através de esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol. Foram contadas 100 células com auxílio de microscópio óptico com aumento de 400x, e foram classificadas como vivos os espermatozoides que não estavam corados. Nesses dois tempos de incubação, também foram avaliadas a morfologia espermática e a integridade do acrossoma, com lâminas coradas com rosa de bengala.

Foi realizada ainda a análise computadorizada da motilidade espermática, imediatamente, 30, 60 e 90 minutos após a descongelação. Para esta análise, foi realizada uma nova diluição da amostra para facilitar a visualização dessa no sistema computadorizado. Para tanto, foram adicionados 10µL da amostra homogeneizada em um segundo microtubo de 1mL, contendo 50µL de uma solução de citrato de sódio-glicose a 37°C (2,37g citrato de sódio, 0,80g glicose, 100mL água destilada), a fim de se atingir uma concentração de 20 a 35 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Cinco µL da amostra rediluída foram colocados em uma Câmara de Makler<sup>®</sup> (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, e a motilidade espermática foi analisada com o auxílio de microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmara adaptada ao sistema Sperm Class Analyser<sup>®</sup> (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0). Foram obtidos, então, os parâmetros de velocidade média do percurso (VAP, µm/s) da subpopulação de espermatozoides rápidos (VAP > 95 µm/s) e médios (VAP 55 a 95 µm/s); motilidade total (%); motilidade progressiva (%); subpopulação de espermatozoides rápidos e médios (%).

O teste hiposmótico foi realizado após a coleta e imediatamente após a descongelação do sêmen. Para isso, 0,01mL de sêmen foi diluído em 0,09mL de água destilada e mantido em banho-maria a 38°C por 45 minutos. Após esse período, uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, e contadas 200 células com auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x. Os espermatozoides que apresentaram cauda enrolada foram considerados portadores de membrana espermática funcional.

Para a análise microbiológica do sêmen, foram utilizadas as técnicas de contagem padrão em placas e diluições seriadas (TORTORA et al., 2005), que consistiram na análise de uma palheta de cada grupo. Para tanto, as palhetas foram descongeladas em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, o sêmen a uma temperatura aproximada de 27°C foi acondicionado em microtubos de 1mL. Dessas amostras, 100µL foram serialmente diluídos em tubos de vidro com 900µL de solução salina peptonada 0,01%, para se obter diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>. Em seguida, 100µL de cada diluição foram inoculados em placas de Petri, com 10 mL do ágar tryptic soy (Merck<sup>®</sup>), por meio do método de espalhamento (TORTORA et al., 2005). Todos esses procedimentos foram realizados assepticamente, e a inoculação das placas foi realizada em duplicata.

As placas semeadas foram incubadas à temperatura de 35°C ± 2, por 18 a 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem das colônias através da observação visual. Foram contadas as colônias das placas de diluição que apresentassem melhor individualização das colônias, e foi realizada uma média do número de

colônias das duas placas. O resultado da contagem foi expresso em unidades formadoras de colônias por microlitro de amostra (UFC/ $\mu$ L), por meio da fórmula:  $UFC = N \times ID$  (N representa o número de colônias observadas e ID o inverso da diluição).

No sêmen a fresco, a cor foi avaliada de forma subjetiva, e o volume da fração espermática e as características microscópicas do sêmen foram avaliados por estatística descritiva e expressos na forma de média e erro padrão. Os parâmetros avaliados após a descongelação foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para confirmação da normalidade da distribuição e homogeneidade de variâncias entre tratamentos, respectivamente. Nas situações em que houve atendimento das exigências para a análise de variância, essa foi executada por meio do procedimento GLM do Programa SAS (2002), e os testes de comparação de médias foram aplicados de acordo com os critérios recomendados por Sampaio (2002): variáveis com coeficiente de variação (CV)  $\leq 15\%$  (percentuais de espermatozoides morfolologicamente normais e de acrossomas intactos nos tempos zero e 60) foram comparadas pelo teste de Tukey, enquanto aquelas com CV  $> 15\%$  (percentagem de espermatozoides vivos e dados microbiológicos) foram submetidas ao teste *t* de Student, no intuito de combater a ocorrência de erro tipo II. Os dados referentes à microbiologia (UFC/ $\mu$ l) foram transformados em  $\log(x+1)$ . Nos casos em que houve heterocedasticidade mesmo após tentativas de transformação dos dados (teste hiposmótico e análise espermática computadorizada pós-descongelação) foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen a fresco apresentou: cor branca opalescente; pH  $5,92 \pm 0,11$ ; volume  $1,62 \pm 0,2$ mL; concentração  $782,31 \pm 76,07 \times 10^6$  espermatozoides/mL; motilidade  $99,23 \pm 0,77\%$ ; vigor  $5 \pm 0$ ; total de espermatozoides normais  $96,05 \pm 0,66\%$ ; total de espermatozoides com acrossoma intacto  $99,40 \pm 0,30\%$ . Todos os parâmetros avaliados foram considerados normais para a espécie canina (CBRA, 1998) e estavam dentro dos critérios qualitativos preconizados para o estudo, o que possibilitou a utilização dos ejaculados para o experimento.

A avaliação da morfologia espermática é uma ferramenta a mais para a avaliação espermática. OETTLÉ (1993) relatou que a fertilidade é afetada quando a proporção de espermatozoides morfolologicamente normais está abaixo de 60%.

Após a descongelação, foi observado que o percentual total de espermatozoides morfolologicamente normais não sofreu efeito das diferentes concentrações de antibiótico, tanto logo após (descongelação), quanto aos 60 minutos de incubação ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1). Dessa forma, a morfologia se manteve dentro dos padrões para garantir a fertilidade dos espermatozoides (OETTLÉ, 1993).

A integridade do acrossoma é fundamental no processo de fertilização, e sua integridade é significativamente reduzida após congelação e descongelação (HOLT, 2000), bem como após a refrigeração por tempo prolongado com elevadas concentrações de antibiótico (VIEIRA et al., 2002). Neste trabalho, pode-se verificar que não houve diferença entre



os grupos testados quanto ao percentual de acrossomas intactos, bem como não houve redução nesse percentual durante o período de incubação a 37°C em nenhum dos grupos testados (P<0,05), conforme a Tabela 1, o

que evidencia que as concentrações de antibiótico encontraram-se dentro de um limite aceitável não prejudicial para os espermatozoides.

Tabela 1. Média ± erro padrão do percentual de espermatozoides normais e vivos, com acrossoma intacto, imediatamente após a descongelação e após 60 minutos de incubação a 37°C, do sêmen canino, criopreservado em ACP-106<sup>®</sup> acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina.

%	Sêmen descongelado			
	G0	G500	G1000	G1500
	Normais			
0'	93,88 ± 0,80 <sup>a</sup>	94,25 ± 0,89 <sup>a</sup>	94,38 ± 0,85 <sup>a</sup>	95,08 ± 0,72 <sup>a</sup>
60'	92,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	93,69 ± 0,95 <sup>a</sup>	92,79 ± 0,72 <sup>a</sup>	93,69 ± 0,47 <sup>a</sup>
	Acrossoma intacto			
0'	95,65 ± 1,34 <sup>a</sup>	97,37 ± 0,31 <sup>a</sup>	97,58 ± 0,41 <sup>a</sup>	97,27 ± 0,27 <sup>a</sup>
60'	95,50 ± 0,69 <sup>a</sup>	95,88 ± 0,74 <sup>a</sup>	96,67 ± 0,62 <sup>a</sup>	95,69 ± 0,68 <sup>a</sup>
	Vivos			
0'	42,23 ± 4,05 <sup>a</sup>	41,58 ± 4,74 <sup>a</sup>	49,96 ± 3,36 <sup>a</sup>	42,92 ± 4,74 <sup>a</sup>
60'	28,46 ± 4,98 <sup>b</sup>	29,31 ± 4,70 <sup>a</sup>	29,54 ± 5,06 <sup>b</sup>	25,35 ± 5,02 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, em cada parâmetro, diferem entre si (P<0,05), pelo Teste de Tukey (% normais e acrossoma intacto) e pelo teste *t* de Student (% vivos).

A integridade e função da membrana plasmática são essenciais para viabilidade celular. A permeabilidade seletiva da membrana plasmática mantém a atividade metabólica intracelular, composições iônicas e pH. Na célula espermática, a membrana plasmática funcional é essencial para o evento de fusão com o ócito (ROTA et al., 1997).

No sêmen a fresco, foi observado no teste hiposmótico que 95,53 ± 0,63% dos espermatozoides apresentavam membrana funcional, sendo evidenciado, após a descongelação, uma redução nesse percentual em todos os grupos testados (P<0,05). Não foi observada diferença entre os grupos (P>0,05 - Tabela 2), o que evidencia que a adição de benzilpenicilina benzatina não afetou o percentual de membrana funcional. Essa redução no percentual de espermatozoides com

membrana funcional já era esperada, visto que o processamento de congelação e descongelação causam alterações na membrana plasmática que muitas vezes podem ser irreversíveis (HOLT, 2000).

A redução no número de espermatozoides vivos nos grupos G0, G1000 e G1500, após 60' de incubação a 37°C (Tabela 1), pode ser explicada pelos danos ocorridos nos espermatozoides pelas mudanças de temperatura que envolve o processo de congelação e descongelação, pelo estresse osmótico e tóxico da exposição ao crioprotetor e pela formação e dissolução de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

Na avaliação computadorizada da motilidade, após a descongelação

(Figura 1), não foram evidenciadas diferenças entre os grupos para o mesmo tempo de avaliação, em nenhum dos parâmetros avaliados ( $P>0,05$ ). Imediatamente após a descongelação, os grupos apresentaram: motilidade total entre 41,78 e 47,05% (Figura 1A); motilidade progressiva de 30,77 a 34,72% (Figura 1B);

% de espermatozoides rápidos de 17,18 a 21,55% (Figura 1C); % de espermatozoides médios de 14,07 a 15,82% (Figura 1D); VAP dos rápidos de 112,88 a 91,03 $\mu\text{m/s}$  (Figura 1E); VAP dos médios de 80,08 a 78,29 $\mu\text{m/s}$  (Figura 1F).

Tabela 2. Média  $\pm$  erro padrão do percentual de espermatozoides com membrana funcional (teste hiposmótico) no sêmen a fresco e após a descongelação do sêmen canino criopreservado em ACP-106<sup>®</sup> acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina

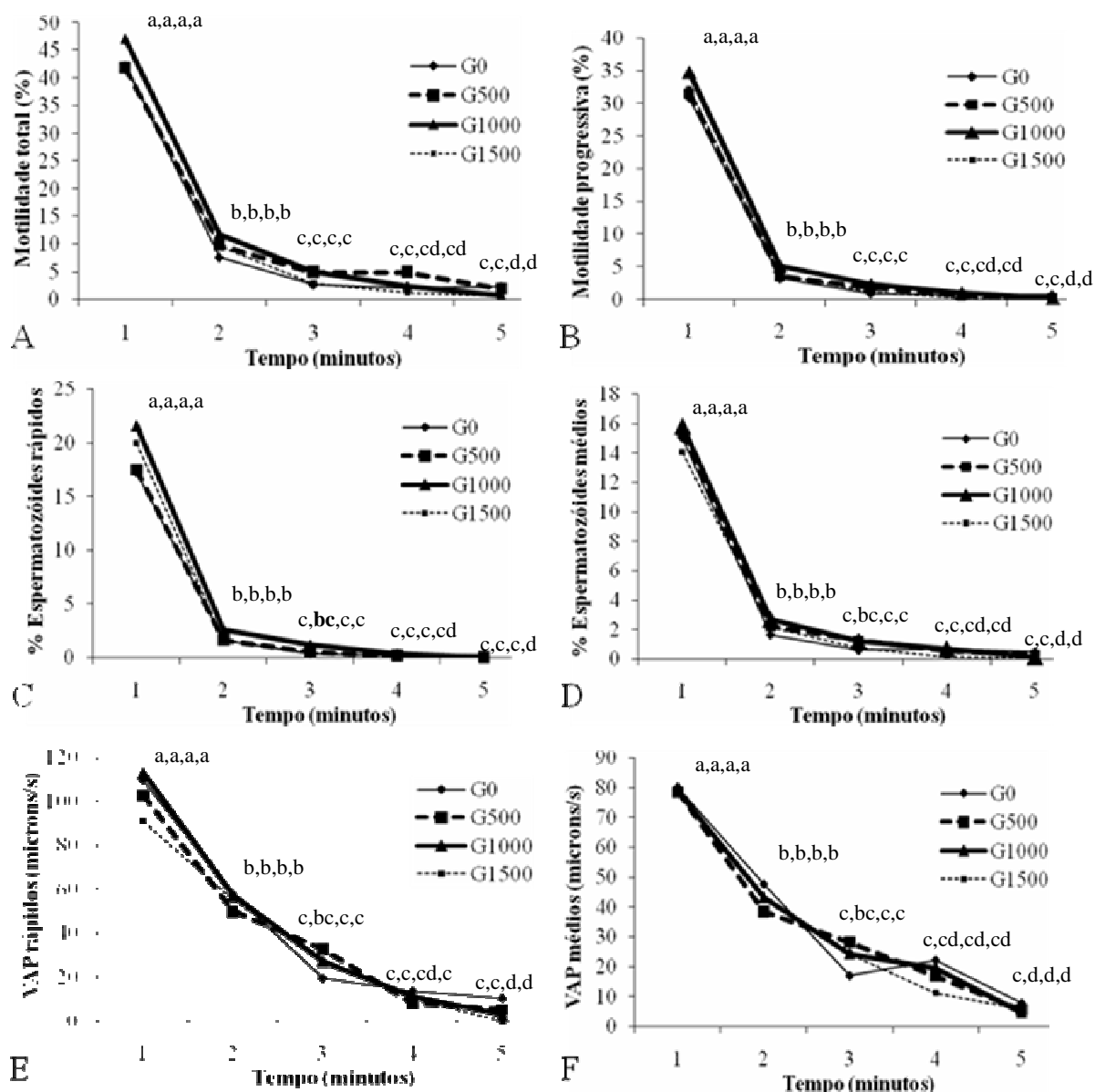
Grupos	Espermatozóides com membrana funcional (%)
Sêmen fresco	95,53 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>
Descongelado	-
G0	54,50 $\pm$ 4,48 <sup>b</sup>
G500	56,42 $\pm$ 5,14 <sup>b</sup>
G1000	61,23 $\pm$ 3,93 <sup>b</sup>
G1500	56,15 $\pm$ 4,93 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo Teste de Kruskal-Wallis.

Aos 30 minutos de incubação, foi verificada uma redução em todos os parâmetros avaliados, quando comparado com o tempo 0' de descongelação ( $P<0,05$ ), o que não diferiu entre os grupos ( $P>0,05$ ). Foi observada motilidade total entre 7,64 e 11,78%, motilidade progressiva de 3,24 a 5,08%; % de espermatozoides rápidos de 1,58 a 2,54%, % de espermatozoides médios de 1,65 a 2,72%; VAP dos rápidos de 49,92 a 57,44 $\mu\text{m/s}$ ; VAP dos médios de 38,44 a 47,6 $\mu\text{m/s}$  (Figura 1).

Pode-se observar ainda que, com o passar do tempo de incubação, houve uma redução significativa em todos os parâmetros avaliados, e foi evidenciado que cada grupo testado apresentou um comportamento diferenciado nessa redução, no entanto, os grupos não

diferiram nos tempos testados, o que indica que as diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina não afetam os parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA. A motilidade espermática é o principal parâmetro microscópico utilizado por diversos autores para avaliação do sêmen descongelado (CARDOSO et al., 2006; SILVA et al., 2006; GODIM et al., 2009) e é considerada como ideal para inseminação artificial, motilidade pós-descongelação acima de 50% e aceitável acima de 30%, o que indica adequação das amostras deste trabalho para inseminação artificial.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos para cada tratamento avaliado. As seqüências de letras minúsculas separadas por vírgulas em cada tempo referem-se aos grupos G0, G500, G1000, e G1500 ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, em cada tempo avaliado.

Figura 1. Análise espermática computadorizada pós-descongelção do sêmen canino criopreservado em ACP-106<sup>®</sup>, acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina. (A) Motilidade total (%); (B) Motilidade progressiva (%); (C) Percentual médio da subpopulação de espermatozoides rápidos; (D) Percentual médio da subpopulação de espermatozoides médios; (E) VAP média da subpopulação de espermatozoides rápidos ( $\mu\text{m/s}$ ); (F) VAP média da subpopulação de espermatozoides médios ( $\mu\text{m/s}$ )



Outro parâmetro que deve ser levado em conta na avaliação do sêmen congelado é a velocidade média do percurso (VAP), pois essa foi correlacionada à interação entre oócito e espermatozoide (SILVA et al., 2006).

Observou-se que os resultados encontrados neste trabalho, para as VAPs dos espermatozoides com velocidade rápida e média, imediatamente após a descongelação, estão próximos aos observados por SILVA et al. (2006), que observou uma VAP média de  $100,9 \pm 7,4 \mu\text{m/s}$ , e ROTA et al. (2006), com uma VAP de  $87,8 \pm 7,4 \mu\text{m/s}$ , ambos utilizando diluidor Tris sem antibióticos.

SILVA et al. (2006) não verificaram relação entre as subpopulações de espermatozoides com interações de espermatozoides-oócito em cães. Os autores também supuseram que a

habilidade de fertilização *in vitro* não está relacionada à subpopulação de espermatozoides rápidos, e sim à distribuição entre as várias populações espermáticas.

A adição de antibióticos não foi eficiente para controlar o crescimento bacteriano, visto que após a descongelação não foi evidenciada diferença entre os grupos quanto ao número de UFC/ $\mu\text{L}$  da amostra (Tabela 3). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de neste trabalho ter sido utilizado somente um antibiótico, visto que a maioria dos trabalhos utiliza associações de antibióticos (PEÑA et al., 2003; SCHÄFER-SOMI et al., 2006). Outra possibilidade é a existência de relatos de resistência bacteriana aos antibióticos penicilina e estreptomicina, o que foi relatado para o sêmen caprino (SOUZA et al., 2006).

Tabela 3. Média  $\pm$  erro padrão do número de unidades formadoras de colônia por microlitros de amostra (UFC/ $\mu\text{L}$ ) após a descongelação, do sêmen canino criopreservado em ACP-106<sup>®</sup> acrescido de diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina

Grupos	UFC/ $\mu\text{L}$
G0	$5,9 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$
G500	$4,2 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$
G1000	$1,5 \times 10^3 \pm 0,9 \times 10^3$
G1500	$2,3 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$

P>0,05 pelo teste *t* de Student.

Vale ressaltar que a presença de microrganismos nem sempre é um indicador de infecção. Além disso, a concentração e o tipo de bactéria são os fatores mais importantes para determinação de contaminação ou infecção (COTTELL et al., 1997). Dessa forma, estudos são necessários para se identificar quais os tipos de bactérias estão presentes no sêmen canino

descongelado, a fim de se confirmar se as mesmas são potenciais transmissores de doenças ou somente bactérias oportunistas. É necessária também a avaliação da eficiência de outros antibióticos, bem como suas associações para o controle do crescimento microbiano no sêmen canino descongelado.

Conclui-se que o antibiótico benzilpenicilina benzatina quando adicionado em diferentes concentrações ao diluidor ACP-106<sup>®</sup> não afetou a motilidade, integridade funcional de membrana e morfologia do espermatozoide canino criopreservado, no entanto, não foi eficiente no controle do crescimento bacteriano.

## AGRADECIMENTOS

*Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro; aos proprietários dos cães, em particular ao Daniel Couto Uchoa, por disponibilizar os animais para estudo; aos Professores Dr. Airton Alencar de Araújo e Dr. Cláudio Cabral Campello pela colaboração nas análises estatísticas e ao Laboratório de tecnologia do Sêmen Caprino pela disponibilização do CASA.*

## REFERÊNCIAS

ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GONZALEZ, F.; RODRIGUEZ, N.; CABRERA, F.; GARCIA, A. Criopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees C as a viable alternative to liquid nitrogen. **Theriogenology**, v.63, n.1, p.72-82, 2005. [ [Links](#) ].

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, n.5, p.699-706, 1998. [ [Links](#) ].

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v.10, n.4, p.29-36, 2000. [ [Links](#) ].

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Determinação da concentração espermática no sêmen de cães Pastores Alemães através da espectrofotometria. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.384-386, 2003. [ [Links](#) ].

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v.92, n.3-4, p.384-391, 2006. [ [Links](#) ].

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP<sup>®</sup>-106) for cyopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.2, n.4, p.257-262, 2005. [ [Links](#) ].

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1998. [ [Links](#) ].

COTTELL, E.; BARRY-KINSELLA, C.; LENNON, B.; HARRISON, R.F.; MCMORROW, J. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.65, n.1, p.98-103, 1997. [ [Links](#) ].

GODIM, D.; CASTRO, A.C.N.de1;  
VIDAL, M.; FERREIRA, M.A.R.;  
CURY, L.J.; PINHO, T.G. Métodos de  
congelamento *One Step* e *Two Steps* do  
sêmen de cães, diluído em solução de  
água de coco e etilenoglicol. **Revista  
Brasileira de Saúde e Produção  
Animal**, v.10, n.2, p.417-422, 2009.  
[ [Links](#) ].

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen  
storage of semen. **Animal Reproduction  
Science**, v.62, n.1, p.3-22, 2000. [ [Links](#) ].

KAWANO, N.; SHIMADA, M.;  
TERADA, T. Motility and penetration  
competence of frozen-thawed miniature  
pig spermatozoa are substantially altered  
by exposure to seminal plasma before  
freezing. **Theriogenology**, v.61, n.2-3,  
p.351-364, 2004. [ [Links](#) ].

LEVY, R.; GRATARD, F.; MAUBON,  
I.; ROS, A. POZZETTO, B. Bacterial risk  
and sperm cryopreservation. **Andrologia**,  
v.36, n.5, p.282-285, 2004. [ [Links](#) ].

MARINOV, P.; BOHENEL, H. Higienic  
conditions of materials of freezing bovine  
semen. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.6,  
p.707-711, 1974. [ [Links](#) ].

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.;  
MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing  
ethylene glycol with glycerol for  
cryopreservation of canine semen in Tris-  
egg yolk extender. **Theriogenology**, v.66,  
n.9, p.2047-2055, 2006. [ [Links](#) ].

MOUSSA, M.; MARTINET, V.;  
TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.;  
ANTON, M. Low density lipoproteins  
extracted from egg yolk by an easy  
method: cryoprotective effect on frozen-  
thawed bull semen. **Theriogenology**,  
v.57, n.6, p.1695-1706, 2002. [ [Links](#) ].

OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and  
fertility in the dog. **Journal of  
Reproduction and Fertility**, v.47,  
Supl.2, p.257-260, 1993. [ [Links](#) ].

PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.L.;  
BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.;  
QUINTELA, L.A. Effect of Equex from  
different sources on post-thaw survival,  
longevity and intracellular  $Ca^{2+}$   
concentration of dog spermatozoa.  
**Theriogenology**, v.59, n.8, p.1725-  
1739, 2003. [ [Links](#) ].

RIJSSELAERE, T.; SOON, A.V.;  
MAES, D.; KRUIF, A. Effect of  
centrifugation on in vitro survival of  
fresh diluted canine spermatozoa.  
**Theriogenology**, v.57, n.6, p.1669-  
1681, 2002. [ [Links](#) ].

ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA,  
G.; MARTINI, M. Comparison between  
glycerol and ethylene glycol for dog  
semen cryopreservation.  
**Theriogenology**, v.65, n.9, p.1848-  
1858, 2006. [ [Links](#) ].

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-  
FORSBERG, C.; RODRIGUES-  
MARTINEZ, H. Effect of Equex STM  
paste on viability of frozen-thawed dog  
spermatozoa during in vitro incubation  
at 38°C. **Theriogenology**, v.47, n.5,  
p.1093-1101, 1997. [ [Links](#) ].

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada  
à experimentação animal**. 2.ed. Belo  
Horizonte: Fundação de Estudo e  
Pesquisa em Medicina Veterinária e  
Zootecnia, 2002. 265p. [ [Links](#) ].

SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.;  
KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C.  
Effect of semen extender and semen  
processing on motility and viability of  
frozen-thawed dog spermatozoa.  
**Theriogenology**, v.66, n.2, p.173-182,  
2006. [ [Links](#) ].

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.;  
SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.;  
SOUZA, F.F. Prognostic value of  
canine frozen-thawed semen parameters  
on in vitro sperm-oocyte interactions.  
**Theriogenology**, v.66, n.2, p.456-462,  
2006. [ [Links](#) ].

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 do  
sêmen fresco e congelado de  
reprodutores caprinos. **Braslian  
Journal of Veterinary Research  
Animal Science**, v.43, n.3, p.329-336,  
2006. [ [Links](#) ].

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.;  
CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São  
Paulo: Artmed, 2005. p.155-182.  
[ [Links](#) ].

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE,  
P.; BOURGEOUIS, G.; MAGISTRINI,  
M., PALMER, E. Centrifugation and  
addition of glycerol at 22°C instead of  
4°C improve post-thaw sperm motility  
and fertility of stallion spermatozoa.  
**Theriogenology**, v.54, n.6, p.907-919,  
2000. [ [Links](#) ].

VIEIRA, M.J.; MATTOS, A.L.G.;  
MALSCHITZKY, E.; GARBADE, P.;  
GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C.  
Agentes antimicrobianos no diluente de  
sêmen equino e seus efeitos na  
motilidade, na membrana acrossômica e  
nas taxas de prenhez. **Ata Scientiae  
Veterinariae**, v.30, n.2, p.93-99, 2002.  
[ [Links](#) ].

WATSON, P.F. The causes of reduced  
fertility whith cryopreserved semen.  
**Animal Reproduction Science**, v.60-  
61, p.481-492, 2000. [ [Links](#) ].

Data de recebimento: 20/02/2009

Data de aprovação: 05/01/2010