

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**ANÁLISE DA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO SOB A INFLUÊNCIA DE
DILUENTES EM UMA CENTRAL DE PRODUÇÃO DE SÊMEN SUÍNO
NO INTERIOR DO RIO GRANDE DO SUL**

Karina Leipelt

Lajeado, novembro de 2017.

Karina Leipelt

**ANÁLISE DA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO SOB A INFLUÊNCIA DE
DILUENTES EM UMA CENTRAL DE PRODUÇÃO DE SÊMEN SUÍNO NO
INTERIOR DO RIO GRANDE DO SUL**

Artigo científico elaborado e apresentado na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Biomedicina, bacharelado da Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luís César de Castro

Lajeado, novembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por chegar até aqui.

Aos meus pais, pela oportunidade, apoio em todos os momentos e por acreditar que seria possível.

Ao Prof. Dr. Luís César de Castro pela orientação, apoio, suporte e paciência.

Aos responsáveis da Central de Produção de Sêmen Suíno, que disponibilizaram o material necessário para desenvolvimento dessa pesquisa.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ANÁLISE DA QUALIDADE DE SÊMEN SUÍNO SOB A INFLUÊNCIA DE DILUENTES EM UMA CENTRAL DE PRODUÇÃO DE SÊMEN SUÍNO NO INTERIOR DO RIO GRANDE DO SUL

Karina Leipelt^{1*}; Luís César de Castro²

¹*Curso de Biomedicina, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, ²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Vale do Taquari -UNIVATES*

RESUMO

A inseminação artificial, em suínos, empregando machos criados em centrais de inseminação, proporciona um melhor aproveitamento e desempenho reprodutivo, além de seleção genética. Células espermáticas do ejaculado suíno são sensíveis ao frio e calor. Este trabalho analisou a qualidade do sêmen de suínos em termos de motilidade dos espermatozoides e a atividade antimicrobiana de diluentes empregados no setor de inseminação. Todos diluentes, especialmente nas primeiras 48 horas de coleta do sêmen, apresentaram manutenção da adequada motilidade dos espermatozoides. Apenas diluentes adicionados de antibióticos foram efetivos quanto a contaminações bacterianas no sêmen. Boas práticas de manuseio e assepsia contribuem para a minimização ou extinção no emprego de antimicrobianos nos diluentes.

Palavras-chave: Inseminação, motilidade espermatozoides, atividade antimicrobiana, diluentes.

ABSTRACT

Artificial insemination, in swine, using males raised in insemination centers, provides better utilization and reproductive performance, as well as genetic selection. Sperm cells of the swine ejaculate are sensitive to cold and heat. This work analyzed the quality of porcine semen in terms of sperm motility and the antimicrobial activity of diluents used in the insemination sector. All diluents, especially in the first 48 hours of semen collection, maintain the adequate motility of the spermatozoa. Only added diluents of antibiotics are effective for bacterial contamination in semen. Good handling and asepsis practices contribute to the minimization or extinction of the use of antimicrobials in the diluents.

Keywords: Insemination, motile spermatozoa, antimicrobial activity of diluents.

^{1*}**Correspondência:** Karina Leipelt. Curso de Biomedicina - UNIVATES, Universidade do Vale do Taquari, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rua Avelino Tallini, 171- Bairro Universitário, 95900-000 - Lajeado - RS, Brasil. E-mail: kleipelt@bol.com.br

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial, em suínos, é uma técnica simples e amplamente utilizada na suinocultura. Os machos são criados em centrais de inseminação para proporcionar um melhor aproveitamento e conseqüente desempenho reprodutivo, proporcionando a seleção genética (ACBS,2014).

As células espermáticas do ejaculado suíno são sensíveis ao frio e calor. Qualquer mudança repentina de temperatura age como tensor térmico para a conseqüente perda da viabilidade do espermatozoide, fazendo com que a conservação da dose de sêmen seja comprometida. Em adição, a forma de armazenamento e o diluente utilizado também podem interferir na viabilidade dos espermatozóides (BARROS et al., 2016).

Os diluentes são constituídos por elementos químicos, responsáveis por manter o espermatozoide viável até o momento da inseminação, estabilizando o pH, inibindo o crescimento bacteriano e aumentando o volume do ejaculado. As Centrais de produção de sêmen suíno, normalmente, utilizam dois tipos de diluentes: os de longa duração, que prolongam a vida do espermatozoide por cinco ou mais dias e os de curta duração, que preservam a viabilidade espermática por até três dias (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005).

A biota bacteriana do ejaculado é variável, pois depende da forma que é realizada a coleta, bem como dos cuidados dispensados durante o processamento das amostras. Os microrganismos de ocorrência mais frequente no sêmen são *Staphylococcus* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp e *Escherichia coli* (BATISTA et al., 2013).

O teste de motilidade é muito importante pois os espermatozoides precisam estar vivos e móveis para alcançar o ovócito, para que aconteça a fecundação. É um método rápido e fácil, de baixo custo, que proporciona a seleção do ejaculado para inseminação, sendo que para que não haja comprometimento da fertilização, a motilidade precisa ser maior de 60% (BARROS et al, 2013). Entretanto, as centrais de produção de sêmen suíno costumam descartar ejaculados com porcentagens a baixo de 80% (ABCS, 2014).

O presente estudo tem como objetivo analisar a qualidade de sêmen suíno sob a influência de diluentes em uma central de produção de sêmen suíno no interior do Rio Grande do Sul.

MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de uma Central de Produção de Sêmen (CPS), no município de Estrela/RS, utilizando ejaculados provenientes de suínos reprodutores, em fase de treinamento, com idades entre seis e sete meses, de raça Híbrida.

Foram analisados ejaculados de oito machos, para a coleta do sêmen. Utilizou-se a técnica de mão enluvada descrita por PoulHyttel, Fred SinowatzeMortenVejlsted, (2014), utilizando-se um copo térmico (36°C) para acondicionamento. Como critério de seleção, o ejaculado foi submetido a uma avaliação macroscópica, sendo avaliado pelo aspecto, cor e odor. Os ejaculados que apresentaram anormalidades na cor, odor ou aspecto, foram descartados, resultando na seleção de cinco ejaculados viáveis.

Cada ejaculado foi diluído com três diluentes diferentes, a fim de identificar distinções de efetividade entre os mesmos. Foi realizada a avaliação morfológica espermática, identificando se houve variação do espermatozoide, bem como a qualidade na motilidade dos mesmos.

Os diluentes utilizados foram: 1) Suidil[®], 2) Minutube[®] e 3) Minitube[®] com dose extra de antibiótico + 0,5ml por litro de Enrofloxacino 10%. Cada amostra foi preparada em um tubo eppendorf, com 810µl de diluente e 90µl de sêmen *in natura*.

Para a avaliação da motilidade, foram realizadas um total de cinco amostras para cada reprodutor, diluídas com os três diluentes e conservadas à 16°C, sendo as amostras analisadas em intervalos definidos como tempo 0:00horas, 24:00horas, 48:00horas, 120:00horas e 144:00horas.

A avaliação microscópica foi realizada mediante o emprego de câmaras de contagem no microscópio em objetiva de 10x, com o auxílio de sistema automatizado *Sperm Vision*[®], que disponibiliza resultados de motilidade espermática a partir do percentual de células móveis, bem como a visualização dos espermatozoides, para avaliação da morfologia espermática. As amostras e as câmaras de contagem foram aquecidas a 36°C, por 10 minutos, evitando a interferência de temperaturas inadequadas (TONIOLLI et al., 2015).

Os ejaculados foram identificados por módulos numéricos de seis dígitos, conforme relação de identidade privada dos suínos reprodutores utilizados no estudo.

Para observação da atividade antimicrobiana dos diluentes, foram realizados testes frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), adquiridos do American TypeCultureCollection (ATCC). Os microrganismos obtidos a partir das culturas estoque foram transferidos para tubos contendo ágar nutriente e mantidos a 37°C +/- 1°C,

por 24 horas, de modo a obter subculturas. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir das subculturas e mantidos em condições ótimas de crescimento para cada microrganismo por 24 horas.

Após o período de incubação, os inóculos foram ajustados, com auxílio de uma escala de turbidez de McFarland, de modo a apresentarem uma concentração aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. O meio de cultura empregado para a manutenção dos microrganismos e elaboração das subculturas foi o meio N° 1 de Grove-Randall, enquanto os inóculos foram preparados utilizando-se o meio N° 3 de Grove-Randall. As atividades antimicrobianas dos diluentes foram avaliadas separadamente, utilizando-se o método de difusão em ágar, como descrito por Schapovalet al. (1988). Alíquotas de 20 mL de meio N° 11 de Groove Randall, recém preparado, foram distribuídas em placas de Petri (20x100 mm). Porções de 5 mL de meio N° 11 contendo o inóculo bacteriano (0,5%) foram distribuídas diretamente sobre a superfície das placas obtidas.

As placas foram deixadas em repouso por 5 minutos e cilindros de vidro (sete por placa) foram distribuídos, com auxílio de pinça esterilizada, sobre a superfície das placas inoculadas. Volumes de 200 µL dos diluentes Suidil®, Minutube® e Minitube® com dose extra de antibiótico (Enrofloxacino 10%) foram aplicados em cinco cilindros de cada placa. Em todas as placas, dois dos cilindros foram usados como controle (200 µL de água). No centro de cada placa, um disco de papel contendo cloranfenicol (30µg) foi utilizado como controle positivo.

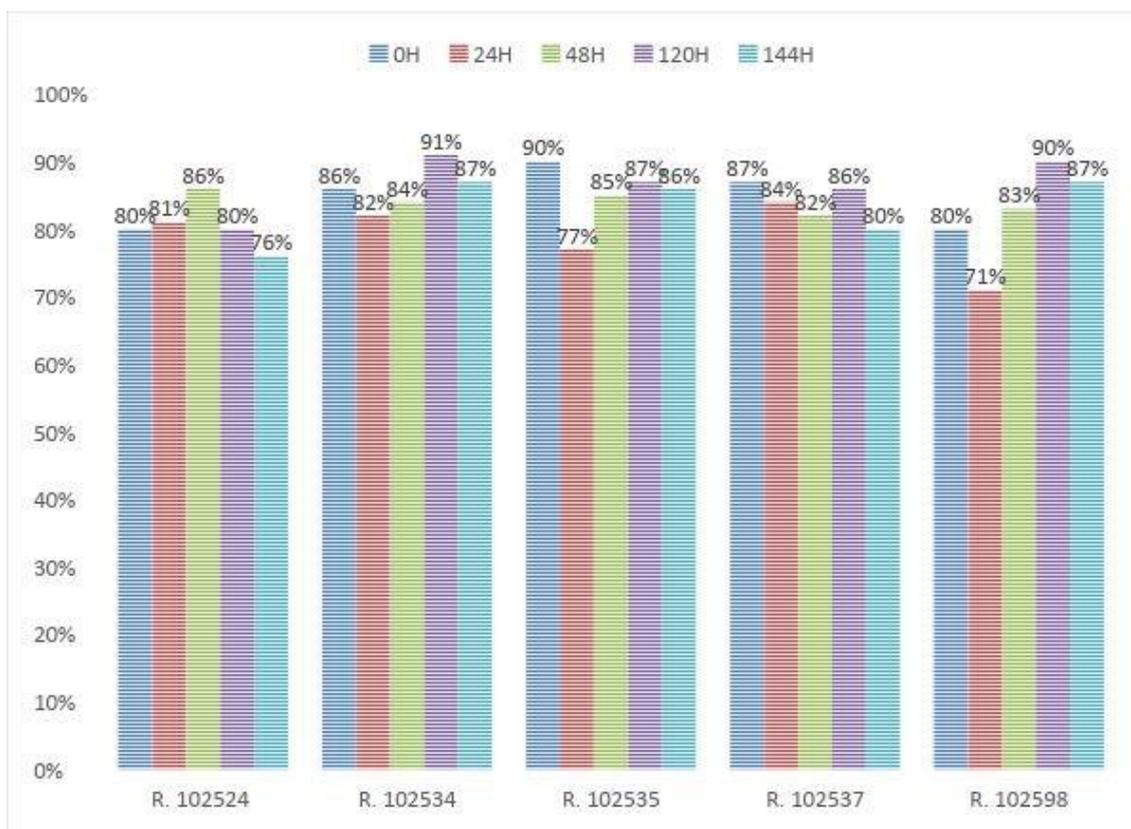
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia dos espermatozoides foi observada, levando-se em consideração os parâmetros descritos na literatura. Todos os ejaculados apresentaram morfologia espermática adequada aos padrões da normalidade.

O ejaculado do reprodutor **102535** apresentou espermatozoides com gota proximal, entretanto, encontra-se dentro dos padrões da normalidade, pois de acordo com Sergi Bonet(2000), a gota proximal pode aparecer nos casos em que o macho possui idade inferior a 12 meses. Este reprodutor precisa de um acompanhamento morfológico. Após 12 meses, persistindo a gota proximal, o reprodutor perde o status de reprodutor para inseminação, visto a consequente redução da taxa de fertilização.

Em relação à motilidade dos ejaculados, deve ser levada em consideração a idade dos reprodutores, mas pode-se dizer que houve diferenças entre os diluentes. Os resultados foram apresentados nas tabelas I, II e III.

GRÁFICO I – Resultados da motilidade espermática utilizando o diluente Minitube®.



Fonte: da autora.

O reprodutor **102524** apresentou espermatozoides com motilidade de 80% (0H); 81% (24H); 86% (48H); 80% (120H) e 76% (144H), demonstrando uma melhora, desde o momento da coleta até 48h. Após este período, é observado decréscimo, até as 144h.

O reprodutor **102534** apresentou espermatozoides com motilidade de 86% (0H); 82,00% (24H); 84% (48H); 91% (120H) e 87% (144H), demonstrando uma queda desde o momento da

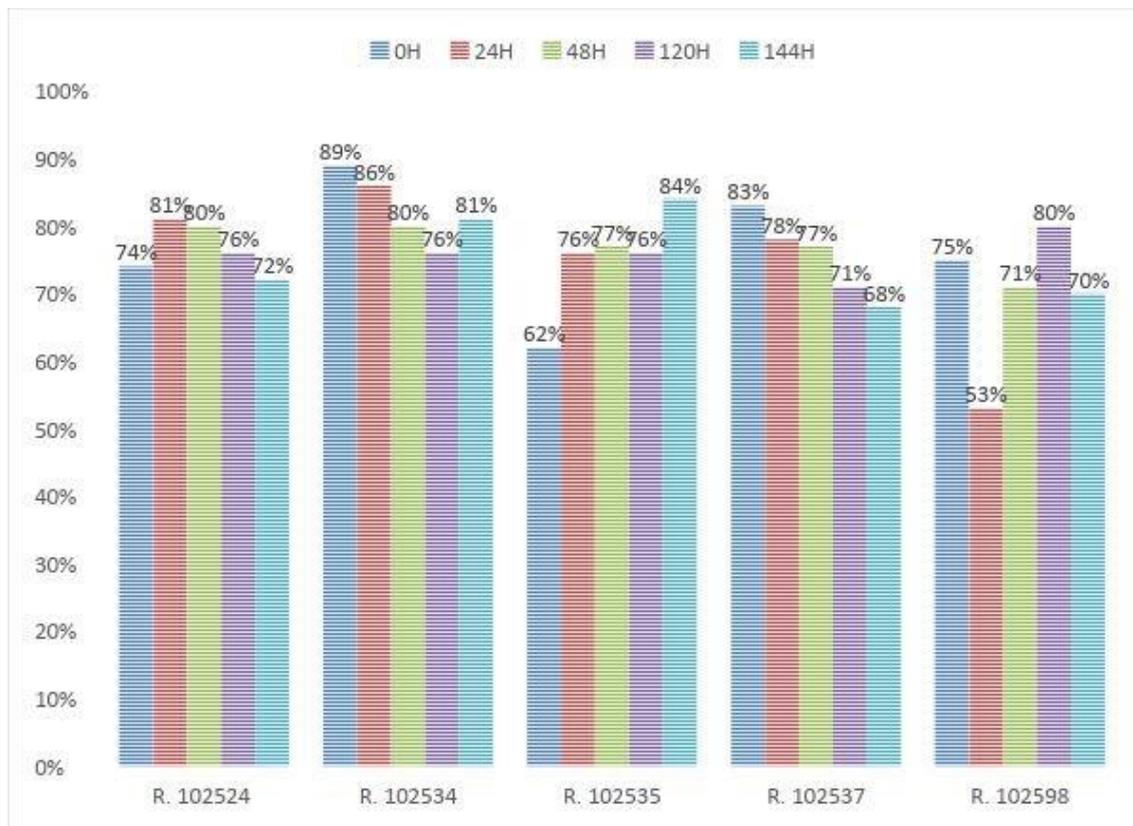
coleta até o dia seguinte, mas obteve um pico em 120h, onde voltou a apresentar importante queda, até 144h.

O reprodutor **102535** apresentou espermatozoides com motilidade de 90% (0H); 77% (24H); 85% (48H); 87% (120H) e 86% (144H), demonstrando uma queda desde o momento da coleta, até o dia seguinte. Entretanto, após 24h, houve uma melhora significativa do parâmetro avaliado, visto que, em 48h, houve alcance de módulo com expressão ascendente.

O reprodutor **102537** apresentou espermatozoides com motilidade de 87% (0H); 84% (24H); 82% (48H); 86% (120H) e 80% (144H), demonstrando valores de motilidade variáveis, visto que seus valores aumentam e diminuem sem um parâmetro fixo. Entretanto, ele manteve-se dentro de sua porcentagem de suficiência (de 80% a 89%).

O reprodutor **102598** apresentou espermatozoides com motilidade de 80% (0H); 71% (24H); 83% (48H); 90% (120H) e 87% (144H), demonstrando valores variáveis, também sem um parâmetro, embora tenha havido melhora significativa em 120h, tendendo à diminuição após este período.

GRÁFICO II – Resultado da motilidade espermática utilizando o diluente Suidil®.



Fonte: da autora.

O reprodutor **102524** apresentou espermatozoides com motilidade de 74% (0H); 81% (24H); 80% (48H); 76% (120H) e 72% (144H), demonstrando uma melhora desde a coleta até 120h, seguido de uma queda até 144h.

O reprodutor **102534** apresentou espermatozoides com motilidade de 89% (0H); 86% (24H); 80% (48H); 76% (120H) e 81% (144H), demonstrando uma queda gradual até 120h, seguido de um pico em 144h.

O reprodutor **102535** apresentou espermatozoides com motilidade de 62% (0H); 76% (24H); 77% (48H); 76% (120H) e 84% (144H), demonstrando uma melhora desde o momento da coleta até 144h, mostrando uma evolução, visto que 62% é um valor a baixo do esperado.

O reprodutor **102537** apresentou espermatozoides com motilidade de 83% (0H); 78% (24H); 77% (48H); 71% (120H) e 68% (144H), demonstrando uma queda gradativa desde a coleta até 144h.

O reprodutor **102598** apresentou espermatozoides com motilidade de 75% (0H); 53% (24H); 71% (48H); 80% (120H) e 70% (144H), demonstrando uma queda brusca 24h após a coleta, seguido de uma melhora em 48h e uma piora em 144h.

GRÁFICO III – Resultado da motilidade espermática utilizando o diluente Minutube® + antibiótico Enrofloxacino 10%.



Fonte: da autora.

O reprodutor **102524** apresentou espermatozoides com motilidade de 84% (0H); 74% (24H); 79% (48H); 76% (120H) e 67% (144H), demonstrando valores de motilidade variáveis, visto que seus valores aumentam e diminuem sem um parâmetro.

O reprodutor **102534** apresentou espermatozoides com motilidade de 92% (0H); 79% (24H); 90% (48H); 89% (120H) e 89% (144H), demonstrando uma queda em 24h, seguido de uma melhora significativa em 48h, outra queda em 120h, mas mantendo-se estável até 144h.

O reprodutor **102535** apresentou espermatozoides com motilidade de 90% (0H); 84% (24H); 84% (48H); 80% (120H) e 82% (144H), demonstrando valores de motilidade variáveis, com melhoras e pioras no decorrer dos dias.

O reprodutor **102537** apresentou espermatozoides com motilidade de 85% (0H); 78% (24H); 78% (48H); 83% (120H) e 81% (144H), demonstrando uma queda em 24h, mantendo-se estável até 48h, seguido de melhora em 120h e queda e, 144h.

O reprodutor **102598** apresentou espermatozoides com motilidade de 88% (0H); 65% (24H); 76% (48H); 85% (120H) e 84% (144H), demonstrando valores de motilidade variáveis, seguido de uma piora drástica em 24h, com uma melhora em 48h até 144h.

Referente a motilidade, a diferença entre os diluentes, apresentou mudanças não significativas. Estes apresentaram resultados muito semelhantes, porém pode-se dar uma atenção no período entre 0h à 48h nos três diluentes. De acordo com as tabelas apresentadas, os reprodutores 102524 e 102534 obtiveram melhores resultados com os diluentes Minitube® e Suidil®. O reprodutor 102535 obteve melhores resultados com o diluente Minitube®+ dose extra de antibiótico. Os reprodutores 102537 e 102598 obtiveram melhores resultados com o diluente Minitube.

Os dados ratificam as observações de Fávero et al (2003), que reporta que a inseminação deve acontecer durante o período de cio da fêmea, sendo que podem ser realizadas três inseminações por cio. A primeira dose deve acontecer 12 horas após a fêmea aceitar o macho, indicando que poderia ser realizada a monta. A segunda deve ser realizada até 24 horas após a primeira e, caso a porca ainda esteja aceitando o macho, a terceira precisa ser realizada 12 horas após

a segunda dose. Deste modo, o espermatozoide precisa estar com motilidade alta entre o período de 12h à 48h, para garantir uma fecundação.

A análise dos resultados de atividade antimicrobiana dos diluentes demonstrou que somente o diluente Minitube® com dose extra de antibiótico Enrofloxacino apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*, em qualquer diluição empregada.

CONCLUSÃO

Em referência a motilidade de espermatozoides de suínos, considerando a porcentagem de atividade adequada para uso do diluente, os diluentes Minitube e Suidil apresentam resultados mais satisfatórios nas primeiras 48 horas, indicando a não necessidade do uso de uma dose de antibiótico no diluente Minitube®.

A atividade antimicrobiana dos diluentes apresenta suficiência em qualquer diluição empregada, quando na adição de antimicrobianos. Cabe ressaltar que as boas práticas de manuseio e assepsia adotadas contribuem para a minimização no emprego de antimicrobianos nos diluentes, melhorando dados de garantia da qualidade do sêmen de suíno quanto a viabilidade global e a motilidade particular dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

ABCS. **Produção de Suínos: Teoria e Prática**. Brasília: ABCS; Integrall Soluções em Produção Animal. v.1, p. 1-908p, 2014.

BARROS, et al. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.164 - 170, 2013.

BATISTA, F. et al. Influência da contaminação bacteriana sobre os parâmetros espermáticos de suínos e perfil de resistência dos agentes isolados. **Archives of Veterinary Science**. v.17, n.4, p.27-33, 2012.

BONET, S. **Morfologia espermática en porcí**. Institut d'Estudis Catalans: Barcelona, 2000. E-book. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?isbn=8472835332>>. Acesso em: 11 out. 2017.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, p. 17-32, 2005.

FÁVERO, J. A. et al. **Produção Suínos**: Manejo da produção. Embrapa Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/suinos/manejoprodu.html>>. Acesso em 31 out. 2017.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. E-book. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?isbn=853526518X>>. Acesso em: 10 out. 2017.

SCHAPOVAL, E. E. S., ALICE, C. B.; SILVA, G. A. B. E.; HENRIQUES, A. T., 1988. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Sizygiumcumini*. Revista Portuguesa de Farmácia. 38 (4), 55-57.

TONIOLLI, R. et al. Uso do diluente BTS no processo de congelação dosêmen suíno: II. modificações na técnica. **Ciência Animal**. v. 25, n. 4, p. 44-59, 2015.

Artigo normalizado conforme as regras do periódico BrazilianJournalofPharmaceuticalSciences (BJPS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), para fins de posterior submissão em língua inglesa.