

2,4 DINITROFENOL: ENSAIO DE TOXICIDADE EM SÊMEN SUÍNO

TAINÃ F. CARDOSO¹; ESTELA F. E SILVA^{1*}; ANTONIO SERGIO VARELA JR¹;
FRANCIELI M. STEFANELLO²; PATHISE S. OLIVEIRA²; CARINE DAHL CORCINI³

¹Universidade Federal do Rio Grande – star.fs@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas- ReproPEL – corcincid@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O resfriamento de sêmen suíno entre 15 e 18° C é uma tecnologia largamente empregada na maioria das granjas tecnificadas, por auxiliar nas inseminações artificiais (ANTUNES, 2007). Porém, a viabilidade celular diminui com o tempo de armazenamento (MURGAS et al., 2002), tendo as espécies reativas de oxigênio (ERO) extenso envolvimento nessa perda de viabilidade (FOOTE et al., 2002).

Sabe-se que as mitocôndrias são fundamentais para a produção de energia espermática na forma de adenosina tri fosfato (ATP), contudo são o principal sítio da produção de ERO (Yao, et al., 2000). Assim, a fim de aumentar a sobrevivência espermática, a interferência nas mitocôndrias seria uma estratégia de destaque para diminuir o estresse oxidativo gerado pelo excesso de ERO. O agente desacoplador 2,4 dinitrofenol (DNP) permite que os prótons atravessem a membrana mitocondrial interna de modo não acoplado à fosforilação oxidativa, o que resulta em aumento no transporte de elétrons e nas taxas de consumo de oxigênio (HARPER et al., 2001). Baixas concentrações gerariam um desacoplamento suave, capaz de diminuir as ERO mitocondriais dramaticamente por mecanismos diversos (SKULACHEV, 1998). Contudo, concentrações elevadas gerariam toxicidade, comprometendo a sobrevivência espermática pela queda drástica na geração de ATP.

Logo, torna-se fundamental determinar concentrações não tóxicas de DNP para espermatozoides suínos, pois aparentemente não existem trabalhos publicados acerca dessa concentração ideal. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do 2,4 dinitrofenol sobre a motilidade de espermatozoides suínos resfriados a 17°C por 96 horas.

2. METODOLOGIA

O sêmen foi coletado, pela técnica da mão enluvada, de nove machos suínos da raça landrace. Posteriormente, avaliou-se a motilidade espermática, porcentagem de células móveis, em lâmina sob lamínula aquecida a 37 °C em microscopia óptica em aumento de 200x (CBRA, 1998) para obtenção dos parâmetros à fresco. Em seguida um volume de 15 mL de ejaculado de cada macho foi centrifugado a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido nos diferentes tratamentos: Con (apenas *Beltsville Thawing Solution* - BTS); T1 (0,01µM de DNP em BTS); T2 (0,1µM de DNP em BTS); T3 (1,0 µM de DNP em BTS) e T4 (10µM de DNP em BTS). Após a diluição nos tratamentos as amostras foram armazenadas em caixa térmica a 17°C por até 96 horas. A motilidade espermática foi avaliada a cada 24 horas, sendo os tratamentos aquecidos a 37°C por 10 min antes da avaliação. Para cada tratamento houveram nove repetições, as médias

foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e todas as análises realizadas no software STATISTIX 9.0 (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os machos avaliados apresentaram motilidade entre 70 e 80% à fresco, valores ideais segundo o padrão estabelecido para a espécie (CBRA, 1998). Desse modo, os ejaculados apresentavam qualidade para compor o experimento de toxicidade (Tab. 1).

Tabela 1 – Motilidade do Sêmen suíno fresco

Macho	Motilidade (%)
1	80
2	80
3	80
4	70
5	80
6	70
7	80
8	80
9	70

Para o sêmen resfriado à 17 °C, independente do tempo de armazenamento não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre as diferentes concentrações de DNP e o controle (Tab. 2).

Tabela 2 – Motilidade do sêmen suíno em diferentes tempos de armazenamento à 17°C: Média e Desvio Padrão. N= 9 para cada tratamento

Tratamento	24h	48h	72h	96h
Con	74,4 ± 5,2	71,1 ± 6,0	60,0 ± 11,1	42,2 ± 13,0
T1	72,2 ± 9,7	71,1 ± 6,0	60,0 ± 11,1	42,2 ± 13,0
T2	74,4 ± 5,2	70,0 ± 7,0	60,0 ± 10,0	42,2 ± 10,9
T3	72,2 ± 8,3	67,7 ± 12,0	58,8 ± 11,6	37,7 ± 16,4
T4	72,2 ± 6,6	68,8 ± 11,6	58,8 ± 9,2	38,8 ± 9,2

Tratamentos: Con (apenas BTS); T1 (0,01µM de DNP em BTS); T2 (0,1µM de DNP em BTS); T3 (1,0 µM de DNP em BTS) e T4 (10µM de DNP em BTS). As médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($P>0,05$)

Nota-se um decréscimo da qualidade espermática com o passar do tempo, o que era esperado, por ser um fenômeno descrito na literatura. Murgas et al., (2002) relatou a perda de qualidade espermática em suínos a partir de 72h de armazenamento independente do diluente utilizado. Contudo, mesmo nas amostras com menor motilidade (em 96h) os tratamentos contendo DNP não diferiram do controle, reforçando que o mesmo não exerceu toxicidade sobre os espermatozóides suínos.

Esse estudo tem importância pelo fato de demonstrar o papel do DNP sobre espermatozoides suínos resfriados, uma vez que aparentemente o composto foi avaliado apenas em blastocistos da espécie (MACHÁTY et al., 2001). Além disso, os resultados foram promissores, pois demonstram a viabilidade de utilização do DNP como aditivo do resfriamento de sêmen, podendo ser aplicado em um estudo mais extenso, avaliando além da motilidade outros parâmetros de qualidade espermática como, por exemplo, a funcionalidade mitocondrial, por serem nessas organelas o sítio de ação do DNP.

4. CONCLUSÃO

Todas as concentrações de DNP testadas não apresentaram toxicidade ao sêmen suíno em relação ao controle, independente do tempo de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES R. C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, , p.60-63, 2007.

CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim Reprod Sci.** v. 71, p.13–23, 2002.

HARPER, J.A.; DICKINSON, K.; BRAND, M.D. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. **Obes Rev.** v.2, p.255–65, 2001.

MACHÁTY, Z.; THOMPSON, J.G.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. **Mol Reprod Dev.** v. 58, p. 39-44, 2001.

MURGAS, L. D. S. et al. Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado a 15 °C. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 3, p. 33-40, 2002.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta** v.1363, p. 100–24, 1998.

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.F., EMERSON, C.J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout *Macrozoarces americanus* L. sperm after cryopreservation. **Aquaculture.** v. 181, p.361–375, 2000.