

CONSERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO EM TEMPERATURAS DIFERENTES, UTILIZANDO 2,4 DINITROFENOL.

YARA TAYANA ANDRIOLA¹; ESTELA FERNANDES E SILVA²; GEÓRGIA DA
CRUZ TAVAREZ¹, VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA¹, CARINE DAHL
CORCINI³

¹UFPEL – yaratayana@hotmail.com

²FURG – star.fs@hotmail.com

³UFPEL – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Comparado a outras espécies, os suínos possuem espermatozoides mais sensíveis a flutuações de temperaturas devido à porcentagem maior de lipídeos e proteínas da membrana espermática (CASTAGNA et al., 2001). O diluente usado para conservar o sêmen é de suma importância para garantir que as células espermáticas vão continuar viáveis durante o resfriamento, sendo que este deve possuir diversas funções como aumentar o volume do ejaculado, controlar pH, inibir o desenvolvimento bacteriano, manter o balanço osmótico, fornecer nutrientes para produção de energia e proteger os espermatozoides contra o choque térmico (KARABINUS et al., 1997).

O diluente mais utilizado para conservação de sêmen suíno é o *Beltsville Thawing Solution* (BTS), que é capaz de manter a viabilidade espermática por até três dias (MURGAS et al., 2002), mas devido ao crescente aprimoramento de biotecnias reprodutivas na suinocultura, é necessário o desenvolvimento de técnicas e soluções que permitam a utilização do sêmen em temperatura ambiente e refrigerado por longos períodos, sem quedas nos resultados de fertilidade das células espermáticas (CORRÊA et al., 2001).

Uma maneira de prolongar o tempo de armazenamento do sêmen é a adição de compostos que possam diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS) e conseqüentemente diminuir o estresse oxidativo que está relacionado à perda de capacidade fertilizante espermática durante o armazenamento. Nesse contexto, compostos que ajam sobre as mitocôndrias, como 2,4 dinitrofenol (DNP) são promissores para o prolongamento da viabilidade seminal, uma vez que estas organelas são a principal fonte produtora de ROS nas células.

O 2,4 dinitrofenol (DNP) é um composto orgânico, ligeiramente solúvel em água (USEPA, 1993), que em altas concentrações pode ser tóxico para os seres humanos (DE FELICE e FERRERIRA, 2006). Entretanto, estudos recentes demonstram que em baixas concentrações (ordem de micromolares) o DNP possui efeito benéfico como a prevenção da degeneração neural pela atuação como desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial, acelerando assim a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e diminuindo a formação de ROS (WASILEWSKA-SAMPAIO et al., 2005; BRAND, 2000). Assim, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do diluente BTS contendo diferentes concentrações do 2,4 dinitrofenol sobre a motilidade de espermatozoides suínos refrigerados a 15°C ou mantidos a temperatura ambiente por até 72 horas.

2. METODOLOGIA

Foi realizada coleta do ejaculado de dois machos suínos, pelo método da mão enluvada, sendo realizadas cinco rotinas de coleta. O ejaculado foi diluído, na proporção 1:1, em meio BTS com diferentes concentração de DNP. Os tratamentos foram divididos em: Controle (somente BTS), T1 (BTS + 10 μM de DNP), T2 (BTS + 1 μM de DNP), T3 (BTS + 0,1 μM de DNP) e T4 (BTS + 0,01 μM de DNP). Após a diluição um grupo de amostras foi armazenadas em temperatura ambiente (22°C) enquanto outro grupo de amostras foi refrigerado a 15°C por até 72 horas. A motilidade espermática foi avaliada em lâmina sob lamínula aquecida a 37°C em microscopia óptica em aumento de 200x (CBRA, 1998) a cada 24 horas, sendo 1 mL dos tratamentos aquecidos a 37°C por 10 min. Os resultados foram então comparados no software STATISTIX 9.0 (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até 24h de armazenamento em ambas as temperaturas não houve diferença estatística entre os tratamentos contendo DNP e o controle (vertical). Além disso, em ambas temperaturas, ambiente (22°C) e refrigerada (15°C), não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na motilidade espermática nas primeiras 24 horas. Porém nas 48 e 72 horas, a queda da motilidade foi estatisticamente significativa (Tabela 1) (horizontal).

Tabela 1: Motilidade espermática suína avaliada até 72 horas após a conservação em temperaturas de 15°C e 22°C, com diferentes concentrações de 2,4 dinitrofenol no diluente.

Tratamento	Temperatura °C	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	15	66 ^A ± 6,9	49 ^A ± 6,2	44 ^{ABC} ± 3,8	27 ^{ABC} ± 4,5
T1	15	64 ^A ± 6,9	55 ^A ± 6,2	45 ^{AB} ± 3,8	28 ^{ABC} ± 4,5
T2	15	66 ^A ± 6,9	57 ^A ± 6,2	51 ^A ± 3,8	34 ^A ± 4,5
T3	15	66 ^A ± 6,9	58 ^A ± 6,2	43 ^{ABCDE} ± 3,8	31 ^{AB} ± 4,5
T4	15	66 ^A ± 6,9	62 ^A ± 6,2	48 ^{AB} ± 3,8	30 ^{ABC} ± 4,5
Controle	22	67 ^A ± 6,9	47 ^A ± 6,2	31 ^{CDE} ± 3,8	16 ^{CD} ± 4,5
T1	22	65 ^A ± 6,9	48 ^A ± 6,2	21 ^E ± 3,8	10 ^D ± 4,5
T2	22	63 ^A ± 6,9	51 ^A ± 6,2	27 ^E ± 3,8	12 ^D ± 4,5
T3	22	67 ^A ± 6,9	56 ^A ± 6,2	30 ^{DE} ± 3,8	15 ^{CD} ± 4,5
T4	22	63 ^A ± 6,9	52 ^A ± 6,2	32 ^{CDE} ± 3,8	19 ^{BCD} ± 4,5

Controle: BTS, T1: BTS + 10 μM DNP, T2: BTS + 1 μM DNP, T3: BTS + 0,1 μM DNP, T4: BTS + 0,01 μM DNP.

^{A, B, C, D} Letras distintas nas colunas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O decréscimo da qualidade espermática com o passar do tempo corrobora com MURGAS et al., (2002) que havia descrito, uma queda na motilidade do sêmen suíno a partir das 72 horas de armazenamento, independente do diluente utilizado. Contudo a qualidade seminal das amostras à temperatura ambiente foi semelhante estatisticamente às amostras da temperatura refrigerada, o que demonstraria ser um bom método para conservação seminal sem a necessidade de sistemas de refrigeração, o que poderia diminuir os custos de produção.

Estes resultados também tem importância pelo fato de demonstrar o papel do DNP sobre o espermatozoide suíno, uma vez que este substrato só foi avaliado em blastocistos da espécie (MACHÁTY et al., 2001). E os resultados foram promissores em relação à manutenção do sêmen com a presença do DNP em temperatura ambiente (22°C), podendo ser efetuado novos estudos avaliando não somente a motilidade, mas outros parâmetros que indicam a qualidade espermática, como por exemplo a integridade de membrana, a funcionalidade mitocondrial, entre outros.

4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos pode-se verificar que a adição do DNP no diluente de sêmen suíno não prejudica a funcionalidade espermática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAND, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 811 – 820, 2000.

CASTAGNA, C. D.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Estratégias de inseminação artificial na suinocultura moderna. In: **X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Anais. Porto Alegre-RS, v. 1, p.143- 150, 2001.

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

CORRÊA M. N.; MEINCKE W.; LUCIA JR. T.; DESCHAMPS J. C. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 181p, 2001.

DE FELICE, F.G.; FERREIRA, S.T. **Novel Neuroprotective, Neuritogenic and Anti-amyloidogenic Properties of 2,4-Dinitrophenol: The Gentle Face of Janus Life**, v.58, p. 185 – 191, 2006.

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 549-555, 1997.

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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 39-44, 2001.

MURGAS, L.D.S.; ZANGERÔNIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O.; OLIVEIRA, S.L. Oxitocina no sêmen suíno heterospérmico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**. v.3, p. 33-40, 2002.

Statistix® 2008. **Statistix® 8 Analytical Software**. User's manual. Tallahassee. 396 p.

WASILEWSKA-SAMPAIO, A. P.; SILVEIRA, M. S.; HOLUB, O.; GOECKING, R.; GOMES, F. C. A.; MOURA NETO, V.; LINDEN, R.; FERREIRA, S. T.; DE FELICE, F. G. **Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound**. *FASEB J.*, v. 19,p. 1627 – 1636, 2005.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. Assessment Tools for the Evaluation of Risk (ASTER, online database). **Environmental Research Laboratory**, Duluth, MN. 1993.