

**MOTILIDADE, VIGOR E MORFOLOGIA ESPERMÁTICAS DE SÊMEN SUÍNO  
DESCONGELADO ADICIONADO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA  
APÓS O DESCONGELAMENTO**

DAIANE MOREIRA SILVA<sup>1</sup>, MÁRCIO GILBERTO ZANGERONIMO<sup>2</sup>, LUIS DAVID SOLIS MURGAS<sup>3</sup>, BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA<sup>4</sup>, LUIZ GUSTAVO PESSOA ROCHA<sup>5</sup>, BRUNO GENEROSO FARIA<sup>6</sup>

**RESUMO**

No mês de julho de 2010 foi realizado um experimento no Departamento de Medicina Veterinária, o qual utilizou sete reprodutores suínos. Foram adicionados diferentes níveis de cafeína ao sêmen descongelado a fim de observar se essa substância seria capaz de melhorar os principais parâmetros seminais. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a motilidade, o vigor e a morfologia espermática do sêmen suíno descongelado após a adição de cafeína. O ejaculado de cada um dos sete reprodutores foi submetido à avaliação inicial e após esse processo o sêmen foi congelado e posteriormente descongelado em banho-maria a 50°C por 8 segundos, em seguida, acrescentaram-se as concentrações de cafeína. Nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação a 37°C, foram avaliados a motilidade, o vigor e a morfologia espermática. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para os parâmetros seminais estudados de acordo com as diferentes concentrações de cafeína. Sendo assim, concluiu-se que a adição de cafeína ao sêmen suíno descongelado não influenciou a motilidade, o vigor e a morfologia espermática.

**Palavras-chave:** reprodutor; acrossoma; criopreservação; adenosina monofosfato cíclico; diluidores

**INTRODUÇÃO**

A suinocultura brasileira vive um momento de expansão de mercado. Essa mudança estrutural no setor está exigindo animais com elevada eficiência reprodutiva, sanitária e alimentar, associada a uma excelente qualidade de carne (DESCHAMPS et al., 2000). Para melhorar o desempenho reprodutivo de uma granja, e com isso reduzir os gastos, a inseminação artificial torna-se indispensável. Porém, a dificuldade de conservação do sêmen suíno por períodos prolongados, sem alterar sua capacidade fecundante, corresponde a uma limitação da expansão da técnica (LIMA et al., 2007). Os espermatozoides suínos são muito sensíveis ao choque de temperatura, apresentando alterações negativas sobre a integridade de membrana das células e a baixa motilidade após o descongelamento. Sendo assim, estão sendo estudados novos métodos de criopreservação do sêmen suíno e soluções crioprotetoras formuladas com substâncias que minimizem os efeitos deletérios das baixas temperaturas sobre o espermatozoide. A cafeína atua inibindo a enzima fosfodiesterase, responsável pela quebra da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), desencadeando um aumento na concentração de AMPc espermático permitindo que o metabolismo energético dos espermatozoides se eleve (JIANG et al., 1984). Aumentar a concentração de energia no interior da célula espermática é importante visto que a queda da fertilidade do sêmen congelado ocorre devido ao desgaste energético (CHULAVATNATOL & TREETIPATIT, 1983; MORISAWA et al., 1983). O objetivo deste trabalho foi avaliar a motilidade, o vigor e a morfologia espermática do sêmen suíno descongelado após a adição de cafeína.

**MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no mês de julho de 2010 e foram utilizados sete reprodutores, sendo quatro da genética AGROCERES PIC 337 Superior provenientes da Fazenda São Paulo (Oliveira - MG), dois da genética TOPIGS Tempo 20+ e um da genética TOPIGS Tempo, sendo os três últimos pertencentes ao Centro Experimental de Suínos da UFLA (Lavras - MG). O delineamento experimental foi em blocos casualizados (animais experimentais) com cinco tratamentos

<sup>1</sup>Doutoranda em Zootecnia, DZO/UFLA; daianemoreira@hotmail.com

<sup>2</sup>Professor do DMV/UFLA; zangeronimo@dmv.ufla.br

<sup>3</sup>Professor do DMV/UFLA; lsmurgas@ufla.br

<sup>4</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, UFLA, barbaraap@hotmail.com.br

<sup>5</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFLA, lgvtp@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFLA, brunofaria13@hotmail.com

(concentrações de cafeína) em parcela subdividida no tempo (tempos de avaliação após o descongelamento) com oito repetições (ejaculados). Após a coleta do ejaculado, sendo um de cada animal excetuando o animal da linhagem Tempo, do qual coletou-se dois ejaculados, o sêmen foi encaminhado para o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA, sendo mantido a 37°C em banho-maria para que fossem realizadas avaliações do sêmen *in natura*. Após a avaliação inicial, o sêmen foi congelado de acordo com a metodologia proposta por Westendorf et al. (1975) e posteriormente, descongelado em banho-maria a 50°C por 8 segundos. Cinco alíquotas do sêmen descongelado foram diluídas em diluidor BTS contendo diferentes concentrações de cafeína (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mM) e incubados a 37°C. Nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação, uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas foi observada em microscópio óptico com aumento de 100x para averiguar a motilidade e o vigor espermáticos. Foi determinado o percentual de células espermáticas móveis (motilidade) e a força de movimento dos espermatozoides (vigor), recebendo pontuação de zero a cinco. Nos tempos de incubação 0 e 120 minutos foi retirado 0,8ml de sêmen que foi colocado em 1,0 ml de formol-citrato, sendo que uma gota dessa solução entre lâmina e lamínula foi observada em microscopia de contraste de fases com aumento de 1000x para que fosse realizada a avaliação da morfologia espermática. Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico (qui-quadrado) e as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Todo o procedimento estatístico foi realizado utilizando o programa estatístico SAS (1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à motilidade e vigor espermáticos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Motilidade (%) e vigor espermático do sêmen suíno descongelado em diferentes tempos de incubação após a adição de cafeína

Tempo (min)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
	<i>Motilidade espermática<sup>1</sup></i>					
0	34,4 a	28,1 a	28,8 a	38,8 a	21,9 a	30,4
30	21,3 b	17,5 b	17,5 b	20,6 b	12,5 b	17,9
60	10,0 c	8,1 c	11,9 b	13,1 c	6,3 bc	9,9
90	2,5 c	2,5 c	3,8 c	5,6 d	4,4 c	3,8
120	0,6 c	0,6 c	1,3 c	1,3 d	0,6 c	0,9
Média	13,8	11,4	12,6	15,9	9,1	
P =	0,0000					
	<i>Vigor espermático<sup>1</sup></i>					
0	3,00	3,13	3,63	3,75	3,88	3,48 a
30	2,63	2,75	2,75	3,50	3,63	3,05 a
60	1,50	1,50	1,63	2,00	0,75	1,48 b
90	0,38	0,50	0,75	1,00	0,63	0,65 c
120	0,13	0,13	0,25	0,38	0,25	0,23 c
Média	1,53	1,60	1,80	2,13	1,83	
P =	0,0000					

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05)

Pode-se observar que a cafeína não foi capaz de exercer efeito sobre a motilidade do sêmen suíno, sendo que esse parâmetro seminal apresentou queda com o passar do tempo. Houve queda do vigor espermático à medida que se aumentou o tempo de incubação (P<0,05). Entretanto o vigor foi mantido constante nos primeiros 30 minutos de incubação. A atividade cinética dos espermatozoides produz resíduos metabólicos oxidantes que são tóxicos para as células um fenômeno conhecido como estresse oxidativo (WILDE et. al., 2004). A produção desses resíduos é um dos principais fatores que comprometem a motilidade e o vigor espermáticos, desencadeando uma redução progressiva desses parâmetros seminais.

Os resultados obtidos para os parâmetros morfológicos espermática estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Morfologia espermática (%) do sêmen suíno descongelado em diferentes tempos de incubação após a adição de cafeína

Tempo (minutos)	Cafeína (mM)					Média	P
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0		
<i>Total de alterações morfológicas</i>							
0	16,3	17	17,3	17,9	17,9	17,3 a	Cafeína 0,5823 Tempo 0,0003 C*T 0,6950
120	20,4	21,6	18,4	19,5	21,9	20,4 b	
Média	18,3	19,3	17,8	18,7	19,9		
CV (%)	9,24						
<i>Alterações de cauda<sup>1</sup></i>							
0	5,13	5,25	3,63	4	3,25	4,25	
120	4	5	3,13	4,5	4,5	4,23	
Média	4,56	5,13	3,38	4,25	3,88		
CV (%)	0,9291						
<i>Alterações de cabeça<sup>1</sup></i>							
0	0,38	1,13	1,13	0,63	1,13	0,88	
120	0,88	2	0,88	0,63	1,25	1,13	
Média	0,63	1,56	1	0,63	1,19		
CV (%)	0,4804						
<i>Alterações de acrossoma<sup>1</sup></i>							
0	9,63	9,88	11,25	11,88	12,5	11,03	
120	13,5	13,13	12,13	13	14,25	13,2	
Média	11,56	11,5	11,69	12,44	13,38		
CV (%)	0,9003						
<i>Alterações de peça intermediária<sup>1</sup></i>							
0	0,25	1,38	0,38	0,25	0,38	0,53	
120	0,5	0,25	0,88	0,63	0,88	0,63	
Média	0,38	0,81	0,63	0,44	0,63		
CV (%)	0,6758						
<i>Presença de gota citoplasmática proximal<sup>1</sup></i>							
0	0,63	0,5	0,63	1,13	0,5	0,68	
120	0,25	1,5	1,25	0,88	0,88	0,95	
Média	0,44	1	0,94	1	0,69		
CV (%)	0,3017						

<sup>1</sup>Não significativo ao teste qui-quadrado (P>0,05)

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de diferente letras diferem pelo teste F (P<0,05)

Não houve diferença (P>0,05) para os parâmetros morfológicos estudados de acordo com as diferentes concentrações de cafeína. Para o total de anormalidades morfológicas, houve aumento (P<0,05) com o passar do tempo. A elevada ocorrência de alterações morfológicas, principalmente defeitos de acrossoma, pode ser explicada devido à alta sensibilidade do sêmen suíno a baixas temperaturas. Essa fragilidade de membrana pode ser devido às mudanças estruturais e funcionais dos

espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento (ANTUNES 2007). A principal diferença estrutural que a célula espermática suína apresenta é a menor quantidade e distribuição assimétrica de moléculas de colesterol na membrana celular (PAULENZ et al., 1999). Quando o espermatozoide suíno sofre com o choque de temperatura ocorre um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüente perda de cátions e enzimas através da mesma (JOHNSON et al., 2000). Em estudos com sêmen de bovino congelado a cafeína não foi eficaz, entretanto o uso de 10 mM de cafeína na diluição prévia à criopreservação trouxe resultados positivos (WILDE et al., 1996 citado por WILDE et. al.; 2004).

## CONCLUSÕES

A adição de cafeína ao sêmen suíno descongelado não influenciou a motilidade, o vigor e a morfologia espermática. O tempo teve efeito negativo sobre a motilidade, o vigor e a morfologia espermática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, R. C.; Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.60-63, jan./mar. 2007

CHULAVATNATOL, M.; TREETIPSATIT, N. Initiation of sperm flagellar movement using rat demembrated sperm model: nucleotide specificities. In: ANDRÉ, J. (ed.). **The sperm cell. Hague, Martinus Nijhoff Publishers**, p. 364-367, 1983. Philadelphia, Harper e Row, p. 89-106, 1986.

DESCHAMPS, J.C., LUCIA JR. T., CORRÊA, M.N., MACEDO JR, M., RHEINGANTZ, M.G.T. Otimização da eficiência do processo de produção animal a partir do uso de biotécnicas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, 2000.

JIANG, C. S.; KILFEATHER, S. A.; PEARSON, R. M.; TURNER, P.; The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysine-theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. **Br J Clin Pharmacol**, 1984.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

LIMA, F. P.; MURGAS, L. D. S.; OLIVEIRA, S. L.; LIMA, D.; ALVARENGA, A. L. N.; FIALHO, E. T. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suíno. **Ciência e Agrotecnologia**, v3 1, n. 5, p. 1506-1511, 2007.

MORISAWA, M.; OKUNO, M.; MORISAWA, S. Direct evidence that cyclic AMP is na indispensable factor for initiation of sperm motility in salmonid fishes. In: ANDRÉ, J. (ed.). **The sperm cell. Fertilizing power, surface properties, motility, nucleus e acrossome, evolutionary aspects. Hague, Martinus Nijhoff Publishers**, p. 456, 1983.

PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; Kommisrud, E.; GREVLE I. S.; Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction Domestic Animals**, v. 34, p. 431-435, 1999.

SAS. SAS User's Manual, **Statistical Analyses System Institute**, Cary, NC, 1996.

WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch Tierarztl Wschr**, v. 82, p. 261-267, 1975.

WILDE, R. O.; DE LA VEGA, A. C.; CRUZ, M. L. Efeito da adição de cafeína e de lactato na motilidade do sêmen eqüino diluído em leite desnatado - glicose. **Zootecnia Tropical**, v.22, n.1, p. 101 -112, 2004.