

**MOTILIDADE E VIGOR DO SÊMEN SUÍNO DILUÍDO E RESFRIADO A 15°C
SUBMETIDO A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA**

MANUEL FERNANDO BOMBADILLA MENDEZ¹, LUIS DAVID SOLIS MURGAS², MÁRCIO
GILBERTO ZANGERONIMO³, DOUGLAS EVANGELISTA BRAGA⁴, EVANDRO CÉSAR
PEREIRA CUNHA⁵, BRUNA RESENDE CHAVES⁶

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o comportamento do sêmen suíno diluído no meio BTS (Beltsville Thawing Solution), acrescido de quatro diferentes concentrações de Cafeína (1,3,7, trimetil-2,6, dioxipurina) e armazenado à temperatura de 15°C. Foram avaliados parâmetros de motilidade e vigor, a 37 °C nos tempos de zero hora (após a diluição), 24, 48 e 72 horas. Não foi observado diferença ($P>0,05$) para os parâmetros avaliados com relação aos diferentes tempos de avaliação. Com relação à variável vigor, foi observado que a média foi superior quando adicionado cafeína ao sêmen em relação às amostras em que não foram adicionadas. Nas condições experimentais em que foi realizado esse ensaio, podemos concluir que existem evidências de que a cafeína pode influenciar na motilidade e vigor espermático após o resfriamento do sêmen suíno a 15°C.

Palavras-chaves: AMPc, Metabolismo espermático, Varrão

INTRODUÇÃO

Com o aumento do consumo da carne suína, existe a preocupação em melhorar práticas de manejo, nutrição e reprodução a fim de otimizar a produção suinícola. O setor reprodutivo de uma granja é essencial para o sucesso da produção de suínos. Sendo assim, a adição de substâncias ao sêmen suíno resfriado tem sido bastante estudada, objetivando a melhoria dos parâmetros seminais e consequentemente melhora nos índices reprodutivos de uma granja como um todo.

Uma das principais causas da queda na fertilidade de um sêmen suíno estocado é o desgaste energético dos seus espermatozoides (FORD & WAITES, 1986). Esse está diretamente relacionado à sua concentração interna de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (CHULAVATNATOL & TREETIPSATIT, 1983; SIMPSON & WHITE, 1987). Sabe-se que os nucleotídeos cíclicos são metabolizados pela enzima fosfodiesterase (Harper et al. 1982) e a adição de inibidores da fosfodiesterase, como a cafeína (1,3,7, trimetil-2,6, dioxipurina), ao sêmen, promove um aumento na concentração de AMPc espermático, elevando o metabolismo energético dos espermatozoides (GARBERS et al., 1971). Estes nucleotídeos cíclicos apresentam diversos efeitos em uma larga escala de sistemas biológicos, mas sua única função conhecida em células eucarióticas é a estimulação da fosforilação protéica por meio da ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc (ROSEN et al., 1975; CHULAVATNATOL & TREETIPSATIT, 1983). No espermatozoide, o aumento da concentração de AMPc promove a maturação espermática (GARBERS et al., 1971), estimula a motilidade e participa no processo de capacitação (MORTON & ALBAGLI, 197).

Neste sentido, os derivados da metilxantina (cafeína, teofilina, pentoxifilina) poderiam estimular a motilidade progressiva espermática pela inibição da adenosina cíclica 3"-5" monofosfato (AMP) fosfodiesterase levando a um aumento intracelular das concentrações de AMPc. Estas

¹Médico Veterinário, Mestrando em Ciências Veterinárias, DMV/ UFLA, manuelfernando82@yahoo.com

²Professor Associado, Departamento de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, ismurgas@ufla.br

³Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, zangeronimo@dmv.ufla.br

⁴Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, douglas_braga@yahoo.com.br

⁵Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, evandrocesar71@hotmail.com

⁶Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, DMV/UFLA, brunacxc@yahoo.com.br

substâncias evitam a degradação do AMPc e potencializam a ação dos agentes ativados ou não por este nucleotídeo (GOULART et al., 2004).

Considerando o exposto, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar o comportamento do sêmen suíno diluído nos meio BTS (Beltsville Thawing Solution), acrescido de quatro diferentes concentrações de Cafeína (1,3,7, trimetil-2,6, dioxipurina) através do exame físico e avaliação da motilidade e vigor do sêmen resfriado à 15°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dados coletados

O experimento foi realizado no Departamento de Medicina Veterinária (DMV) no setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras/MG, nos meses de julho e agosto de 2010. Foram utilizados 16 ejaculados obtidos de quatro reprodutores, de genética AGROCERES 337 Superior provenientes da Fazenda São Paulo, localizada no município de Oliveira/MG. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (níveis de cafeína – 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/100 mL) e 16 repetições, sendo os blocos constituídos pelos ejaculados. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições em fatorial 4X3 com parcelas subdivididas no tempo. A forma de coleta do sêmen dos reprodutores foi pelo método da mão enluvada, com auxílio de um manequim fixo, sendo o sêmen depositado em um béquer graduado, protegido por um recipiente isotérmico a temperatura de 35°C. Após a colheita, o sêmen foi diluído em BTS, obtendo-se doses inseminantes de 100 mL contendo três bilhões de espermatozóides cada, as quais foram armazenadas a 15°C em geladeira.

Às 0 hora (após a diluição), 24, 48 e 72 horas de armazenamento, oito alíquotas de 2,0 mL de sêmen foram retiradas, aquecidas a 37°C em banho-maria e adicionadas de diferentes quantidades de cafeína, sendo: 0; 0,5, 1,0 e 1,50 mg/100ml. Em seguida, avaliou-se a motilidade e o vigor espermático dos espermatozóides nos tempos 0, 24, 48 e 72h de diluição, após 5 minutos de incubação a 37°C. As análises foram realizadas através de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C e observada em microscópio óptico em aumento de 10X. Foi verificado o percentual de células espermáticas móveis (motilidade) na amostra e a força de movimento dos espermatozóides – vigor, recebendo pontuação de zero a cinco.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. Para atingir a normalidade, os dados de motilidade espermática, foram transformados pela opção raiz quadrada. Para vigor espermático, foi utilizada a estatística não paramétrica, sendo as médias comparadas pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à motilidade espermática estão apresentados na Tabela 1. Neste estudo, não houve diferença ($P>0,05$) para os diferentes níveis de cafeína adicionadas ao sêmen suíno diluído e armazenado a 15°C. Esta não diferença encontrada entre os diferentes níveis de cafeína adicionados pode ser explicado devido à alta qualidade que o sêmen apresentou desde o primeiro momento de avaliação. Também não houve diferença entre os três tempos de armazenamento ($P>0,05$), porém, encontrou-se regressão linear significativa ($P<0,05$) para os tempos de incubação, demonstrando uma queda da motilidade espermática com o passar do tempo de armazenamento. Esta queda da motilidade é esperada e fisiológica, haja visto que com o aumento do período de armazenamento, ocorre uma diminuição das reservas energéticas do espermatozóide armazenado e também uma redução do seu metabolismo, o que leva a uma menor capacidade de movimentação.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Tabela 1 – Motilidade espermática do sêmen suíno em função do tempo de armazenamento adicionado de cinco diferentes níveis de cafeína

Tempo de armazenamento (horas)	Cafeína (mg/100 mL)				Média	P		
	0,0	0,5	1,0	1,5		Cafeína	Tempo	C*T
<i>- Motilidade espermática (%) -</i>								
0	82,3	84,2	83,3	82,8	83,2 ¹	0,3452	0,0000	0,9995
24	73,1	73,8	73,8	73,4	73,5			
48	68,0	68,6	68,3	68,1	68,2			
72	63,4	64,7	63,8	63,8	63,9			
Média	71,7	72,8	72,3	72,0				
CV (%)	4,85							

¹Regressão linear significativa (P<0,05).

Uma análise importante a ser feita é que, apesar de não se ter encontrado diferenças entre os diferentes níveis de cafeína utilizados nos diversos tempos de avaliação, podemos observar que o sêmen manteve as suas características de motilidade alta e ótimas durante todo o período de avaliação. O que pode sugerir assim uma possível ação da cafeína no sentido de manter a viabilidade espermática por um período maior de armazenamento.

Os dados referentes ao vigor espermático estão apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que houve queda nos valores desta variável a medida que se aumentou o tempo de incubação (P<0,05). Da mesma forma que a motilidade, é esperado essa queda em virtude do desgaste metabólico energético dos espermatozoides durante o armazenamento.

Tabela 2 – Valores do vigor espermático em função do tempo de armazenamento do sêmen suíno adicionado de cinco diferentes níveis de cafeína

Tempo de armazenamento (horas)	Cafeína (mg/100 mL)				Média ¹	P		
	0,0	0,5	1,0	1,5		Cafeína	Tempo	C*T
<i>- Vigor espermático -</i>								
0	3,00	3,88	3,84	3,91	3,66 A	-	-	-
24	2,66	3,28	3,47	3,56	3,24 B			
48	2,78	3,31	3,38	3,41	3,22 B			
72	2,47	3,16	3,22	3,22	3,02 C			
Média ¹	2,73 b	3,41 a	3,48 a	3,52 a				
P =	0,0000							

¹Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste de Kruskal Wallis (P<0,05).

As médias de vigor obtidas com o acréscimo das diferentes concentrações de cafeína mostrou que a sua adição, não importa em que nível, aumentou a média do vigor espermático com relação as amostras em que não foram adicionadas a cafeína (P<0,05). Isto pode ter ocorrido devido ao aproveitamento de nutrientes energéticos pelos espermatozoides ao adicionar a cafeína, o que ocasionou um aumento principalmente no vigor das células espermáticas.

CONCLUSÃO

A adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado não interfere na motilidade espermática. Porém, as médias de vigor espermático com a adição dos três diferentes níveis de cafeína promoveu um aumento do vigor espermático no final das 72 horas de armazenamento do sêmen a 15°C. Existem evidências de que a cafeína pode influenciar a motilidade e vigor espermático após o resfriamento do sêmen suíno a 15°C. Mais estudos devem ser realizados com o intuito de comprovar realmente a eficácia ou não da adição de cafeína na dose de sêmen a ser utilizada na inseminação artificial.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

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.

FORD, W. C. L. & WAITES, G. M. H. Sperm maturation and the potential for contraceptive interference. In: ZATUCHNI, C. I.; GOLDSMITH, A.; SPIELER, J. M.; SCIARRA, J. J. (eds.). **Male contraception: advances and future prospects**. Philadelphia, Harper e Row, p. 89-106, 1986.

GARBERS, D. L.; LUST, W. D.; FIRST, N. L.; LARDY, H. A. Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. **Biochemistry**, v. 10, n. 10, p. 1825-1831, 1971.

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; McMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p. 112-122, 2004.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. 5 ed. São Paulo, Atheneu, p. 138, 1982.

MORTON, B. & ALBAGLI, L. Modification of hamster sperm adenylyl cyclase by capacitation "in vitro". **Biochememical And Biophysical Research Communications**, v. 50, p. 697-703, 1973.

ROSEN, O. M.; ERLICHMAN, J.; RUBIN, C. S. Molecular structure and characterization of bovine heart protein kinase. **Advantage Cyclic Nucleotide Research**, v. 5, p. 253-256, 1975.

SAS – Statistical Analysis System: system for Windows [computer program]. Version 6.12. Cary (NC): SAS; 1996.

SIMPSON, A. M. & WHITE, I. G. Interrelationships between motility, cAMP, respiration and calcium uptake of ram and boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 15, p. 189-207, 1987.