

2,4 DNP NA CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

NATHÁLIA W. KNABAH¹; YARA T. ANDRIOLA²; RAFAEL B. MIELKE²; GEÓRGIA DA C. TAVARES²; ESTELA F. E SILVA⁴; CARINE D. CORCINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – nathaliaknabah@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS

³Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, REPROPEL – Pelotas/RS – corcincd@gmail.com

⁴Instituto de Ciências Biológicas – ICB/FURG - Rio Grande/RS

1. INTRODUÇÃO

Os suínos quando comparados a outras espécies possuem espermatozoides mais sensíveis a flutuações de temperaturas devido à maior porcentagem de lipídeos e proteínas da membrana espermática (CASTAGNA et al., 2001). O diluente utilizado para conservação do sêmen possui extrema importância na manutenção da viabilidade dos espermatozoides durante o resfriamento, atuando em pontos como: aumentar o volume de ejaculado, manter o pH ideal para as células, atuar como antimicrobiano, manter o balanço osmótico, ser fonte de nutrientes durante a produção de energética da célula e proteger os espermatozoides contra o choque térmico (KARABINUS et al., 1997).

O diluente mais utilizado para conservação de sêmen suíno é o *Beltville Thawing Solution* (BTS), sendo capaz de manter a viabilidade espermática por até três dias (MURGAS et al., 2002), porém tem se tornado necessário o desenvolvimento de técnicas e soluções que possibilitem a utilização do sêmen tanto em temperatura ambiente quanto refrigerado por longos períodos, principalmente devido ao crescente aprimoramento de biotecnias reprodutivas na suinocultura, buscando minimizar as quedas nos resultados de fertilidade das células espermáticas (CORRÊA et al., 2001). Uma das maneiras 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 que consequentemente diminuam o estresse oxidativo o qual está relacionado diretamente à perda de capacidade fertilizante espermática durante o armazenamento. Nesse contexto, compostos que atuem 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 DNP é um composto orgânico, ligeiramente solúvel em água (USEPA, 1993), e que em altas concentrações pode se apresentar tóxico para os seres humanos (DE FELICE e FERRERIRA, 2006). Entretanto, estudos recentes têm demonstram que em baixas concentrações (em ordem de micromolares) o DNP possui efeito benéfico como na prevenção da degeneração neural, devido sua 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 DNP sobre a motilidade de espermatozoides suínos, mantidos a temperatura ambiente (22°C) por até 48 horas.

2. METODOLOGIA

Neste trabalho foram realizadas 5 coletas com 3 machos suínos alojados na Faculdade de Veterinária, UFPEL, totalizando 15 ejaculados. As coletas foram realizadas pelo método da mão enluvada, em frascos aquecidos a 38°C cobertos

com filtro, para possibilitar a separação da parte gelatinosa do sêmen (Hancock; Hovel, 1959). Só foram processados os ejaculados que após a diluição em 1:1 em BTS, apresentaram motilidade espermática acima de 60% quando avaliada em lâmina sob lamínula aquecida a 37° C em microscopia óptica em aumento de 200x (CBRA, 1998). Os grupos foram divididos em: controle (apenas com 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 foram armazenadas em temperatura ambiente (22°C) por até 48 horas. A motilidade espermática era avaliada a cada 24 horas, aquecendo 1 mL de cada tratamento a 37°C durante por 10 min, e posteriormente utilizando 10 µL para ser realizada a avaliação sobre a porcentagem de células viáveis em 5 campos distintos. Os resultados foram analisados por ANOVA e comparação de médias através do teste de Tukey no software Statistix® 9.0 (2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações realizadas até 48 horas de armazenamento na temperatura, ambiente (22° C), não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos contendo DNP e o controle (Tabela 1).

Apesar de que o decréscimo da qualidade espermática com o passar do tempo corrobora com MURGAS et al., (2002) que já havia descrito, uma queda na motilidade do sêmen suíno com o armazenamento, independente do diluente utilizado. Este resultado tem importância pelo fato de demonstrar que o DNP, quando usado nestas concentrações, não é tóxico para célula espermática. Isto torna seu uso promissor, já que o DNP se mostrou benéfico para espermatozoides de macacos, aumentando sua motilidade após descongelamento quando utilizados em baixas concentrações, isto é, de no máximo 50 µM (DONG et al., 2010). Além disso, demonstrou possível relevância na espécie suína quando aplicado em mórulas que obtiveram maior número de blastocistos em relação ao controle, no tratamento com concentração de 100 µM (MACHÁTY et al., 2001).

Tabela 1: Motilidade espermática suína avaliada até 48 horas após a conservação em temperaturas de 22°C, com diferentes concentrações de 2,4 dinitrofenol no diluente.

Variável	Tempo	Controle	T1	T2	T3	T4
Motilidade	0h	67,0± 9,5	65,0 ±20,6	63,0 ± 13,4	67,0 ± 15,0	61,0 ±22,8
	24h	47,0 ± 12,5	48,0 ± 18,1	51,0 ± 18,5	56,0 ± 13,5	55,0 ± 10,8
	48h	31,0 ± 12,9	21,0 ± 11,0	27,0 ± 10,6	30,0 ± 10,5	28,0 ± 12,3
Integridade de Membrana	0h	67,1± 14,3	60,3 ± 15,5	60,1 ± 16,8	69,8 ± 11,0	70,3 ± 8,2
	24h	64,1 ± 14,9	57,0 ± 14,4	60,0 ± 18,1	56,2 ± 17,8	61,7 ± 12,4
	48h	50,2 ± 15,9	51,6 ± 17,1	58,0 ± 14,4	50,2 ± 13,6	52,9 ± 15,9
Funcionalidade Mitocondrial	0h	67,7± 15,9	61,4 ± 19,5	63,8 ± 7,2	69,1 ±10,4	69,1 ± 10,4
	24h	47,1 ± 20,0	47,1 ± 20,0	55,7 ± 19,1	51,7 ± 22,8	60,4 ± 12,1
	48h	44,9 ± 11,8	44,9 ± 11,7	49,7 ± 15,8	45,7 ±17,3	50,5 ± 8,8

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

Porém a temperatura de 22°C com a adição de DNP não foi eficaz para reduzir significativamente o metabolismo celular, possibilitando que a velocidade das reações enzimáticas de maneira negativa fossem afetadas; porém observou-

se que não houve modificações na permeabilidade das membranas biológicas, acarretando interferências em suas atividades (WATSON, 1996). Contudo se esperava que em temperatura ambiente o DNP teria um efeito positivo em relação a manutenção da motilidade, já que o composto tem sua penetração na facilitada devido ao metabolismo acelerado na célula (HAZEL, 1984), mas não foi observado esse efeito neste experimento.

4. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível verificar que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, no entanto a adição de DNP no diluente do sêmen de suínos não prejudica a funcionalidade espermática em nenhum dos pontos avaliados.

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.
- DONG, Q.; TOLLNER, T.L.; RODENBURG, S.E.; HILL, D.L.; VANDE VOORT, C.A. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2, 4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. **Fertility and Sterility**. v. 94, p. 2359-61, 2010.
- HAZEL, J.R. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. **American Journal Physiology**. v, 246, p. 460-470, 1984.
- 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.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n.1, p. 135-140, 1996.