



**MARCELA BORGES NUNES**

**ADIÇÃO DE CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO  
RESFRIADO OU DESCONGELADO**

**LAVRAS-MG  
2012**

**MARCELA BORGES NUNES**

**ADIÇÃO DE CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO OU  
DESCONGELADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

**LAVRAS-MG  
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Nunes, Marcela Borges.

Adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado ou descongelado /  
Marcela Borges Nunes. – Lavras : UFLA, 2012.

65 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.

Bibliografia.

1. Espermatozoide. 2. Ativadores do metabolismo. 3. Adenosina  
monofosfato cíclico. 4. Criopreservação. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 636.4089261

**MARCELA BORGES NUNES**

**ADIÇÃO DE CAFEÍNA AO SÊMEN SUÍNO RESFRIADO OU  
DESCONGELADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de Maio de 2012.

Luis David Solis Murgas	UFLA
Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
José Nélio de Sousa Sales	UFPB

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2012**

*Ofereço e dedico,*

aos meus pais,  
Maria Helena e José Zacarias.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as bênçãos que sempre colocou em meu caminho e por me amparar nos momentos mais difíceis, me fazendo sempre ter a fé, a força e o foco necessários para alcançar meus objetivos.

Agradeço e dedico essa vitória, em especial, a meus pais, que sempre me incentivaram e me apoiaram na luta e na conquista dos meus sonhos, que me ensinaram a acreditar em mim mesma e que sempre fizeram todo o possível para me auxiliar nas minhas caminhadas, abdicando, inclusive, de suas aspirações pessoais para favorecer a realização dos meus desejos muitas vezes descabidos.

Também dedico essa vitória às minhas “vózinhas”, que sempre foram e sempre serão estrelas-guias. Amo muito vocês!

Não poderia deixar de agradecer, de todo coração, aos meus grandes amigos, que muito me ajudaram em toda essa etapa e que tiveram suma importância na parte profissional e também pessoal, Chico, Mayara e toda família (que é para mim como uma família também), Thiago, Rodrigo, Naina, Bianca, Evandro, Bárbara... Vocês são anjos em minha vida!

Gostaria de agradecer, com muito carinho, ao pessoal do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da UFLA e do Grupo de Estudos de Reprodução de Suínos, com quem muito aprendi e que muito me auxiliaram na concretização deste trabalho. Todos vocês foram fabulosos e fundamentais!

Agradeço ao meu orientador e coorientador e ao pessoal da banca avaliadora, por toda ajuda e sabedoria repassada. Valeu, por toda oportunidade concedida!

Também agradeço ao pessoal da fazenda São Paulo, pelo auxílio. Sem vocês este trabalho não teria se concretizado!

Não poderia deixar de me lembrar e agradecer ao pessoal do Exército Brasileiro, da Escola de Sargentos das Armas, que passaram a fazer parte de minha vida no final dessa etapa, mas que muito me incentivaram e apoiaram na finalização da mesma. Obrigada, pela força. Brasil acima de tudo!

Para finalizar, agradeço, com muito orgulho e muita honra, a essa grande e renomada instituição de ensino, Universidade Federal de Lavras, onde me formei Médica Veterinária e onde concluo hoje meu Mestrado, o que é para mim motivo de muita satisfação e alegria!

Obrigada, com toda a força de minha alma, a todos vocês que fizeram e fazem, junto a mim, parte desta história!

## RESUMO

Avaliaram-se os efeitos da adição de cafeína ao sêmen suíno após o resfriamento e o descongelamento. No experimento 1, 12 ejaculados provenientes de quatro animais foram processados em doses de 100 mL com três bilhões de espermatozoides. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados (ejaculado) em esquema fatorial 5x3 (cinco doses de cafeína 0, 2, 4, 6 e 8 mM/dose inseminante e três tempos de armazenamento a 15 °C – 0, 24 e 48 horas) com parcela subdividida no tempo (tempos de avaliação), com 12 repetições de um ejaculado. A cafeína foi adicionada logo após a incubação de amostras de sêmen e as avaliações foram feitas 10 e 120 minutos depois. No experimento 2, 12 ejaculados provenientes de quatro animais foram coletados e armazenados em palhetas de sêmen de 0,5 mL contendo 500 milhões de espermatozoides. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados (ejaculado) com cinco tempos de avaliação após a adição de cafeína (0, 15, 30, 45 e 60 minutos), com 12 repetições de um ejaculado. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da cafeína na motilidade, na taxa de degradação da motilidade espermática e no total de alterações morfológicas, em ambos os experimentos. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da concentração de dialdeído malônico espermático para o sêmen resfriado. Houve interação ( $P<0,05$ ) entre cafeína e tempo de armazenamento no vigor e na viabilidade espermática, tendo o vigor melhorado ( $P<0,05$ ), com a adição de cafeína na concentração de 8 mM/dose, apenas no sêmen resfriado armazenado por 48 horas, em que, em tempos inferiores de armazenamento, a cafeína reduziu ( $P<0,05$ ) de forma linear a viabilidade espermática. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da cafeína na viabilidade espermática para o sêmen descongelado, mas a taxa de resistência osmótica diminuiu com o aumento da dose de cafeína utilizada ( $P<0,05$ ). Não houve diferenças para a taxa de resistência osmótica e o tempo de armazenamento do sêmen ( $P>0,05$ ). Conclui-se que a adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado na dose de 8 mM melhora o vigor às 48 horas de resfriamento, porém, afeta negativamente em tempos inferiores de armazenamento e que a adição de cafeína não melhora a qualidade do sêmen suíno descongelado.

Palavras-chave: Varrão. Espermatozoide. Ativadores do metabolismo. Adenosina monofosfato cíclico. Criopreservação



## ABSTRACT

We evaluated the effects of adding caffeine to boar semen after cooling and thawing. In experiment 1, 12 ejaculates from four animals were processed in doses of 100 mL with three billion sperm. We used a randomized block design (ejaculate) in factorial 5x3 (five doses of caffeine 0, 2, 4, 6 and 8 mM/insemination dose and three days of storage at 15 °C - 0, 24 and 48 hours) with plot subdivided in time (time of review) with 12 repetitions of one ejaculate. Caffeine was added after incubation of semen samples and assessments were made at 10 and 120 minutes after. In experiment 2, 12 ejaculates from four animals were collected and stored in straws of semen containing 500 mL of 0.5 million sperm. We used a randomized block design (ejaculate) with five evaluation times after addition of caffeine (0, 15, 30, 45 and 60 minutes) with 12 repetitions of one ejaculate. There was no effect ( $P>0.05$ ) of caffeine on motility, the rate of degradation of total sperm motility and morphological changes in both experiments. There was no effect ( $P>0.05$ ) for the concentration of malonic dialdehyde sperm for cooled semen. There was an interaction ( $P<0.05$ ) between caffeine and storage time on sperm viability and vigor, and the vigor has improved ( $P<0.05$ ) with the addition of caffeine in 8 mM concentration/dose only in cooled semen stored for 48 hours, where at inferior storage times, caffeine reduced ( $P<0.05$ ) linearly sperm viability. There was no effect ( $P>0.05$ ) of caffeine on sperm viability for thawed semen, but the rate of osmotic resistance decreased with increasing dose of caffeine used ( $P<0.05$ ). There were no differences in the rate of osmotic resistance and time of sperm storage ( $P>0.05$ ). We conclude that the addition of caffeine to swine semen cooled at the rate of 8 mM improves the force at 48 hours of cooling, but negatively affects in lower storage times and that the addition of caffeine does not improve the quality of boar semen thawed.

Keywords: Boar. Spermatozoon. Metabolism activators. Adenosine monophosphate cyclic. Cryopreservation.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1**

Figura 1 Viabilidade espermática do sêmen suíno no tempo de 0h (A) e 24h (B) de incubação, tratado com concentrações crescentes de cafeína. .... 42

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Tabela 1	Motilidade (%) e vigor espermático do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos de resfriamento (n=12) .....	40
Tabela 2	Taxa de degradação da motilidade (%) e viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12) .....	41
Tabela 3	Taxa de resistência osmótica (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12) .....	42
Tabela 4	Total de alterações espermáticas (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12) .....	43

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 2

Tabela 1	Motilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12).....	56
Tabela 2	Vigor espermático (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12).....	56
Tabela 3	Taxa de resistência osmótica (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12) .....	57
Tabela 4	Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12) .....	57

Tabela 5	Total de alterações espermáticas (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)	58
----------	---	----

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....14</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....15</b>
<b>2.1</b>	<b>Importância do uso do sêmen resfriado e congelado para a suinocultura .....15</b>
<b>2.2</b>	<b>Fatores que interferem na qualidade do sêmen suíno resfriado e congelado .....17</b>
<b>2.3</b>	<b>Metabolismo energético dos espermatozoides .....21</b>
<b>2.4</b>	<b>Utilização da cafeína como ativadora metabólica no sêmen .....22</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....25</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS .....32</b>	
	<b>ARTIGO 1 Avaliação da qualidade do sêmen suíno resfriado após adição de cafeína (Revista Brasileira de Zootecnia - versão preliminar).....33</b>
	<b>ARTIGO 2 Qualidade espermática no sêmen suíno descongelado após adição de cafeína (Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia - versão preliminar).....48</b>
	<b>ANEXOS.....62</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção nacional de carne suína, em 2011 cresceu 4,7% em relação a 2010, passando de 3,24 milhões para 3,4 milhões de toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA - ABIPECS, 2012). Neste contexto, a suinocultura brasileira tem se destacado, crescendo em qualidade e volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos. Essa mudança estrutural no setor criou uma demanda por animais com elevada eficiência reprodutiva, sanitária e alimentar, associada a uma excelente qualidade de carne.

A inseminação artificial (IA) apresenta vantagens em relação à monta natural, porém, existem fatores que limitam a otimização dessa biotécnica (número elevado de espermatozoides e volume por dose) (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005). Além disso, a dificuldade de preservação de sêmen suíno por períodos prolongados, sem alterar sua capacidade fecundante, corresponde à outra limitação da expansão da técnica de inseminação artificial. Considerando o sêmen resfriado, este deve ser mantido à temperatura entre 15 °C a 18 °C, até o terceiro dia após a coleta e a diluição. Ainda assim, a qualidade do sêmen é questionável, quando armazenado por mais de 24 horas.

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de testar novas soluções crioprotetoras formuladas com produtos que minimizem os efeitos deletérios das baixas temperaturas sobre o espermatozoide. As expectativas oriundas das pesquisas já realizadas, e também daquelas ainda em andamento, apontam para uma ampliação no uso da IA com sêmen resfriado ou congelado, contribuindo para aumentar a competitividade e a rentabilidade da cadeia produtiva da suinocultura. Além de inúmeras tentativas do aprimoramento de técnicas de manipulação do sêmen em laboratório e protocolos de inseminação, o

conhecimento do papel de substâncias reguladoras do metabolismo espermático tem recebido especial atenção nos últimos anos.

Substâncias como a cafeína são capazes de inibir a enzima fosfodiesterase, que é responsável pela degradação do AMP cíclico (cAMP). Portanto, a cafeína se destaca devido ao seu potencial estimulador do metabolismo celular. Assim, sua utilização no sêmen suíno resfriado ou descongelado poderia melhorar a qualidade da dose inseminante.

Ao longo do tempo, a queda da fertilidade do sêmen suíno congelado ou resfriado ocorre devido ao desgaste energético da célula espermática. Dessa forma, o uso de substâncias que aumentem a concentração de energia no interior da célula espermática é importante para a manutenção da fertilidade do sêmen (ANDRÉ, 1983; CHULAVATNATOL; TREETIPSATIT, 1983).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a motilidade, o vigor, a viabilidade, a degradação de motilidade, a resistência osmótica, as alterações morfológicas e a concentração de dialdeído malônico do sêmen suíno resfriado ou descongelado, após a adição de cafeína.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância do uso do sêmen resfriado e congelado para a suinocultura**

Os primeiros relatos sobre a inseminação artificial (IA) em suínos datam do final da década de 1940. Entretanto, estas primeiras tentativas estavam restritas a um plano experimental (BORTOLOZZO; WENTS, 1995).

No Brasil, a IA de suínos desenvolveu-se, efetivamente, a partir do ano de 1975, com a criação de centrais de IA na região Sul do país. Em 1990, cerca de 2% do rebanho nacional já estava sendo inseminado, como consequência do crescimento tecnológico na suinocultura do país (SCHEID, 1991). No ano de



2002, o mercado envolvendo a IA movimentou, no total, cerca de R\$ 7,5 milhões, referentes, principalmente, ao material de consumo (frascos, diluentes, pipetas, entre outros), ao qual se somam um valor não quantificado de investimentos em instalações, equipamentos e qualificação pessoal (SCHEID; SILVEIRA, 2002). No Brasil, estima-se que tenham sido realizadas 1,6 milhão de primeiras inseminações em 2000, equivalente à utilização desta biotécnica em 51% da matrizes do plantel tecnificado (WENTZ et al., 2000).

Durante décadas, atenção considerável foi direcionada ao desenvolvimento de tecnologias reprodutivas. A IA é um exemplo desta biotécnica, que continua a se expandir nos sistemas de produção de suínos (DAY, 2000). De acordo com Rodriguez-Martinez et al. (2005), a utilização do sêmen do reprodutor suíno em programas de IA triplicou nos últimos 17 anos. Em muitos países da Europa, mais de 90% das fêmeas são inseminadas e, na América do Norte, cerca de 70%.

A compreensão e a adoção dos procedimentos para a preparação doses inseminantes contribuíram para essa melhora significativa na qualidade das doses e a maior difusão desta biotecnologia. Outro fator que contribuiu para o desenvolvimento da IA foi a maior disponibilidade de equipamentos por parte das indústrias associadas ao agronegócio (BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005).

Atualmente, avanços substanciais têm ocorrido em outras áreas associadas à IA. Muitas pesquisas têm sido conduzidas para melhorar os métodos de avaliação de sêmen, sua funcionalidade e predição da fertilidade do reprodutor suíno. Outras têm focado o efeito do tempo de inseminação relativo à ovulação, o papel do plasma seminal no transporte de espermatozoides, o período de ovulação e a adição de diferentes componentes nas doses inseminantes para melhorar a qualidade do sêmen (MARTINEZ et al., 2001).

O sêmen criopreservado facilita consideravelmente a distribuição de genes desejáveis e o uso de sêmen congelado ajuda a controlar a transmissão de certos patógenos, o que propicia a manutenção do estado sanitário do rebanho. Também, uma reserva de sêmen criopreservado minimiza os efeitos de um surto de uma doença contagiosa ou de um desastre natural, além de a criopreservação de sêmen suíno ser necessária para comercialização internacional das doses inseminantes. Apesar dessas vantagens, o espermatozoide suíno é particularmente sensível a temperaturas muito baixas e o sêmen congelado ainda não é habitualmente utilizado na suinocultura. Assim, o desenvolvimento de técnicas que permitam longa conservação da capacidade fecundante do sêmen poderá facilitar a utilização da IA, proporcionando a utilização mais racional dos reprodutores (PAQUIGNON; BUSSIERE; BARITEAU, 1987).

## **2.2 Fatores que interferem na qualidade do sêmen suíno resfriado e congelado**

O sêmen suíno, após a coleta e a diluição, tem sido tradicionalmente armazenado a temperaturas entre 16 °C e 18 °C (LAFOREST; ALLARD, 1996). Este intervalo de temperatura não interrompe totalmente o metabolismo dos espermatozoides, ocorrendo acúmulo de metabólitos que podem interferir na motilidade espermática, e também não impede a multiplicação bacteriana, a qual influencia a qualidade do sêmen. Tais fatores são limitantes para o armazenamento do sêmen por períodos prolongados (WEITZE, 1990). A utilização dessa faixa de temperatura se justifica pela sensibilidade do espermatozoide suíno a temperaturas inferiores a 15 °C, o que resulta em diminuição da sobrevivência espermática (MAXWELL; JOHNSON, 1997).

Com a diminuição da temperatura de incubação do sêmen suíno é observada redução na motilidade espermática, na quantidade de acrossomas normais e também diminuição da integridade de membranas (KATZER et al., 2004). A alternativa para essa sensibilidade relacionada à temperatura convencional de resfriamento seria a utilização do sêmen congelado. No entanto, a grande variabilidade nos resultados de fertilidade após inseminação com doses de sêmen descongeladas limita a aplicação prática do sêmen suíno congelado (TONIOLLI; BARROS; JATAHY, 2001).

Sabe-se que a membrana espermática está envolvida nas trocas metabólicas com o meio ambiente (CORREA; HEERSCHKE; ZAVOS, 1997), com o processo de capacitação, a reação acrossômica e a ligação do espermatozoide à superfície do oócito, a qual requer uma membrana bioquimicamente ativa (JEYANDRAN; VEN; PEREZ-PELAEZ, 1984), sendo sua integridade um importante indicador da capacidade fertilizante do espermatozoide.

Em muitas espécies de mamíferos, mais de 60% dos ácidos graxos da membrana espermática são ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa da série ômega 3 ( $\omega$ 3) (NISSEN; KREYSEL, 1983). Tal presença de ligações duplas nos ácidos graxos poli-insaturados confere maior fluidez à membrana plasmática (ERICKSON, 1998). A membrana dos espermatozoides de suínos é particularmente composta por lipídios insaturados: ácido docosahexanoico (DHA, 30%) e docosapentaenoico (DPA, 25%) (PENNY; NOBLE; MALDJIAN, 2000). Tais diferenças encontradas no sêmen da espécie suína os tornam mais susceptível ao choque pelo frio, durante o congelamento e ao choque térmico, no descongelamento (ANTUNES, 2007).

Diferenças na composição de lipídios da membrana espermática têm sido reportadas como fator chave na diferenciação da congelabilidade dos espermatozoides (PARKS; LYNCH, 1992). A possibilidade de aumentar a

congelabilidade de espermatozoides suínos por meio da alteração da constituição da membrana espermática é considerada, como, por exemplo, o aumento do teor de DHA na membrana plasmática por meio de sua adição à dieta (PENNY; NOBLE; MALDJIAN, 2000). O aumento do grau de insaturações e, portanto, da fluidez da membrana poderia aumentar a resistência dos espermatozoides suínos aos danos causados pelo processo de resfriamento/descongelamento (PAULENZ; TAUGBOL; KOMMISRUUD, 1999).

Além disso, a composição das membranas que recobrem os espermatozoides é diferente entre as várias partes (cabeça, peça intermediária e cauda) (JONES; STEWART, 1979) e, dessa forma, respondem diferentemente ao estresse causado pelo processo de congelamento e descongelamento (WATSON; DUNCAN, 1988). Sendo assim, os espermatozoides podem apresentar baixa motilidade e serem viáveis (BLACH; AMMANN; BOWEN, 1989), apresentar boa motilidade pós-descongelação, porém, com danos de acrossoma que reduzem sua capacidade fecundante (CHRISTENSEN; PARLEVLIT; BUITEN, 1994).

De acordo com Buhre e Pettitt (1996) e Watson (1995), há diferenças na bicamada lipídica da membrana do espermatozoide suíno que podem explicar a maior susceptibilidade ao choque pelo resfriamento. Dentre as principais diferenças, podem-se citar a menor porcentagem de moléculas de colesterol (PAULENZ; TAUGBOL; KOMMISRUUD, 1999) e a distribuição assimétrica na membrana, tendo uma maior quantidade na monocamada interna. Estas diferenças estruturais ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozoide suíno ao choque pelo frio, devido ao aumento da permeabilidade da membrana e a consequente perda de cátions e enzimas, a redução da atividade enzimática e dos processos de difusão controlados pela membrana e as mudanças no movimento lateral de canais (JOHNSON et al., 2000).

Pursel, Johnson e Rampacek (1972) e Pursel, Johnson e Schulman (1973) demonstraram que os espermatozoides aumentam sua resistência ao choque térmico quando incubados (antes do resfriamento e por certo período) a temperaturas acima de 15 °C, resultando em maiores índices de motilidade e de acrossomas normais.

Neste contexto, a adição de diluentes ao sêmen suíno tem várias funções, tais como aumentar o volume do total da amostra de sêmen, fornecer nutrientes para a produção de energia, proteger os espermatozoides contra o choque térmico, controlar a flutuação de pH, manter o balanço osmótico e inibir o desenvolvimento bacteriano (LEVIS, 2000; JOHNSON et al., 2000).

Os diluentes desenvolvidos na década de 1980 visavam prolongar a viabilidade espermática (WEITZE, 1991). A exemplo dos diluentes de longa preservação utilizados em outras espécies, foram incluídas macromoléculas na composição dos diluentes utilizados para suínos, com o objetivo de proteger suas membranas contra os danos do choque térmico (LEVIS, 2000). A albumina sérica bovina (BSA) é a macromolécula mais utilizada nesses diluentes (WEITZE, 1991). Além disso, um tampão anfótero também passou a constituir tais diluentes (COSTI, 2003). No sêmen resfriado, o período de manutenção da viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozoide varia de um a seis dias, dependendo do diluente utilizado (LEVIS, 2000).

Entretanto, outro fator importante na qualidade do sêmen suíno está correlacionado ao metabolismo energético dos espermatozoides, sendo uma das principais causas da queda na fertilidade do sêmen estocado (FORD; WAITES, 1986).

### 2.3 Metabolismo energético dos espermatozoides

As células espermáticas, em algumas espécies, podem realizar tanto o metabolismo aeróbico quanto o anaeróbico, sendo metabolicamente flexíveis (BACILA, 2003). Isso, talvez, seja reflexo da grande variação de tensão de oxigênio a que estes gametas são submetidos, desde próximo à anóxia, nos testículos e epidídimo, até grandes tensões na vagina e, em casos particulares, em ambientes *in vitro* (CUMMINS; JEQUIER; KAN, 1994).

As duas importantes fontes de geração de adenosina trifosfato mitocondrial são o ciclo de Krebs e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. As mitocôndrias, na célula espermática, estão localizadas apenas na peça intermediária, formando a bainha mitocondrial e produzindo adenosina trifosfato (ATP) para a célula por respiração aeróbica (TRAVIS et al., 1998). Por outro lado, no catabolismo anaeróbico, o piruvato gerado por frutólise é transformado em ácido láctico (BACILA, 2003), independente das mitocôndrias.

Estudos demonstraram que a habilidade do espermatozoide em utilizar de forma similar a frutose, a glicose e a manose deve-se ao fato de estes três açúcares entrarem na glicólise por meio da atividade da hexoquinase, seguida pela formação do hexosemonofosfato até ácido láctico (KING et al., 2006).

O metabolismo energético dos espermatozoides, de forma geral, está diretamente relacionado à concentração interna de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (CHULAVATNATOL; TREETIPSATIT, 1983; SIMPSON; WHITE, 1987). Segundo Harper, Rodwell e Mayes (1982), estes nucleotídeos cíclicos são metabolizados pela enzima fosfodiesterase, interrompendo suas funções metabólicas. Dessa forma, a adição de inibidores da fosfodiesterase ao sêmen pode resultar em aumento na concentração de AMPc nas células

espermáticas, acelerando o metabolismo energético dos espermatozoides (GARBERS et al., 1971).

A principal função conhecida do AMPc, em células eucarióticas, é a estimulação da fosforilação proteica por meio da ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc (CHULAVATNATOL; TREETIPSATIT, 1983; ROSEN; ERLICHMAN; RUBIN, 1975). Em espermatozoides, o aumento da concentração de AMPc induz à maturação (GARBERS et al., 1971), estimula a motilidade e participa no processo de capacitação (MORTON; ALBAGLI, 1973).

Relatos sugerem que substâncias derivadas da metilxantina, tais como a cafeína, a teofilina e a pentoxifilina, podem estimular a motilidade progressiva espermática pela inibição da adenosina cíclica 3'-5' monofosfato fosfodiesterase, levando a um aumento intracelular das concentrações de AMPc (GOULART et al., 2004). Dessa forma, o uso de tais substâncias poderia resultar em sêmen de melhor qualidade destinado à inseminação artificial e a programas de fertilização *in vitro* (FIV).

#### **2.4 Utilização da cafeína como ativadora metabólica no sêmen**

O aumento da concentração do AMP cíclico, durante a capacitação espermática, pode ser alcançado pela adição de cafeína, considerada um inibidor da fosfodiesterase (GOULART et al., 2004). Funahashi e Nagai (2001) demonstraram, em um estudo, que a cafeína induz à capacitação espermática e à reação acrossômica em sêmen *in natura* de suínos e, conseqüentemente, aumentam a penetração de espermatozoides (ABEYDEERA; DAY, 1997, FUNAHASHI; NAGAI, 2001). Em truta arco-íris, a cafeína, em concentração de 10 mM em meio isotônico, aumentou significativamente a motilidade espermática (VALDEBENITO, 2007).

Muitos meios de FIV em suínos são suplementados com cafeína para elevar a concentração de AMPc intracelular. Apesar da alta incidência de polispermia, este é o agente mais utilizado na capacitação espermática em suínos (FUNAHASHI; FUJIWARA; NAGAI, 2000). Apesar de muito utilizada, a cafeína não é um reagente ideal porque causa aumentos de AMPc de forma desregulada, pela inibição da fosfodiesterase. Uma vez que o AMPc atinge um limiar intracelular, isso pode ativar reações acrossômicas espontâneas (FRASER et al., 2007).

Funahashi, Fujiwara e Nagai (2000) compararam resultados obtidos quando cafeína, adenosina e peptídeo promotor de fertilização (FPP) foram adicionados individualmente em suspensões que contêm  $2 \times 10^6$  espermatozoides por mL de sêmen suíno congelado. Para todas as combinações houve aumento da taxa de fertilização (cafeína, 98%; adenosina, 71%; FPP, 75%). No grupo tratado com cafeína, a maioria do oócitos era polispérmica, sendo apenas 13% de monospérmicos. Mas, os grupos tratados com adenosina e FPP apresentaram incidência relativamente alta de monospermia (adenosina, 79%; FPP, 75%).

Em estudo subsequente do mesmo grupo, Funahashi e Nagai (2001), utilizando concentração de  $5 \times 10^5$  espermatozoides por mL de sêmen suíno congelado tratado com cafeína, encontraram 96% de fertilização e 13% de monospermia. Sêmen suíno fresco também parece responder de forma semelhante (FUNAHASHI; ROMAR, 2004).

Sabe-se que o meio tamponado com Tris modificado (mTBM), sem bicarbonato e sem hepes em tampão Tris e suplementado com cafeína, em condições de atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, suporta tanto a capacitação espermática quanto a reação cortical de oócitos em suínos. O meio mTBM suplementado com 0,1% ou 0,4% de BSA apresenta taxas de penetração (99% e 95%) e de polispermia (93 e 96%) semelhantes, porém, mostra maior



número de espermatozoides penetrados por oócito no meio com 0,4% de BSA (ABEYDEERA; DAY, 1997).

Milani et al. (2010) utilizaram cafeína nas doses de 0; 2,5; 5 e 7,5 mM, juntamente com outras substâncias (pentoxifilina e 2-deoxiadenosina) no diluidor, com o objetivo de avaliar o padrão de motilidade do sêmen canino descongelado. Estes autores observaram que, aos 120 minutos de incubação, a amplitude lateral da cabeça e a velocidade curvilínea apresentaram melhores resultados na amostra seminal que continha 7,5 mM de cafeína.

Pereira et al. (2010) adicionaram cinco diferentes níveis de cafeína (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM) no sêmen suíno descongelado e detectaram efeito linear decrescente para a viabilidade espermática com o aumento da concentração de cafeína. Dessa forma, pode-se observar que o sêmen suíno descongelado é sensível a substâncias ativadoras do metabolismo.

Em estudos realizados com sondas fluorescentes de clortetraciclina (CTC) foi demonstrado que a cafeína induz à capacitação espermática e à reação acrossômica em sêmen *in natura* de suínos e, conseqüentemente, aumenta a penetração de espermatozoides (FUNAHASHI; NAGAI, 2001). Porém, a cafeína aumenta a polispermia e, conforme se aumenta a concentração de cafeína, aumenta também a penetração oocitária pelos espermatozoides (ABEYDEERA; DAY, 1997; FUNAHASHI; NAGAI, 2001), sendo as taxas de polispermia de 33,9%, 85,7%, 86,3% e 95,2% nas concentrações de 0; 1; 2,5 e 5 mM de cafeína, respectivamente (ABEYDEERA; DAY, 1997).

## REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified trisbuffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 4, p. 537-544, Sept. 1997.
- ANDRÉ, J. (Ed.). **The sperm cell**: fertilizing power, surface properties, motility, nucleus e acrossome, evolutionary aspects. The Hague: M. Nijhoff, 1983. 456 p.
- 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, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. **Relatório ABIPECS 2011**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Acesso em: 1 maio 2012.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rode, 2003. 583 p.
- BLACH, E. L.; AMMANN, R. P.; BOWEN, R. A. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, New York, v. 31, n. 2, p. 283-298, 1989.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Fatores que interferem nos resultados de inseminação artificial em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBRA, 1995. p. 131-141.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 17-32, 2005.

BUHR, M. M.; PETTITT, M. J. Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 31, n. 1, p. 147-152, Aug. 1996.

CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIET, J.; BUITEN, A. van. Ultrastructure of fresh and frozen: thawed stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 6., 1994, Caxambú. **Proceedings...** Caxambú: ISER, 1994. p. 197-198.

CHULAVATNATOL, M.; TREETIPSATIT, N. Initiation of sperm flagellar movement using rat demembrated sperm model: nucleotide specificities. In: ANDRÉ, J. (Ed.). **The sperm cell**. Hague: M. Nijhoff, 1983. p. 364-367.

CORREA, J. R.; HEERSCHE, G.; ZAVOS, P. M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 3, p. 715-721, Feb. 1997.

COSTI, G. **Efeito de diluentes na qualidade de sêmen suíno armazenado a 17 °C e no desempenho reprodutivo das fêmeas após inseminação artificial**. 2003. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 37, n. 3, p. 345-362, Mar. 1994.

DAY, B. N. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 161-172, July 2000. Supplement.

ERICKSON, M. C. Chemistry and function of phospholipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (Ed.). **Food lipids, chemistry, nutrition and biochemistry**. New York: M. Dekker, 1998. p. 41-68.

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

FRASER, L. et al. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 5, p. 994-1003, Mar. 2007.

FUNAHASHI, H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduces the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n. 4, p. 1157-1163, Oct. 2000.

FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 58, n. 4, p. 424-431, Apr. 2001.

FUNAHASHI, H.; ROMAR, R. Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pre-treatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. **Reproduction**, Cambridge, v. 128, n. 6, p. 789-800, Dec. 2004.

GARBERS, D. L. et al. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. **Biology of Reproduction**, New York, v. 5, p. 336-339, 1971.

GOULART, H. M. et al. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in Vitro* dos espermatozóides de equinos, após o resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 112-122, jan./fev. 2004.

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

JEYENDRAN, R. S.; VEN, H. H. van der; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 143-172, Aug. 2000.

JONES, R. C.; STEWART, D. L. The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 56, n. 1, p. 233-238, 1979.

KATZER, L. H. et al. Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 233-241, 2004.

KING, S. S. et al. Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of d-(+)-mannose into semen extender. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 6, p. 1171-1179, 2006.

LAFORREST, J. P.; ALLARD, D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 31, n. 1, p. 275-276, 1996.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville: ICBSP, 2000. p. 121-128.

MARTINEZ, E. A. et al. Successful nonsurgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 289-296, Aug. 2001.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 2, p. 209-219, July 1997.

MILANI, C. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**, New York, v. 74, n. 1, p. 153-164, July 2010.

MORTON, B.; ALBAGLI, L. Modification of hamster sperm adenyl cyclase by capacitation "in vitro". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 50, p. 697-703, 1973.

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrology**, Lawrence, v. 15, p. 264-269, 1983.

PAQUIGNON, M.; BUSSIÈRE, J.; BARITEAU, F. Resultats recents en matiere de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journées Recherche de la Porcine en France**, Paris, v. 19, p. 63-78, 1987.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 255-266, Apr. 1992.

PAULENZ, H.; TAUGBOL, O.; KOMMISRUUD, E. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 34, n. 5, p. 431-435, Oct. 1999.

PENNY, P. C.; NOBLE, R. C.; MALDJIAN, A. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Pig News Information**, Wallingford, v. 25, n. 4, p. 119-126, 2000.

PEREIRA, B. A. et al. Viabilidade espermática e resistência osmótica do sêmen suíno descongelado adicionado de cafeína. In: REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 23., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. 1 CD-ROM.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; RAMPACEK, G. B. Acrossome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 34, n. 2, p. 278-283, 1972.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A.; SCHULMAN, L. L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 2, n. 2, p. 528-531, 1973.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 2, p. 514-535, Jan. 2005.

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

SCHEID, I. R. Commercial swine artificial insemination in Brazil: development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 1, p. 299-301, 1991. Supplement.

SCHEID, I. R.; SILVEIRA, P. R. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. **Suínos & Cia**, Campinas, v. 27, p. 25-28, nov./dez. 2002.

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

TONIOLLI, R.; BARROS, D. Q.; JATAHY, P. C. Fertilidade de porcas inseminadas: análise de diferentes parâmetros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, p. 444-447, 2001.

TRAVIS, A. J. et al. Targeting of a germ cell specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 263-276, Feb. 1998.

VALDEBENITO, N. I. Effect of caffeine in the motility and fertility of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Sperm. **Información Tecnológica**, La Serena, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2007.

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3., 1995, Mariensee. **Proceedings...** Mariensee: IBSP, 1995. p. 135-140.

WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v. 25, n. 2, p. 131-142, Apr. 1988.

WEITZE, K. F. Long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 1, p. 231-253, 1991. Supplement.

\_\_\_\_\_. The use of "long-term extender" in pig AI: a view of the international situation. **Pig News and Information**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 23-26, 1990.

WENTZ, I. et al. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica dessa biotécnica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB "INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS", 3., 2000, Flores da Cunha. **Anais...** Flores da Cunha: Minitub, 2000. p. 5-12.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Avaliação da qualidade do sêmen suíno resfriado após adição de cafeína** (Elaborado conforme as normas da Revista Brasileira de Zootecnia - versão preliminar).

Marcela Borges Nunes<sup>1,\*</sup>, Marcio Gilberto Zangerônimo<sup>1</sup>, Evandro César Pereira<sup>1</sup>, Bárbara Azevedo Pereira<sup>1</sup>, Luiz Gustavo Pessoa Rocha<sup>1</sup>, Bruno Generoso Faria<sup>1</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>1</sup>, José Nélío de Sousa Sales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Setor de Fisiologia e Farmacologia - DMV, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, C.P 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

\*Autor de correspondência (Tel.: +55-35-3829-1735; E-mail: [marcelaveterinaria@gmail.com](mailto:marcelaveterinaria@gmail.com))

CONFLITOS DE INTERESSE: Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse relacionado com este estudo.

### Resumo

A utilização da cafeína no sêmen suíno resfriado pode melhorar a qualidade da dose inseminante, devido ao seu potencial estimulador do metabolismo celular. Sendo assim, objetivou-se, com este estudo, avaliar a qualidade do sêmen suíno resfriado, após a adição de cafeína. Doze ejaculados provenientes de quatro animais foram processados em doses de 100 mL com três bilhões de espermatozoides. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados (ejaculado) em esquema fatorial 5x3 (cinco doses de cafeína 0, 2, 4, 6 e 8 mM/dose inseminante e três tempos de armazenamento a 15 °C – 0, 24 e 48 horas) com parcela subdividida no tempo (tempos de incubação), com 12 repetições de um ejaculado cada. A cafeína foi adicionada logo após a incubação de amostras de sêmen e as avaliações foram feitas aos 10 e aos 120 minutos. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da cafeína na motilidade e na taxa de degradação da motilidade espermática, na taxa de resistência osmótica, no total de alterações morfológicas e na concentração de ácido malondialdeído espermáticas. Houve interação ( $P<0,05$ ) entre cafeína e tempo de armazenamento no vigor e na viabilidade espermática. O vigor foi melhor ( $P<0,05$ ) com a adição de cafeína na concentração de 8 mM/dose apenas no sêmen armazenado por 48 horas. Nos tempos 0 e 24 horas de armazenamento, a cafeína reduziu ( $P<0,05$ ) de forma linear a viabilidade espermática. Conclui-se que a adição de cafeína ao sêmen suíno resfriado na dose de 8 mM/100 mL melhora o vigor às 48 horas de resfriamento, porém, piora em tempos inferiores de armazenamento.

Palavras-chave: espermatozoides, metilxantina, resfriamento

## Introdução

A produção nacional de carne suína, em 2011, cresceu 4,7% em relação a 2010, passando de 3,24 milhões para 3,4 milhões de toneladas (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína - ABIPECS, 2012). Neste contexto, a suinocultura brasileira tem se destacado, crescendo em qualidade e em volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos.

A inseminação artificial (IA) apresenta vantagens em relação à monta natural, porém, existem fatores que limitam a otimização desta biotécnica, como, por exemplo, o número elevado de espermatozoides e volume por dose (Bortolozzo et al., 2005). Além disso, a dificuldade de preservação de sêmen suíno por períodos prolongados, sem alterar sua capacidade fecundante, constitui outra limitação para a expansão da técnica de inseminação artificial.

Em virtude disso, diversos estudos têm sido realizados a fim de testar novas soluções crioprotetoras que possam minimizar os efeitos deletérios das baixas temperaturas sobre o espermatozoide. As expectativas oriundas das pesquisas já realizadas, e também daquelas ainda em andamento, apontam para uma ampliação no uso da IA com sêmen resfriado ou congelado, contribuindo para aumentar a competitividade e a rentabilidade da cadeia produtiva da suinocultura. Além de inúmeras tentativas no aprimoramento de técnicas de manipulação do sêmen em laboratório e protocolos de inseminação, o conhecimento do papel de substâncias reguladoras do metabolismo espermático tem recebido especial atenção, nos últimos anos.

É sabido que substâncias como a cafeína são capazes de inibir a enzima fosfodiesterase, a qual é responsável pela degradação AMP cíclico (cAMP). Dessa maneira, sua utilização no sêmen suíno resfriado pode melhorar a qualidade da dose inseminante, devido ao seu potencial estimulador do

metabolismo celular (Jiang et al., 1984). Em virtude do exposto, objetivou-se, com este estudo, avaliar a qualidade do sêmen suíno resfriado, após a adição de cafeína.

### **Material e Métodos**

Para a realização deste experimento, foram utilizados quatro reprodutores suínos com capacidade reprodutiva comprovada, que estavam alojados na Fazenda São Paulo, situada no município de Oliveira, MG. Antes da coleta do sêmen dos animais, que foi realizada com auxílio de manequim, no período da manhã, pelo método da mão enluvada, realizou-se a higienização do prepúcio, por pressão manual no sentido da abertura prepucial e limpeza da região com papel toalha descartável.

Para a coleta, foi utilizado copo coletor graduado com capacidade para 500 mL, pré-aquecido a 37 °C e protegido por recipiente isotérmico. Durante esse procedimento, a separação da fração gelatinosa do ejaculado foi realizada por meio de uma camada tripla de gaze adaptada ao copo coletor, sendo coletada apenas a fração rica em espermatozoides.

No laboratório da Fazenda São Paulo, foram feitas as avaliações macroscópicas (cor, odor e aspecto) e microscópicas (motilidade e concentração) do sêmen, seguidas da diluição em BTS (Beltsville Thawing Solution®) na proporção de 1:1, o qual foi previamente mantido em banho-maria, à temperatura de 35 °C, até o momento da diluição. Ejaculados com valores acima de 90% para motilidade e 4 para vigor foram considerados para análises subsequentes.

O sêmen foi, então, transportado para o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram realizadas novamente avaliações de motilidade e vigor. Em seguida, a concentração espermática foi determinada utilizando-se o Spermacue (Minitub

do Brasil LTDA®) para a elaboração de doses inseminantes de 100 mL contendo três bilhões de espermatozoides, sempre adicionando o diluidor ao sêmen. As doses foram introduzidas em recipientes plásticos e permaneceram em temperatura ambiente, por duas horas. Em seguida, foram incubadas sob refrigeração, à temperatura de 17 °C.

As avaliações do sêmen foram realizadas antes do resfriamento e durante dois dias consecutivos, a cada 24 horas, após o reaquecimento do sêmen em banho-maria, a 37 °C, durante 15 minutos. No momento da avaliação, foram adicionadas diferentes doses de cafeína (0, 2, 4, 6 e 8 mM). Logo após a adição de cafeína (10 minutos) e após 120 minutos de incubação a 37 °C, foram analisados a motilidade, o vigor, a presença de anormalidades espermáticas (%), a taxa de resistência osmótica (TRO) e de degradação de motilidade e a viabilidade espermática.

Foi utilizado um delineamento experimental em blocos casualizados (ejaculado) em esquema fatorial 5x3 (cinco doses de cafeína e três tempos de armazenamento) com parcela subdividida no tempo (tempos de avaliação, 10 e 120 minutos de incubação) apenas para motilidade e vigor, todos com 12 repetições, cada amostra constituindo uma parcela experimental.

Também foram coletadas amostras de 1,0 mL em tubos Eppendorf para a determinação da concentração de dialdeído malônico (MDA) nos tempos 10 e 120 minutos de incubação, nos tempos 0 e 48 horas de armazenamento.

A motilidade foi avaliada por exame de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 35 °C, em microscopia de campo claro e aumento de 200x. As avaliações foram realizadas em triplicata, independentemente, por dois avaliadores e expressas em percentual de células móveis da amostra. Para o vigor, foram atribuídos valores de zero a cinco pontos em relação à intensidade do movimento progressivo dos espermatozoides, sendo os valores mais elevados indicadores de espermatozoides mais vigorosos.

A análise da presença de anormalidades espermáticas (%) foi realizada após o armazenamento de duas gotas do sêmen em solução formol-citrato (citrato de sódio 2,9 g, água destilada 100 mL e solução comercial formaldeído 35%). Foi avaliada a presença de espermatozoides anormais (alterações de cabeça, cauda, peça intermediária, formas teratológicas e presença de gota citoplasmática proximal) em 200 células aleatórias, utilizando-se um microscópio de contraste de fases em aumento de 400 vezes e a integridade acrossômica, no aumento de 1.000 vezes.

A TRO foi realizada em 1,0 mL de sêmen misturado a 1,0 mL de solução hiposmótica a 150 mOs/L (50% solução BTS e 50% de água destilada) e incubando-se, por 30 minutos, a 37 °C. Em microscopia óptica, 200 células espermáticas foram contadas, diferenciando-se as que apresentaram cauda reta (com ruptura de membrana) e cauda enrolada (membrana íntegra) (Scheid, 1993). Para o TDM foi realizada a incubação por 120 minutos e a avaliação de 2,0 mL de sêmen, a 37 °C. Em seguida, foi utilizada a seguinte equação proposta por Salgueiro et al. (2003):  $TDM (\%) = \text{vigor (a 5 minutos)} - \text{vigor (a 2 horas)} \times 100/\text{vigor (a 5 minutos)}$ .

A viabilidade espermática foi avaliada a partir da observação de um esfregaço de uma gota de sêmen misturada com eosina e nigrosina em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foi verificado o percentual de células espermáticas vivas (brancas) e mortas (rosa) em um total de 200 células (Mies Filho, 1982).

Na análise de peroxidação lipídica, as amostras foram centrifugadas a 3.360 g, durante dez minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos de Eppendorf e congelados, a -10 °C, até o dia das análises. Para a realização dessa análise, foi empregado o método enzimático colorimétrico utilizando-se um kit específico (QuantiChrom™ TBARS Assay Kit – BioAssay Systems), seguindo a metodologia especificada pelo fabricante. As amostras foram submetidas ao

leitor de ELISA, sendo mensuradas as quantidades de MDA em cada amostra, que foram expressas em  $\mu\text{M}$  equivalente.

Após o teste de normalidade e homogeneidade das variâncias (Testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System Institute). As médias obtidas com os níveis de cafeína foram submetidas à análise de regressão e o tempo de armazenamento, ao teste SNK, a 5%. Para o vigor espermático, foi utilizada análise estatística não paramétrica e as médias comparadas pelo teste Qui-quadrado, a 5%.

### **Resultados e Discussão**

A adição de cafeína (2 a 8 mM/100 mL) ao sêmen suíno antes e após o resfriamento, por até 48 horas, não alterou ( $P>0,05$ ) a motilidade espermática, aos 10 e aos 120 minutos de incubação. Houve redução ( $P<0,05$ ) da motilidade com o aumento do tempo de armazenamento (Tabela 1).

A cafeína aumenta a motilidade espermática nos ejaculados de menor qualidade (baixo vigor e motilidade) (Niwa & Ohgoda, 1988), mas em baixas concentrações (2,5-7,5  $\mu\text{M}$ ) são ineficazes em aumentar o vigor e a motilidade (Coscioni et al., 2001). Esses achados confirmam os resultados obtidos neste estudo (Tabela 1). Esse mesmo ativador metabólico foi utilizado em um estudo nas doses 0; 2,5; 5 e 7,5 mM, juntamente com outras substâncias (pentoxifilina e 2-deoxiadenosina) no diluidor, com o objetivo de avaliar o padrão de motilidade do sêmen canino descongelado. Foi observado que, aos 120 minutos de incubação, a amplitude lateral da cabeça e a velocidade curvilínea apresentaram melhores resultados na amostra seminal que continha 7,5 mM de cafeína (Milani et al., 2010).

O vigor espermático diminuiu ( $P<0,05$ ) com o passar do tempo de incubação e não se alterou com a adição de diferentes doses de cafeína no



sêmen ( $P>0,05$ ) (Tabela 1). Foi demonstrado em estudos que o vigor espermático sofre redução no sêmen suíno mantido a 37 °C, provavelmente pelo tempo de vida útil dos espermatozoides (Vasconcelos et al., 2001).

Tabela 1 Motilidade (%) e vigor espermático do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína em diferentes tempos de resfriamento (n=12)

Tempo de resfriamento (horas)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
<i>- Motilidade aos 10 minutos<sup>1</sup> -</i>						
0	81,7	80,8	82,5	82,9	82,5	82,1 A
24	75,8	75,4	77,1	75,8	76,3	76,1 B
48	74,2	75,0	74,6	74,6	74,6	74,6 B
Média	77,2	77,1	78,1	77,8	77,8	
<i>- Motilidade aos 120 minutos<sup>1</sup> -</i>						
0	74,2	71,3	72,1	72,5	68,8	71,8 A
24	66,7	67,1	67,9	64,6	65,0	66,3 B
48	64,6	62,1	62,1	62,9	65,8	63,5 C
Média	68,5	66,8	67,4	66,7	66,5	
CV (%)	4,15					
<i>- Vigor espermático aos 10 minutos<sup>2</sup> -</i>						
0	3,83	3,75	3,92	3,83	4,00	3,87 A
24	3,42	3,33	3,33	3,33	3,42	3,37 B
48	2,92 b	3,17 ab	3,25 ab	3,25 ab	3,33 a	3,18 C
Média	3,39	3,42	3,50	3,47	3,58	
<i>- Vigor espermático aos 120 minutos<sup>2</sup> -</i>						
0	3,25	3,08	3,25	3,33	3,00	3,18 A
24	2,83	2,67	2,58	2,67	2,67	2,68 B
48	2,33	2,33	2,33	2,42	2,58	2,40 C
Média	2,81	2,69	2,72	2,81	2,75	

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem, pelo teste SNK ( $P<0,05$ )

<sup>2</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem, pelo teste de Kruskal-Walis ( $P<0,05$ )

A adição de cafeína aumentou o vigor após 48 horas de armazenamento do sêmen, sendo dependente da dose ( $P < 0,05$ ). Para este fator, no período de incubação indicado, quanto maior a dose, melhor o vigor (Tabela 1).

A taxa de degradação de motilidade não apresentou diferença tanto ao longo do tempo de armazenamento ( $P > 0,05$ ) quanto com o aumento das doses de cafeína ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 Taxa de degradação da motilidade (%) e viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12)

Tempo de resfriamento (horas)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
<i>- Taxa de degradação de motilidade -</i>						
0	11,76	14,15	13,83	13,41	16,63	13,96
24	12,89	12,81	15,35	16,48	14,63	14,43
48	15,65	17,20	19,64	17,19	13,84	16,70
Média	13,43	14,72	16,27	15,69	15,03	
<i>- Viabilidade espermática -</i>						
0 <sup>1</sup>	87,79	82,04	79,21	79,63	76,38	81,01
24 <sup>1</sup>	86,21	82,25	80,04	79,92	77,96	81,28
48	83,38	82,04	81,96	81,54	82,25	82,23
Média	85,79	82,11	80,40	80,36	78,86	
CV (%)	4,40					

<sup>1</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

Foi verificada regressão linear ( $P > 0,05$ ) na viabilidade dos espermatozoides nos tempos de 0 e 24 horas de armazenamento do sêmen, para as doses de cafeína (Figura 1). Foi demonstrado em estudos que a redução da fertilidade e da viabilidade espermática das doses inseminantes submetidas à alta taxa de diluição não é totalmente conhecida, podendo ser a diluição do plasma seminal uma das possíveis explicações. A diluição do plasma seminal possui

papel importante na manutenção da viabilidade espermática, durante a estocagem (Hou et al., 2002), uma vez que apresenta complexo sistema antioxidante, que previne os danos causados pelos radicais livres sob condições fisiológicas normais. Vale ressaltar que somente o sistema antioxidante celular não é potente o bastante para prevenir a peroxidação lipídica, particularmente durante a estocagem *in vitro*, quando a produção de radicais livres pode ser resultante de mudanças metabólicas (Boe-Hansen et al., 2005).

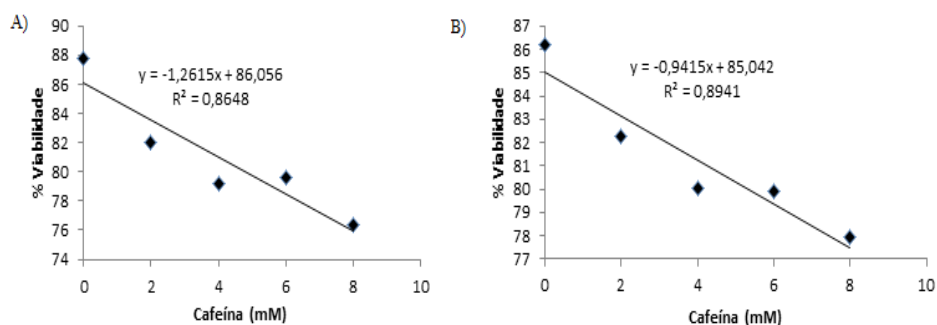


Figura 1 Viabilidade espermática do sêmen suíno nos tempos de 0h (A) e 24h (B) de incubação, tratado com concentrações crescentes de cafeína.

Não houve efeito do tempo de armazenamento ( $P > 0,05$ ) e das doses de cafeína ( $P > 0,05$ ) na taxa de resistência osmótica (Tabela 3).

Tabela 3 Taxa de resistência osmótica (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12)

Tempo de resfriamento (horas)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
0	18,0	19,3	19,1	16,3	16,3	17,8
48	21,4	23,0	18,9	23,0	20,8	21,4
Média	19,7	21,1	19,0	19,6	18,6	
CV (%)	14,25					

Não significativo ( $P>0,05$ )

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Braga et al. (2010) que, de forma semelhante, não verificaram diferença entre os níveis de cafeína e o tempo de incubação, tampouco melhora na taxa de resistência osmótica, após a adição de doses de cafeína ao sêmen resfriado utilizado em seu estudo.

Para o total de alterações espermáticas, não houve efeito do tempo de armazenamento ( $P>0,05$ ) e das doses de cafeína ( $P>0,05$ ), conforme dados da Tabela 4. Sabe-se que a morfologia da célula espermática está diretamente correlacionada com a fertilidade dos espermatozoides (Alm et al., 2006). Os resultados de estudos indicam que, mesmo no sêmen resfriado durante 72 horas, o total de alterações está dentro dos padrões considerados normais para uma dose inseminante, que é de até 20% (Lackey et al., 2002).

Tabela 4 Total de alterações espermáticas (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o resfriamento (n=12)

Tempo de resfriamento (horas)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
0	5,33	4,92	5,58	6,17	6,50	5,70
24	4,58	4,50	4,25	5,33	5,25	4,78
48	4,50	5,58	4,42	5,42	6,17	5,22
Média	4,81	5,00	4,75	5,64	5,97	

Não significativo ao teste qui-quadrado ( $P>0,05$ )

Não foram verificadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) nos níveis de dialdeído malônico do sêmen suíno (0,974 e 0,965) para as adições de diferentes concentrações de cafeína (2 a 8 mM/100 mL, respectivamente) após o resfriamento, após 48 horas de armazenamento.

Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os tratamentos, em um estudo que confirmou o efeito negativo da peroxidação lipídica e as espécies reativas ao oxigênio foi demonstrado que estes podem danificar gravemente o metabolismo, resultando na perda da motilidade espermática entre outras funções dos espermatozoides (Aitken, 1994). Além disso, a integridade da membrana espermática é essencial para a sobrevivência das células e para o seu correto funcionamento e a peroxidação lipídica é uma das causas mais deletérias para a membrana (Faustini et al., 2005). Essa peroxidação pode danificar a estrutura das organelas celulares, além da membrana plasmática e do DNA (Neild et al., 2002).

### **Conclusão**

A adição da cafeína, na concentração de 8 mM em doses inseminantes de 100 mL melhora a qualidade do sêmen somente quando adicionada 48h após o resfriamento, não devendo ser utilizada em tempos menores de armazenamento.

## Referências

- AITKEN, R.J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.6, p.128-135, 1994.
- ALM, K.; PELTONIEMI, O.A.T.; KOSKINEN, E. et al. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.3, p.210-213, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. [2012]. **Relatório ABIPECS 2011**. Available at: <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Accessed on: May 1, 2012.
- BOE-HANSEN, G.; ERSBOILL, A.K.; GREVE, T. et al. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.2006-2019, 2005.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- BRAGA, D.E.; MURGAS, L.D.S.; OBERLENDER, G. et al. Resistência osmótica e degradação da motilidade espermática do sêmen suíno diluído e armazenado a 15 °C submetido à adição de diferentes concentrações de cafeína. In: REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 23., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. (CD-ROM).
- COSCIONI, A.C.; REICHENBACH, H.D.; SCHWARTZ, J. et al. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.59-67, 2001.

- FAUSTINI, M.; TORRE, M.L.; STACCHEZZINI, S. et al. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18 8C. **Theriogenology**, v.61, p.173-184, 2004.
- HOU, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability mitochondrial activity, capacitation and acrossome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v.58, p.1349-1360, 2002.
- JIANG, C.S.; KILFEATHER, S.A.; PEARSON, R.M. et al. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysine-theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.18, n.2, p.258-262, 1984.
- LACKEY, B.R.; GRAY, S.L.; HENRICKS, D.M. Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. **Physiology Research**, v.51, n.3, p.309-311, 2002.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1982. v.5, 380p.
- MILANI, C.; FONTBONNE, A.; SELLEM, E. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**, v.74, p.153-164, 2010.
- NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. et al. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.295-298, 2002.
- NIWA, K.; OHGODA, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**, v.30, p.733-741, 1988.
- SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; SAMPAIO NETO, J.C. et al. Utilization of different extenders and methods for the freezing of

Murciano-Granadina buck semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.625-630, 2003.

SCHEID, I.R. **Manual de inseminação artificial de suínos:** procedimentos e métodos no laboratório. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1993. 48p.

VASCONCELOS, A.M.M.A.; MORAES, G.V. de; MOREIRA, I. et al. Spermatic characteristics of cooled and conserved swine semen in different diluents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.394-401, 2001.

**VERSÃO PRELIMINAR**



**ARTIGO 2 Qualidade espermática no sêmen suíno descongelado após adição de cafeína.** (Elaborado conforme as normas Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia - versão preliminar).

**Sperm quality in thawed boar semen after caffeine addition.**

Marcela Borges Nunes<sup>1,\*</sup>, Marcio Gilberto Zangerônimo<sup>1</sup>, Evandro César Pereira<sup>1</sup>, Luiz Gustavo Pessoa Rocha<sup>1</sup>, Bruno Generoso Faria<sup>1</sup>, Thiago Santos Araújo<sup>1</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>1</sup>, Raimundo Vicente de Sousa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Setor de Fisiologia e Farmacologia - DMV, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, C.P 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

\*Autor de correspondência (Tel.: +55-35-3829-1735; E-mail: [marcelaveterinaria@gmail.com](mailto:marcelaveterinaria@gmail.com))

**CONFLITOS DE INTERESSE:** Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse relacionado com este estudo.

### **Resumo**

A utilização da cafeína no sêmen suíno descongelado pode melhorar a qualidade da dose inseminante, devido ao seu potencial estimulador do metabolismo celular. Sendo assim, objetivou-se, com este estudo, avaliar a qualidade do sêmen suíno descongelado, após a adição de cafeína. Doze ejaculados provenientes de quatro animais foram coletados e armazenados em palhetas de sêmen de 0,5 mL contendo 500 milhões de espermatozoides. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados (ejaculado), com cinco tempos de avaliação após adição de cafeína (0, 15, 30, 45 e 60 minutos), com 12 repetições de um ejaculado cada. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da cafeína na motilidade e na taxa de degradação da motilidade espermática, no vigor, no total de alterações morfológicas e na viabilidade espermática. Houve interação ( $P<0,05$ ) entre as doses de cafeína e a taxa de resistência osmótica, com diminuição da taxa ao aumentar a dose do ativador. Não houve interação com o tempo de armazenamento e a dose de cafeína. Conclui-se que a adição de cafeína não melhora a qualidade do sêmen suíno descongelado.

Palavras-chave: ativador metabólico, congelamento, dose inseminante

### **Abstract**

The use of caffeine in the thawed boar semen can improve the quality of the insemination dose, due to their potential enhancer of the cellular metabolism. Therefore, the aim of this trial was to evaluate the quality of thawed boar semen after caffeine addition. Twelve ejaculates from four animals were collected and stored in 0.5 semen straws containing 500 million sperm. It was used a randomized block design (ejaculate), with five times evaluation after caffeine addition (0, 15, 30, 45 and 60 minutes), with 12 repetitions of one ejaculate. There was no effect ( $P > 0.05$ ) of caffeine on motility and degradation rate of sperm motility, vigor, in total morphological changes and in the sperm viability. There was an interaction ( $P < 0.05$ ) between caffeine doses and the osmotic resistance rate, decreasing the rate by increasing the dose of the activator. There was no interaction with the storage time and the caffeine dose. It was concluded that the caffeine addition does not improve the thawed boar semen quality.

Keywords: Metabolic activator, Freezing, Insemination dose

## Introdução

A suinocultura brasileira tem se destacado, crescendo em qualidade e em volume de produção, utilizando novas tecnologias e obtendo melhores índices zootécnicos. A produção nacional, no ano de 2011, passou de 3,24 para 3,4 milhões de toneladas, o que representa um crescimento de 4,7% em relação a 2010 (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína - ABIPECS, 2012).

O desempenho reprodutivo na espécie suína pode ser melhorado com o advento da inseminação artificial (IA), trazendo benefícios pela difusão rápida de características desejáveis no rebanho e pela redução dos custos de produção (Bortolozzo et al., 2005).

A conservação do sêmen suíno por meio do congelamento permite a sua manutenção por períodos mais prolongados, o que otimiza a técnica de IA. No entanto, o congelamento do sêmen suíno altera a capacidade fecundante dos espermatozoides (Lima et al., 2007).

Os espermatozoides suínos são sensíveis ao choque de temperatura, apresentando alterações negativas sobre a integridade de membrana e a baixa motilidade após descongelamento. O desgaste energético é uma importante causa da queda da fertilidade do sêmen suíno congelado (Katzer et al., 2004).

Substâncias como a cafeína, que inibe a enzima fosfodiesterase, a qual é responsável pela degradação AMP cíclico (cAMP), induzem a um aumento na concentração de cAMP espermático (Jiang et al., 1984). Portanto, a cafeína se destaca devido ao seu potencial estimulador do metabolismo celular. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade do sêmen suíno descongelado, após adição de cafeína.

## **Material e Métodos**

Para a realização deste experimento, foram utilizados quatro reprodutores suínos com capacidade reprodutiva comprovada, que estavam alojados na Fazenda São Paulo, situada no município de Oliveira, MG. Antes da coleta do sêmen dos animais, que foi realizada com auxílio de manequim, no período da manhã, pelo método da mão enluvada, realizou-se a higienização do prepúcio, por pressão manual no sentido da abertura prepucial e limpeza da região com papel toalha descartável.

Para a coleta, foi utilizado copo coletor graduado com capacidade para 500 mL, pré-aquecido, a 37 °C e protegido por recipiente isotérmico. Durante esse procedimento, a separação da fração gelatinosa do ejaculado foi realizada por meio de uma camada tripla de gaze adaptada ao copo coletor, sendo coletada apenas a fração rica em espermatozoides.

No laboratório da Fazenda São Paulo foram feitas as avaliações macroscópicas (cor, odor e aspecto) e microscópicas (motilidade e concentração) do sêmen, seguidas da diluição em BTS (Beltsville Thawing Solution®) na proporção de 1:1, previamente mantido em banho-maria, à temperatura de 35 °C, até o momento da diluição. Ejaculados com valores acima de 90% para motilidade e 4 para vigor foram considerados para análises subsequentes.

O sêmen foi, então, transportado para o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária da UFLA, onde foram realizadas, novamente, avaliações de motilidade e vigor. Em seguida, a concentração espermática foi determinada utilizando-se o Spermacue (Minitub do Brasil LTDA®), para a elaboração de doses inseminantes de 100 mL contendo três bilhões de espermatozoides, sempre adicionando o diluidor ao sêmen. As doses foram introduzidas em recipientes plásticos e permaneceram em temperatura ambiente

por duas horas. Em seguida, foram incubadas sob refrigeração, à temperatura de 17 °C.

As alíquotas com o sêmen que foi congelado foram processadas de acordo com a metodologia proposta para o congelamento do sêmen suíno modificada de Paquignon et al. (1974).

Imediatamente após a coleta do ejaculado e a avaliação inicial (características de volume, cor, aspecto, motilidade e vigor), o sêmen foi dividido em cinco porções contendo  $6,0 \times 10^9$  espermatozoides/tubo. Cada tubo era posteriormente centrifugado, a 1.000 rpm, por 10 minutos, para a retirada do plasma seminal. O pellet (sedimento) foi, então, ressuspensão no diluidor de resfriamento (5,67% de glicose e 22,5% de gema de ovo), até atingir 4,0 mL e concentração de  $1,5 \times 10^9$  células/mL. O sêmen diluído foi mantido à temperatura ambiente, por 120 minutos e resfriado, a 15 °C, por um período de 180 minutos. Após o resfriamento (15 °C), os tubos com 4,0 mL de espermatozoides diluídos recebiam 2,0 mL do diluidor de congelamento (91% de diluidor de resfriamento PA e 9% de glicerol) para, assim, atingirem a concentração final de  $1,0 \times 10^9$  espermatozoides/mL e 3% de glicerol. A seguir, o sêmen foi mantido, por 60 minutos, a 5 °C, tendo sido posteriormente envasado em palhetas de 0,5 mL, com concentração de  $500 \times 10^6$  células/palheta. Para o congelamento, foi utilizada a curva de proposta por Murgas et al. (2001), de 5 °C a -5 °C a 3 °C/min e de -5 °C a -140 °C a 40°C/min, com auxílio de caixa térmica com termômetro. Posteriormente, as palhetas foram introduzidas em nitrogênio líquido (-196 °C).

O descongelamento do sêmen foi realizado em banho-maria, a 50 °C, durante oito segundos. Em seguida, ele foi diluído com BTS contendo diferentes níveis de cafeína. Após o descongelamento do sêmen, as amostras eram incubadas em banho-maria, a 37 °C. O sêmen foi avaliado durante 60 minutos, após a adição da cafeína.

As avaliações do sêmen foram realizadas antes do resfriamento e em 15, 30, 45 e 60 minutos após o descongelamento do sêmen. Logo após o descongelamento, foram adicionadas diferentes doses de cafeína (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM/100 mL) e, após 15 e 30 minutos de incubação a 37 °C, foram analisados a motilidade e o vigor. A presença de anormalidades espermáticas (%), a taxa de resistência osmótica (TRO), a taxa de degradação de motilidade e a viabilidade espermática foram avaliadas após a adição de cafeína.

A motilidade foi avaliada por exame de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 35 °C, em microscopia de campo claro e aumento de 200x. As avaliações foram realizadas em triplicata, independentemente, por dois avaliadores e expressas em percentual de células móveis da amostra. Para o vigor, foram atribuídos valores de zero a cinco pontos em relação à intensidade do movimento progressivo dos espermatozoides, sendo os valores mais elevados indicadores de espermatozoides mais vigorosos.

A análise da presença de anormalidades espermáticas (%) foi realizada após o armazenamento de duas gotas do sêmen em solução formol-citrato (citrato de sódio 2,9 g, água destilada 100 mL e solução comercial formaldeído 35%). Foi avaliada a presença de espermatozoides anormais (alterações de cabeça, cauda, peça intermediária, formas teratológicas e presença de gota citoplasmática proximal) em 200 células aleatórias, utilizando-se um microscópio de contraste de fases em aumento de 400 vezes e a integridade acrossômica, no aumento de 1.000 vezes.

A TRO foi realizada em 1,0 mL de sêmen misturado em 1,0 mL de solução hiposmótica a 150 mOs/L (50% solução BTS e 50% de água destilada) e incubado, por 30 minutos, a 37 °C. Em microscopia óptica, 200 células espermáticas foram contadas, diferenciando-se aquelas que apresentaram cauda reta (com ruptura de membrana) e cauda enrolada (membrana íntegra) (Scheid, 1993). Para o TDM foi realizada a incubação por 120 minutos e a avaliação de

2,0 mL de sêmen, a 37 °C. Em seguida, foi utilizada a seguinte equação proposta por Salgueiro et al. (2003):  $TDM (\%) = \text{vigor (a 5 minutos)} - \text{vigor (a 2 horas)} \times 100/\text{vigor (a 5 minutos)}$ .

A viabilidade espermática foi avaliada a partir da observação de um esfregaço de uma gota de sêmen misturada com eosina e nigrosina, em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foi verificado o percentual de células espermáticas vivas (brancas) e mortas (rosa) em um total de 200 células (Mies Filho, 1982).

Os dados foram submetidos à análise de variância após o teste de normalidade (Shapiro Wilk) e as médias dos tempos de incubação (0, 15, 30, 45 e 60 minutos) comparadas pelo teste SNK, a 5%. As médias obtidas com os níveis de cafeína foram submetidas à análise de regressão. Para o vigor espermático, foi utilizada análise estatística não paramétrica e as médias comparadas pelo teste Qui-Quadrado, a 5%. Toda análise estatística foi realizada no pacote estatístico SAS (Statistical Analyses System Institute).

### **Resultados e Discussão**

No experimento com sêmen descongelado, não houve efeito da adição de diferentes doses de cafeína ( $P > 0,05$ ) e dos diferentes tempos de avaliação do sêmen ( $P > 0,05$ ) na motilidade espermática (Tabela 1). Foi demonstrado em estudos que o processo de congelamento-descongelamento reduz a motilidade espermática e a integridade de acrossoma pela metade (Córdova et al., 2000; Curry, 2000).



Tabela 5 Motilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)

Momento de avaliação (minutos)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	20,42	21,25	23,75	17,50	20,00	20,58
15	11,25	11,25	13,75	10,00	11,67	11,58
30	6,67	7,08	9,17	5,83	6,67	7,08
Média	12,78	13,19	15,56	11,11	12,78	

Não significativo ao teste qui-quadrado ( $P>0,05$ )

Não houve efeito da adição de cafeína ( $P>0,05$ ) e do tempo de incubação ( $P>0,05$ ) no vigor espermático (Tabela 2). A queda do vigor espermático ocorreu na medida em que se aumentou o tempo de incubação. Porém, o mesmo manteve-se constante nos primeiros 30 minutos após a adição de diferentes doses de cafeína (Silva et al., 2010).

Tabela 6 Vigor espermático (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)

Momento de avaliação (minutos)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	2,92	3,00	3,17	3,08	3,00	3,03
15	2,67	2,67	2,58	2,50	2,58	2,60
30	2,42	1,83	2,33	1,58	1,83	2,00
Média	2,67	2,50	2,69	2,39	2,47	

Não significativo ao teste qui-quadrado ( $P>0,05$ )

A taxa de resistência osmótica dos espermatozoides diminuiu com o aumento da dose de cafeína utilizada ( $P<0,05$ ). Porém, não houve diferenças para esta taxa ao longo do tempo de incubação do sêmen ( $P>0,05$ ) (Tabela 3). Os espermatozoides criopreservados são particularmente sensíveis a mudanças nas

condições osmóticas encontradas durante o congelamento, o descongelamento e o processamento do sêmen (Zavos, 1991).

Tabela 7 Taxa de resistência osmótica (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)

Momento de avaliação (minutos)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0 <sup>1</sup>	19,00 a	15,08 b	16,17 ab	14,67 b	13,67 b	15,72
60 <sup>1</sup>	12,33 a	11,00 a	12,33 a	9,92 ab	9,50 b	11,02
Média	15,66	13,04	14,25	12,30	11,59	

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

Não houve efeito das doses de cafeína (P>0,05) e do tempo de avaliação do sêmen (P>0,05) na viabilidade espermática, conforme dados da Tabela 4. Em outro estudo foi demonstrado que a utilização de níveis de cafeína no sêmen suíno descongelado (0,0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM) apresentou efeito linear decrescente para a viabilidade espermática com o aumento da concentração (Pereira et al., 2010).

Tabela 8 Viabilidade espermática (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)

Momento de avaliação (minutos)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	15,00	17,00	16,17	15,42	14,83	15,68
60	12,00	11,58	12,50	13,33	11,17	12,12
Média	13,50	14,34	14,34	14,38	13,00	

Não significativo ao teste qui-quadrado (P>0,05)

Não houve efeito das doses de cafeína utilizadas (P>0,05) e de tempo de avaliação (P>0,05) para o total de alterações espermáticas, conforme dados da

Tabela 5. Os parâmetros morfológicos de outro estudo apresentaram diferença de acordo com as diferentes concentrações de cafeína, porém, para o total de anormalidades morfológicas, aumentou com o passar do tempo (Silva et al., 2010). A elevada ocorrência de alterações morfológicas (principalmente defeitos de acrossoma) é explicada pela alta sensibilidade do sêmen suíno a baixas temperaturas e essa fragilidade de membrana pode ser devido às mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento (Antunes, 2007).

Tabela 9 Total de alterações espermáticas (%) do sêmen suíno adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento (n=12)

Momento de avaliação (minutos)	Cafeína (mM)					Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	
0	42,1	39,4	40,8	44,0	45,4	42,3
60	43,5	43,7	45,5	46,3	45,5	44,9
Média	42,8	41,5	43,2	45,2	45,5	43,6

Não significativo ao teste qui-quadrado ( $P>0,05$ )

### Conclusão

A adição de cafeína ao sêmen suíno, após sua reconstituição e reaquecimento, não apresentou melhorias na qualidade do sêmen descongelado. Em contrapartida, sua adição ainda diminuiu a taxa de resistência osmótica do sêmen com o aumento das doses utilizadas, podendo ser essa uma ressalva para a utilização desse composto ativador metabólico ao sêmen suíno descongelado. Conclui-se que a adição de cafeína ao sêmen descongelado diminui a qualidade espermática.

### Referências

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. [2012]. **Relatório ABIPECS 2011**. Available at: <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Accessed on: May 1, 2012.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

CÓRDOVA, A.I.; PÉREZ, J.F.G.; MARTÍN, R.S. Temperatura de descongelación del semen de verraco capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides congelados en pajillas de 5 ml. **Visión Técnica**, v.4, n.5, p.32-35, 2000.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

JIANG, C.S.; KILFEATHER, S.A.; PEARSON, R.M. et al. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysine-theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.18, n.2, p.258-262, 1984.

KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P. et al. Qualidade de sêmen suíno resfriado sob a influência de diluentes, da temperatura de armazenamento e da incubação prévia. **Ars Veterinaria**, v.20, n.2, p.233-241, 2004.

LIMA, F.P.; MURGAS, L.D.S.; OLIVEIRA, S.L. et al. 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**, v.31, n.5, p.1506-1511, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1982. v.5, 380p.

MURGAS, L.D.S.; SELLÉS, E.; GADEA, J. et al. Crioconservación espermática en la espécie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001. (CD-ROM).

PAQUIGNON, M.; MERGOUNIS, D.; COUROT, M. et al. Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. **Journées de la Recherche Porcine en France**, v.6, p.71-76, 1974.

PEREIRA, B.A.; ZANGERONIMO, M.G.; OBERLENDER, G. et al. Viabilidade espermática e resistência osmótica do sêmen suíno descongelado adicionado de cafeína. In: REUNIÃO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 23., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. (CD-ROM).

SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; SAMPAIO NETO, J.C. et al. Utilization of different extenders and methods for the freezing of Murciano-Granadina buck semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.625-630, 2003.

SILVA, D.M.; ZANGERONIMO, M.G.; MURGAS, L.D.S. et al. Motilidade, vigor e morfologia espermáticas de sêmen suíno descongelado adicionado de diferentes concentrações de cafeína após o descongelamento. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. (CD-ROM).

SCHEID, I.R. **Manual de inseminação artificial de suínos: procedimentos e métodos no laboratório**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1993. 48p.

ZAVOS, P.M. Principles of cryopreservation of frozen-thawed human spermatozoa: state-of-the-art. **Infertility**, v.13, p.239-246, 1991.

**VERSÃO PRELIMINAR**

## ANEXOS

### ANEXO A - Tabelas

Tabela 1 A	Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia), avaliado em diferentes tempos de incubação após adição de diferentes níveis de cafeína. ....	63
Tabela 2 A	Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia) e adicionado de diferentes concentrações de cafeína. Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y). ....	63
Tabela 3 A	Análise de variância para taxa de resistência osmótica do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia) e adicionado de diferentes concentrações de cafeína. Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y) .....	64

Tabela 10 A Análise de variância para motilidade espermática do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia), avaliado em diferentes tempos de incubação após adição de diferentes níveis de cafeína.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	4605,208333	418,655303	15,207	0,0000
Cafeína (C)	4	42,638889	10,659722	0,387	0,8176
Dia (D)	2	3983,750000	1991,875000	72,354	0,0000
C*D	8	185,694444	23,211806	0,843	0,5661
Erro 1	1	154,000	4239,583333	27,529762	
Incubação (I)	1	9765,625000	9765,625000	418,187	0,0000
I*C	4	72,916667	18,229167	0,781	0,5393
I*D	2	23,750000	11,875000	0,509	0,6023
I*C*D	8	172,083333	21,510417	0,921	0,5005
Erro 2	2	165,000	3853,125000	23,352273	

CV (%) = 4,15

Tabela 11 A Análise de variância para viabilidade espermática do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia) e adicionado de diferentes concentrações de cafeína. Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	14,697369	1,336124	8,476	0,0000
Cafeína (C)	4	2,793267	0,698317	4,430	0,0020
<i>Linear</i>	1	2,221826	2,221826	14,095	0,000
<i>Quadrática</i>	1	0,385222	0,385222	2,444	0,120
<i>Desvio</i>	2	0,186219	0,093110	0,591	0,555
Dia (D)	2	0,186102	0,093051	0,590	0,5554
C*D	8	1,575493	0,196937	1,249	0,2742
Cafeína dentro dia 0	4	2,790088	0,697522	4,425	0,0020
<i>Linear</i>	1	2,451454	2,451454	15,552	0,000
<i>Quadrática</i>	1	0,158323	0,158323	1,004	0,318
<i>Desvio</i>	2	0,180312	0,090156	0,572	0,566
Cafeína dentro dia 24	4	1,538524	0,384631	2,440	0,0490
<i>Linear</i>	1	0,807465	0,807465	5,122	0,025
<i>Quadrática</i>	1	0,278837	0,278837	1,769	0,185
<i>Desvio</i>	2	0,452222	0,226111	1,434	0,241
Cafeína dentro dia 48	4	0,040147	0,010037	0,064	0,9924
Erro	154	24,275539	0,157633		

CV (%) = 4,40



Tabela 12 A Análise de variância para taxa de resistência osmótica do sêmen suíno resfriado em diferentes tempos de armazenamento (dia) e adicionado de diferentes concentrações de cafeína. Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	11	52,303081	4,754826	12,459	0,0000
Cafeína (C)	4	1,278779	0,319695	0,838	0,5045
Dia (D)	1	0,734830	0,734830	1,786	0,1023
C*D	4	1,855082	0,463771	1,215	0,3092
Erro	99	37,782176	0,381638		

CV (%) = 14,25