

ANÁLISE COMPUTADORIZADA (CASA) E CONVENCIONAL DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CAPRINO DAS RAÇAS BOER E ALPINA NO OUTONO E PRIMAVERA

(COMPUTER-ASSISTED AND CONVENTIONAL SPERM MOTILITY ANALYSIS OF BOER AND ALPINE GOATS SEMEN IN THE AUTUMN AND SPRING)

(ANÁLISIS COMPUTADORIZADO (CASA) Y CONVENCIONAL DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO DE LAS RAZAS BOER Y ALPINA EN EL OTOÑO Y EN LA PRIMAVERA)

T. V. CAVALCANTE¹, C. R. ESPER², H. C. AZEVEDO³, M. F. CORDEIRO⁴

RESUMO

Um dos fatores limitantes da reprodução caprina é a produção e qualidade do sêmen. Na análise do sêmen, a avaliação da motilidade espermática é o procedimento mais comum usado para diagnosticar a fertilidade do macho. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da raça, indivíduo, método de avaliação e estação do ano (outono e primavera) sobre a motilidade. O sêmen foi colhido de machos caprinos das raças Boer (n=5) e Alpina (n=4), com auxílio de vagina artificial, totalizando 71 ejaculados obtidos no outono e 64 na primavera. Após a colheita, amostras de sêmen foram diluídas em PBS na concentração espermática aproximada de 50 milhões de células por mL para análise computadorizada e uma amostra diluída em solução fisiológica a 0,9% para análise convencional. As variáveis raça, bode, método e estação foram estudadas por meio de análise de variância e teste de Tukey. Não foram observadas diferenças estatísticas para raças, bem como para as estações, no entanto, dentro da raça, foi detectada diferença estatística ($p > 0,01$) para a motilidade entre bodes estudados, assim como entre os métodos de avaliação. Concluiu-se que, machos das raças Boer e Alpina, não apresentaram alteração quanto a motilidade espermática convencional e computadorizada, entre as estações, contudo, observou-se uma variação individual entre os machos, independentemente da raça.

PALAVRAS-CHAVE: Caprino. Sêmen. Motilidade espermática. CASA. Estacionalidade reprodutiva.

SUMMARY

One of the limiting factors in the caprine reproduction field is semen production and quality. To evaluate semen, the analysis of sperm motility is the most common procedure used in order to diagnose male's fertility. The aim of this work was to evaluate the effect of breed, buck, analysis method, and season (autumn and spring) on sperm motility. A total of 71 ejaculates were collected in autumn and 64 in springtime from Boer (n=5) and Alpina (n=4) bucks using an artificial vagina. After collection, semen samples were diluted in PBS (phosphate saline buffer), in order to reach a concentration of 50 million cells/mL for computer analysis. A second sample was diluted in 0.9% saline solution for conventional analysis. Data concerning different breeds, bucks, methods and seasons were analyzed by ANOVA and Tukey test. No statistical

¹ Médica Veterinária. Adjunto I. End. para correspondência: BR 153, km 132, Zona Rural, Campus de Araguaína. Araguaína - TO CEP 77804-970. End. Eletrônico: tania@uft.edu.br]

² Médico Veterinário. Prof. Adjunto - FCAV-Unesp - Campus de Jaboticabal

³ Médico Veterinário. Pesquisador CNPTC

⁴ Médica Veterinária. Pós-Graduada / doutoranda.

differences were observed in relation to breeds and seasons. However, within breeds, there was a significant statistical difference ($p > 0.01$) for sperm motility in relation to the method used for evaluation. In conclusion, conventional and computer-based sperm motility in Boer and Alpina males did not show changes regarding season, though there was an individual variation among males, which was breed independent.

KEY-WORDS: Caprine. Semen. Sperm motility. CASA. Seasonality.

RESUMEN

Uno de los factores limitantes de la reproducción caprina es la producción y calidad del semen. En el análisis del semen la evaluación de la motilidad espermática es el procedimiento más comúnmente usado para diagnosticar la fertilidad del macho. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de raza, individuo, método de evaluación y estación del año (otoño o primavera) sobre la motilidad. El semen fue recogido de machos caprinos de las razas Boer ($n=5$) y Alpina ($n=4$), con el auxilio de vagina artificial, totalizando 71 eyaculados obtenidos en el otoño y 64 en la primavera. Después de la colecta, las muestras de semen fueron diluidas en PBS para obtener una concentración espermática aproximada de 50 millones de células/ml, para el análisis computadorizado, y una muestra diluida en solución fisiológica al 0,9%, para el análisis convencional. Las variables raza, individuo, método y estación fueron estudiadas por medio del análisis de variancia y del test de Tukey. No fueron observadas diferencias estadísticas para las razas ni para las estaciones. Sin embargo, dentro de la raza, fue detectada diferencia estadística ($p < 0,01$) para la motilidad entre los machos estudiados, como también entre los métodos de evaluación. Se concluyó que machos de las razas Boer y Alpina no presentan alteraciones en la motilidad espermática convencional y computadorizada, entre las estaciones, pero se observó variación individual entre los machos, independientemente de la raza.

PALABRAS-CLAVE: Caprino. Semen. Motilidad espermática. CASA. Estacionalidad reproductiva.

INTRODUÇÃO

As relações entre as características seminais e a fertilidade têm sido investigadas em muitas espécies domésticas, com o objetivo de prever a fertilidade. Entre as diversas variáveis analisadas destaca-se a motilidade espermática.

A motilidade espermática é comumente justificada por ser uma das mais importantes características para a avaliação do potencial de fertilidade do espermatozóide. De maneira convencional, a motilidade espermática é estimada visualmente sob microscopia óptica e em análise de gota entre lâmina e lamínula. Entretanto, estudos reportam que estes tipos de análise convencional são imprecisos, mesmo quando executados por técnicos experientes. As análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores (TULI et al. 1992., ARRUDA, 2000).

Atualmente, grande atenção tem sido dada aos métodos objetivos, entre eles a análise computadorizada (*Computer-Assisted Semen Analysis - CASA*). Os programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às observações do que a habilidade do técnico em identificar padrões de motilidade espermática. O poder de análise deste tipo é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de

avaliação do sêmen (ARRUDA, 2000).

O macho caprino apresenta uma determinada estacionalidade produtiva que depende de uma série de variáveis. Essas variáveis podem ser de ordem intrínseca, destacando-se a raça, o peso e a idade; e as extrínsecas, como o fotoperíodo, a latitude, a temperatura e a alimentação (NUNES et al., 1997).

A duração do fotoperíodo parece constituir o principal fator a condicionar a estacionalidade reprodutiva (PHILLIPS et al., 1943 apud ESPESCHIT, 1998). A luz recebida pela retina dos olhos, e pelo nervo óptico, envia uma mensagem até a glândula pineal, por meio de estímulo nervoso. Essa glândula, na ausência de luz no meio ambiente, produz a melatonina que, por sua vez, estimula o hipotálamo, a hipófise e os ovários ou os testículos ao retorno da atividade reprodutiva (TRALDI, 1994).

Alterações nas características do sêmen e na libido de carneiros e bodes de diferentes raças devido a variações estacionais são assinaladas por diversos pesquisadores. As causas dessas alterações residem, em grande parte, nos diferentes fatores componentes do clima, como evidenciam trabalhos efetuados com respeito à luminosidade, à temperatura e ao regime de chuvas (NUNES, 1982). Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, os caprinos tendem a se comportar como poliéstricos estacionais, com o auge da estação reprodutiva nos meses de outono, quando os dias são mais curtos, podendo se estender até o inverno (FERRARI, 1993).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da raça, indivíduo, método de análise e estação do ano sobre motilidade espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados reprodutores caprinos das raças Boer (n=5) e Alpina (n=4) após exames clínico e andrológico normais. Os animais foram mantidos em sistema intensivo de criação, sob luminosidade natural, em uma latitude de 22°53'S e longitude 46°29'W, no município de Botucatu - SP. O sêmen foi colhido diariamente por vagina artificial de nove machos caprinos com auxílio de uma fêmea estrogeinizada nos meses de abril e maio (outono), totalizando 71 ejaculados. Nos meses de outubro e novembro (primavera), foram utilizados sete machos, sendo três da raça Boer e quatro Alpina, num total de 64 ejaculados. O sêmen colhido foi mantido em banho-maria a 37°C durante o processo de avaliação. Imediatamente após a colheita, uma amostra de 10mL de sêmen foi diluída em 600mL em meio PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a 37°C e colocado em *eppendorfs* (1,5 mL) em uma densidade espermática aproximada de 50 milhões de células por mL. Uma gota dessa diluição foi colocada na câmara de Makler pré-aquecida (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), para avaliação computadorizada da motilidade (*Computer-Assisted Semen Analyses - CASA*). As análises do sêmen foram realizadas em aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTMA – IVOS – 10, Hamilton Thorn Research, Danvers, MA, USA), cujo sistema consiste de um computador com processador *Pentium*® acoplado a um microscópio equipado com um adaptador para vídeo-câmera e dotado de lentes com magnificação de 40 e 100 vezes. Ao se dispor à amostra para a leitura e ao ajustar a intensidade da fonte de luz, as imagens dos espermatozoides são capturadas e digitalizadas a fim de serem analisadas pelo *software*. Uma amostra de 20 mL de sêmen foi diluída em 3mL de solução fisiológica 0,9% para análise convencional. Uma alíquota de 10 mL da amostra diluída foi colocada entre lâmina e lamínula em placa aquecida, quando então se procedia a avaliação convencional da motilidade (porcentagem de espermatozoides que apresentavam movimento retilíneo progressivo) numa escala de 0-100%, com aumento de 200 vezes sob microscopia de contraste de fase.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se uma análise de variância seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer para a variável estudada, motilidade convencional e computadorizada. A variável não apresentou uma

distribuição normal e, como os testes estatísticos em geral se baseiam na curva de distribuição normal do erro de determinação, por isso ela foi transformada, acordando com a transformação de Box e Cox (1964) para proporção.

$$y^t = Y^e - (1 - Y^e)^{e/\bar{e}}$$

Sendo neste caso $\bar{e} = -0,35$ e y^t a variável transformada, y variável observada.

Os dados foram analisados pelo método dos Quadrados Mínimos (HARVEY, 1960), usando o programa SAS (Statistical Analysis System, versão 6.10) através do procedimento GLM (HITTELL et al. 1991). O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ijklm} = \mu + \gamma_i + b_{ij} + e_k + m_{kl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Onde: Y_{ijklm} é a motilidade espermática da *m*-ésima amostra; γ_i é o efeito fixo da *i*-ésima raça ($i=1,2$); b_{ij} é o efeito do *j*-ésimo bode dentro da *i*-ésima raça ($i=1, j=1,2,3,\dots,5$ e $i=2, j=1,2,\dots,4$); e_k é o efeito fixo da *k*-ésima estação ($k=1,2$); m_{kl} é o efeito fixo do *l*-ésimo método de avaliação dentro da *k*-ésima estação ($k=1, l=1,2$ e $k=2, l=1,2$); μ é a média geral.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados encontram-se listados nas Tabelas de 1 a 5.

Com relação às motilidades espermáticas convencional e computadorizada não houve diferença significativa ($p>0,01$) entre as estações, bem como entre as raças estudadas. No entanto, entre os métodos de avaliação e entre os bodes as médias apresentaram diferenças significativas ($p<0,01$).

Os valores das médias ajustados por quadrados mínimos para motilidade espermática (convencional e computadorizada) nas duas estações encontram-se na Tabela 2, e entre as raças, na Tabela 3. De acordo com alguns autores, a variação na produção e característica do sêmen é causada pelo fotoperíodo e mais ou menos marcada, dependendo da latitude. Em pesquisas realizadas em zonas com latitude acima de 40°, variações na produção do sêmen são muito marcadas (CORTEEL, 1977; TULI e HOLTZ, 1992), com aumento significativo na produção do sêmen durante o decréscimo do fotoperíodo. Em latitudes entre 30 e 40° existe sazonalidade, mas não tão marcadas variações, com alta produção durante o verão e outono, e, em zonas abaixo de 30, machos caprinos não apresentam variação sazonal na produção espermática (GREYLING e GROBBELAAR, 1983). Pérez & Mateos (1996), avaliando o efeito do fotoperíodo na produção e qualidade do sêmen de dois rebanhos espanhóis em diferentes latitudes, não encontraram diferença para a motilidade espermática na raça Malagueña durante as quatro estações; para a raça Verata, observaram uma diferença somente no outono. As médias percentuais encontradas para essas raças foram 73,8±2,2 e 75,7± 1,5 (inverno), 67,0±2,7 e 74,3±1,4 (primavera), 78,2±1,7 e

76,2±1,1 (verão), 76,0±1,5 e 74,3±1,5 (outono), respectivamente.

Quanto ao método usado para avaliação da motilidade espermática, foi observada diferença significativa entre os métodos convencional e computadorizado, sendo a média estimada apresentada pela análise computadorizada superior a da convencional (Tabela 4). Em reprodutores dromedários, as porcentagens da motilidade e da concentração espermática estimadas pelo sistema analisador de movimento celular (CMA, Medical Technologies Montreux AS, Switzerland) excederam o limite superior (AL-QUARAWI et al. 2002). Iguer-Ouada e Verstegen (2001) observaram uma superestimativa para mensurações da avaliação do sêmen canino pela análise computadorizada quando comparada com a microscopia óptica padrão. Kolibianakis et al. (1992) encontraram alta correlação entre os dois métodos. No entanto, Tuli et al. (1992) encontraram baixa correlação entre a motilidade estimada convencional e a computadorizada para o sêmen bovino fresco e evidenciaram uma dissimilaridade na avaliação por diferentes indivíduos. Verstegen et al. (2002) reportaram que, embora haja uma boa correlação entre os sistemas convencional e objetivo, estimativas convencionais dos parâmetros do sêmen são afetadas por numerosos fatores, entre as quais, as variações entre observadores treinados e ensaios seriam os menos importantes. Em estudo realizado por Yeung et al. (1997) foi observada uma coerência entre os técnicos devido ao baixo coeficiente de variação apresentado entre suas avaliações e uma tendência entre eles de conferir em notas sempre menores que as apresentadas pela análise computadorizada.

Tabela 1 - Análise de Variância para a Motilidade Espermática* de Caprinos.

Fonte variação	G.L	Quadrado	P>F
		Médio	
Raça	1	190.3259	0,0540
Bode (raça)	7	359.0051	0,0001
Estação	1	12.9617	0,4077
Método (estação)	2	4763.6829	0,0001
Resíduo	258	88.471	

*variável transformada

Tabela 2 - Médias e erros padrões ajustados por quadrados mínimos para motilidade espermática convencional e computadorizada (%) caprina no outono e primavera.

Estação do ano	Motilidade (%)
Outono	84,175 (0,81) ^a
Primavera	83,707 (0,93) ^a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p>0,01)

Tabela 3 - Médias e erros padrões ajustados por quadrados mínimos para motilidade espermática convencional e computadorizada (%) caprina entre raças.

Raça	Motilidade (%)
Boer	84,86 (0,98) ^a
Alpina	83,02 (0,77) ^a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p>0,01)

Tabela 4 - Médias e erros padrões ajustados por quadrados mínimos para motilidade espermática (%) avaliada por método convencional (1) e computadorizado (2).

Método	Estação do Ano	
	Outono	Primavera
1	78,100(1,12) ^a	77,893 (1,23) ^a
2	90,251 (1,16) ^b	89,521 (1,24) ^b

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p>0,01)

A motilidade espermática entre os bodes mostrou-se diferente (p<0,01) em ambas as raças (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Tuli et al. (1992), ao observarem que as taxas de motilidades avaliadas pelos métodos convencional e objetivo diferiram entre ejaculados de diferentes bodes. O mesmo foi observado por Pérez e Mateos (1996) estudando as características seminais das raças Malagueña e Verata, e por Farrell et al. (1998) em touros, nos quais o efeito individual foi a maior variação no estudo das características espermáticas.

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a motilidade espermática de bodes das raças Boer e Alpina não sofrem alteração em diferentes períodos de colheita, o mesmo ocorrendo entre as raças. Existe uma grande variação entre os animais estudados dentro da mesma raça. Os métodos utilizados para a avaliação da

Tabela 5 - Médias e erros padrões ajustados por quadrados mínimos para a motilidade espermática (%) de diferentes bodes das raças boer (1) e alpina (2).

Bode	Raça	Motilidade (%)
1	1	83,077 (1,80) ^{abc}
2	1	84,552 (3,19) ^{abc}
3	1	88,525 (1,56) ^a
4	1	82,328 (2,42) ^c
5	1	85,822 (1,61) ^{ab}
6	2	86,562 (1,66) ^{ab}
7	2	82,566 (1,52) ^{bc}
8	2	85,626 (1,46) ^{ab}
9	2	77,333 (1,56) ^c

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,01$)

motilidade espermática convencional e a computadorizada foram significativamente diferentes, embora a média encontrada para a motilidade convencional esteja dentro do limite permitido para processamento (CBRA, 1998). Conclui-se que a análise computadorizada mostrou-se prática, rápida e de fácil execução, tendo como principal vantagem a precisão e repetibilidade, o que reduz ou exclui a subjetividade da avaliação espermática convencional em caprino, a motilidade espermática é semelhante nas raças Boer e Alpina criadas sob as mesmas condições, a estação do ano (outono e primavera) não influenciou a motilidade espermática entre as raças estudadas e que há grande variação individual da motilidade espermática entre os reprodutores caprinos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro. À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Câmpus de Botucatu e ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa por disponibilizar o equipamento para as análises computadorizadas e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo por ceder as instalações para alojar os animais e o laboratório. Ao doutorando (Unesp-Jaboticabal) Alex Sandro Campos Maia pelas análises estatísticas

ARTIGO RECEBIDO: Agosto/2003
APROVADO: Dezembro/2004

REFERÊNCIAS

AL-QUARAWI, A. A., ABDEL-RAHMAN, H. A., EL-MOUGY, S. A., EL-BELELY, M. S. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.74, p.1-9, 2002.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, SP, 2000. 121p. Tese (Livre Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo.

BOX, G. E. P., COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, p.211-252, 1964.

CORTEEL, J. M. Production, storage and insemination of goat semen. In: MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS SYMPOSIUM, Madison, 1977. **Proceedings...** p.41-57.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, manual, Belo Horizonte, 1998. 49p.

ESPESCHIT, C. J. B. Alternativas para controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 5., Botucatu, SP, 1. **Anais...** p.7-33.

FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C., FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FERRARI, S. **Dois tipos de diluidores e dois métodos de congelamento de sêmen de caprinos (*Capra hircus*, LINNANEUS, 1758)**. São Paulo, SP, 1993. 74 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GREYLING, J. C., GROBBELLAAR, J. A. N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goats ram using different collection techniques. **Sul African Journal Animal Science**, v.13, n.4, p.250-252, 1983.

- HARVEY, W. R. **Least-squares analysis of data with unequal subclass numbers**. Washington: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1960. 157p.
- HITTELL, R. C., FREUND, R. J., SPECTOR, P. C. **SAS[®] System for Linear Models**. 3. ed. Cary, NC: SAS Institute, 1991. 239p.
- IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the "Hamilton-thorn computer-based automated system" for dog semen analyses. **Theriogenology**, v.53, p.733-749, 2001.
- KOLIBIANAKIS, E. M., TARLATZIS, B. C., BONTIS, J., PAPADIMAS, J., SPANOS, E., MANTALENAKIS, S. Evaluation of Hamilton-thorn automated semen analysis system. **Archives of Andrology**, v.28, p.213-222, 1992.
- NUNES, J. F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: EMBRAPA, 1982. 41p. (Circular técnica, 5).
- NUNES, J. F., CIRÍACO, A. L. T., SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2. ed. Fortaleza, Editora Gráfica LCR, 1997.
- PÉREZ, B., MATEOS, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. **Small Ruminant Research**, v.23, p23-28, 1996.
- SAS INSTITUTE. **Suser's guide: Statistics**. Version 6.10 edition. Cary, 1995. 295p.
- TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**; manual. São Paulo, SP. 1994. 54p.
- TULI, R. K., SCHMIDT-BAULAIN, R., HOLTZ, W. Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. **Theriogenology**, v.38, p.487-490, 1992.
- TULI, R. K., HOLTZ, W. Seminal characteristics of Boer goat bucks as affected by months and seasons of the year. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ON GOATS, New Delhi, India, 1992. **Proceedings...** p.311.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p149-179, 2002.
- YEUNG, C., COOPER, T. G., NIESCHLAG, E. A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments analysis. **Fertility and Sterility**, v.67, n.6, p.1156-1158, 1997.