

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUALIDADE DO SÊMEN DE REPRODUTORES CAPRINOS PORTADORES DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE) ATRAVÉS DE ESPERMOGRAMA.

Renato Mesquita Peixoto¹; Maria Layris Melo de Oliveira²; Ana Dalila Pereira Lima³; Nikaelyson Jonh
Marcos Batista⁴; Raymundo Rizaldo Pinheiro⁵; Alice Andrioli⁶

Resumo

Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade do sêmen de animais portadores do CAEV através de espermograma completo. Foram realizadas 17 coletas alternadas ao longo de cinco meses (março a julho de 2013), utilizando-se de 10 reprodutores caprinos, dos quais quatro da raça Anglo-nubiano e seis Saanen, com idade entre 12 e 24 meses divididos em dois grupos (jovens-negativos e adultos-positivos para CAE) com cinco animais cada, submetidos à coleta artificial de sêmen por meio de vagina artificial, modelo curto, conjugado como uma fêmea com estro induzido. À medida que o sêmen era coletado o mesmo era destinado ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen para realização do espermograma, onde se quantificaram os seguintes parâmetros: volume (mL), concentração espermática ($\times 10^9$ sptz/mL), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), e vigor (0-5) de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998) e os valores devidamente anotados nas fichas de avaliação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, considerando os ejaculados como sendo as repetições (N=170) e os grupos (negativo e positivo) os tratamentos. Os resultados dos parâmetros reprodutivos avaliados (volume, concentração, vigor e motilidade) nos dois grupos foram expressos por meio de média e desvio padrão de cada animal e por grupo, sendo tais médias comparadas pelo Teste de T de Student a 5% de significância. Pode-se observar que entre os animais de ambos os grupos não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles, e todos se encontram com as características seminais, exceto o volume no grupo dos jovens negativo, dentro dos padrões do CBRA (1998). Reprodutores caprinos portadores do CAEV não têm suas características seminais interferidas, pois mesmo apresentando a doença encontram-se com sêmen fértil e dentro da normalidade, porém com chances de transmissão da doença.

Palavras-chave: Caprino; CAEV; espermograma

Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença infectocontagiosa, multissistêmica, de caráter degenerativo, causada por um vírus da família *Retroviridae*, pertencente ao gênero *Lentivirus* que independente de idade, raça e sexo acomete caprinos sob as mais diferentes fases de desenvolvimento (Lara, et al., 2005). Tal doença proporciona uma debilitação progressiva do organismo do animal, sendo caracterizada por artrite, mastite, leucoencefalomielite e pneumonia, proporcionando uma redução dos parâmetros produtivos e reprodutivos (Brito, 2009).

O vírus da artrite encefalite caprina tem preferência por atingir células do sistema monócito-fagocitário (East, 1993), sendo que uma vez infectado o vírus permanece nos macrófagos durante toda a existência do animal, mesmo ocorrendo produção de anticorpos pelo hospedeiro (Pugh, 2004). A contaminação pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) pode se dar, logo após o parto, de forma direta por meio da ingestão de colostro e/ou leite de fêmeas infectadas ou ocorrer de forma indireta através de objetos contaminados. Além dessas principais vias de transmissão, detectou-se que em pequenos ruminantes vários patógenos estão presentes no sêmen, em especial no plasma seminal, com transmissão potencial ou comprovada, e dentre esses estão presentes os lentivírus que infectam caprinos (Andrioli et al., 1999; Travassos et al., 1999), o que acarreta perdas substanciais na produção principalmente quando se trata de reprodutores de alto potencial genético.

Dessa maneira, o controle da doença passa a ser de enorme dificuldade tendo em vista a falta de uma vacina eficaz e a ampla abrangência desta enfermidade em rebanhos de excelente qualidade zootécnica e de alto valor genético e econômico (Gregory, et al., 2011). E como muitos dos animais portadores podem se apresentar assintomáticos, a realização de diagnósticos para detectar e isolar os animais portadores da CAE passa a ser o mais importante meio de controle de disseminação da doença no rebanho, sendo esse diagnóstico baseado na sorologia preferencialmente por meio de prova de imunodifusão em gel de agarose (IDGA; Tigre et al., 2006).

Diante desta situação e tendo em vista que ao escolher um reprodutor é necessário avaliar sua potencial fertilidade por meio de exames clínicos e laboratoriais, que a realização de um espermograma por meio de parâmetros tradicionais como vigor,

motilidade, concentração e morfologia espermática é de grande valor por avaliar a funcionalidade testicular e epididimal, bem como permitir eliminar casos evidentes de infertilidade, ou até mesmo de subfertilidade potencial (Paula, et al., 2008). Além do mais, o espermograma pode determinar o nível de normalidade do sêmen, e consequentemente se o mesmo é fértil, passível de ser processado e utilizado em uma inseminação artificial ou fertilização *in vitro* (FIV; Rodríguez-Martínez, 2006, 2007).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a qualidade do sêmen de animais portadores do CAEV através de espermograma completo.

Material e Métodos

O experimento foi realizado, na Embrapa Caprinos e Ovinos, situada em Sobral-CE, nordeste do Brasil, à latitude de 3° 42' sul e longitude de 40° 21'. Foram realizadas 17 coletas alternadas ao longo de cinco meses (março a julho de 2013), utilizando-se de 10 reprodutores caprinos, dos quais quatro da raça Anglo-nubiano e seis Saanen, com idade entre 12 e 24 meses divididos em dois grupo (jovens-negativo e adultos-positivo para CAE) com cinco animais cada, submetidos à coleta artificial de sêmen por meio de vagina artificial, modelo curto (Mies Filho, 1962), conjugado como uma fêmea, como manequim, com estro induzido por meio da aplicação de 1 mL de benzonato de estradiol aplicado 48 horas antes da coleta de sêmen e imobilizada num tronco, de forma a facilitar a monta e a coleta. Deve-se ressaltar que primeiramente realizavam-se as coletas do grupo negativo, e posteriormente o do grupo positivo, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação pelo CAEV.

Os animais eram mantidos em regime intensivo de produção, sendo sua alimentação durante o período experimental (150 dias) constituída de concentrado (300 g/animal) e volumoso a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e fornecido no cocho, além de água e sal mineral *ad libitum*.

À medida que o sêmen era coletado o mesmo era destinado ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen para realização do espermograma, onde se quantificaram os seguintes parâmetros: volume (mL), concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), e vigor (0-5) de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998), sendo os valores devidamente anotados nas fichas de avaliação. Após cada coleta,

colocou-se o sêmen em banho-maria a 37 °C e determinou-se o volume do ejaculado, imediatamente, através da graduação do tubo coletor. Em seguida, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecida à 37 °C e observada em microscópio óptico com aumentos de 10 a 40x, verificaram-se a motilidade progressiva retilínea (percentual) e o vigor espermático (escala de 0 a 5). Posteriormente, acrescentaram-se 50 µL do sêmen em 10 mL de solução fisiológica formolizada a 0,1% tamponada (Hancock, 1957) para contagem das células espermáticas, utilizando-se espectofotômetro, e determinação da concentração espermática por mL e no ejaculado total.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, considerando os ejaculados como sendo as repetições (N=170) e os grupos (negativo e positivo) os tratamentos. Os resultados dos parâmetros reprodutivos avaliados (volume, concentração, vigor e motilidade) nos dois grupos foram expressos por meio de média e desvio padrão de cada animal e por grupo, sendo tais médias comparadas pelo Teste de T de Student a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da avaliação *in vitro* do sêmen dos reprodutores caprinos negativos (jovens) e positivos (adultos) para o CAEV por meio de espermograma estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Espermograma de reprodutores caprinos jovens negativos e adultos positivos para o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV).

	Negativo	Positivo
Volume (mL)	0,56 ± 0,26a	0,98 ± 0,39a
Concentração (x 10 ⁹)	4,20 ± 1,04a	4,36 ± 0,50a
Motilidade Espermática (%)	84,12 ± 10,06a	85,97 ± 6,64a
Vigor (0-5)	4,13 ± 0,63a	4,15 ± 0,58a

Valores seguidos de letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística pelo Teste de T de Student a 5% de significância.

Entre os animais dos grupos positivo e negativos não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre eles, e todos se encontram com as características seminais,

dentro dos padrões (volume: 0,8; concentração: 2×10^9 ; motilidade espermática: 80% e vigor: 3) recomendados para caprinos preconizado pelo CBRA (1998), exceto o volume no grupo dos jovens negativo, que foi, em média, abaixo do padrão. O fato do volume médio ($0,56 \pm 0,26$) encontrado nesse experimento para animais jovens não estar de acordo com o recomendado pelo CBRA (1998) pode estar relacionado à existência de uma quantidade menor de células de Leydig, aliado a uma menor produção de testosterona, que reduzirá o desenvolvimento das glândulas acessórias e, conseqüentemente, leva ao menor volume seminal (Santos, et al, 2006).

Mas, mesmo assim o volume espermático do grupo dos jovens negativos ($0,56 \pm 0,26$) registrado nesse trabalho está entre os valores médios (0,2-1,5 mL) para caprinos citados por Aisen (2008) e Salviano e Souza (2008), e ainda apresentam-se similares aos registrados por Santos, et al., 2006 ($0,4 \pm 0,2$).

Os demais parâmetros avaliados, concentração espermática ($4,20 \times 10^9$ e $4,36 \times 10^9$ espermatozoides/mL), motilidade ($84,12 \pm 10,06$ e $85,97 \pm 6,64$) e vigor ($4,13 \pm 0,63$ e $4,15 \pm 0,58$) do grupo negativo e positivo para CAE, respectivamente, registrados nesse trabalho, além de estarem de acordo com o CBRA (1998) foram similares aos resultados de Teixeira (2008) em estudo sobre parâmetros espermáticos de caprinos da raça Anglo-Nubiana no nordeste do Brasil e superiores aos valores encontrado por Dantas, et al., 2011, os quais obtiveram valores variando de 2,7 a $3,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL para concentração espermática, de $67,667 \pm 23,35$ à $73,804 \pm 17,39$ para motilidade e ainda de $4,00 \pm 1,15$ à $4,00 \pm 1,12$ para vigor quando estudaram as variações das características seminais de bodes Saanen no Mato Grosso do Sul, o que de certo modo, pressupõe que animais da raça Anglo-Nubiana e Saanen estão adaptadas ao semiárido nordestino ao ponto de apresentarem características seminais de animais férteis.

Para todos os parâmetros seminais os animais adultos portadores do vírus do CAEV apresentaram superiores aos animais jovens não portadores do vírus, podendo atribuir esse acontecimento a maior atividade das glândulas acessórias nos animais adultos (Santos, et al., 2006). Além disso, esse acontecimento demonstra que o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) não interferiu nos parâmetros espermáticos, bem como na funcionalidade testicular e epididimal, indicando a fertilidade dos animais.

Conclusão

Reprodutores caprinos portadores do CAEV não têm suas características seminais suprimidas pelo vírus, pois mesmo apresentando a doença, encontram-se com sêmen fértil e dentro da normalidade, porém as chances de transmissão da doença impede o uso desses reprodutores ou ainda de seu sêmen em biotecnologias reprodutivas, embora sejam animais de alto valor genético.

Agradecimentos

A FUNCAP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado; à Embrapa Caprinos e Ovinos pela disponibilidade de espaço técnico e suporte a realização desta pesquisa; à equipe do Laboratório de Tecnologia de Sêmen, em especial ao Laboratorista José Nóbrega Medeiros por tornar viável a realização das análises do sêmen e a minha orientadora a Prof.(a) Dra. Alice Andrioli pela amizade, compreensão e experiência.

Referências

- AISEN, E.G. **Reprodução Ovina e Caprina**. 1ª Ed. São Paulo: Ed. MedVet. 2008.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. et al. Detecção do DNA proviral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 420 - 421, 1999.
- BRITO, R.L.L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 85f (Dissertação de Mestrado) - Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- DANTAS, V.M.; SOUZA, M.I.L.; MONREAL, A.C.D. et al. Variações anuais nas características seminais, perímetro escrotal e testosterona plasmática em bodes Saanen no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.5, n.1, p.9-19, 2011.
- EAST, N.E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.10, p.251- 262, 1993.
- GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; HASEGAWA, M.Y. et al. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina no Sêmen através das técnicas de PCR e Nested-PCR. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.4, p.599-603, out./dez., 2011.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L. et al. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.736-740, 2005.

- MIES FILHO, A. Novo modelo de vagina artificial para ovinos. **Revista da Faculdade de Agronomia do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v.5, p.187-193, 1962.
- PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S. et al. **Reprodução no Macho Caprino: Análise Básica e Aplicada**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008. 30p. Documentos, 79.
- PUGH, D.C. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1ed. São Paulo: Roca, 2004. 513p.
- RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reprodução Domestica Animal**, v.41, suppl.2, p.2-10, 2006.
- RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reprodução Fertilidade Development**, v.19, p.91-101, 2007.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008.
- SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. et al. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1926-1933, 2006
- TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento do vírus da Artrite-encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.5, p100-108, 2006.
- TEIXEIRA, A.V.C. **Estudo dos parâmetros espermáticos e das proteínas seminais de caprinos da raça anglo-nubiana no Nordeste do Brasil**. 2008. 60 f (Dissertação de Mestrado) - Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2008.
- TRAVASSOS, C.E.; BENOÎT, C.; VALAS, S. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v.32, p.101-106, 1999.

¹ Discente do Programa de Pós-graduação em Zootecnia UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos. Bolsista FUNCAP. Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E-mail: renato_miraima@hotmail.com

² Discente do Curso de Biologia. Bolsista CNPq. Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E-mail: marialayris@hotmail.com

³ Discente do Curso de Zootecnia. Bolsista FUNCAP. Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. E-mail: anadalila.2@gmail.com

⁴ Discente do Curso de Medicina Veterinária. Bolsista FUNCAP. Instituto de Teologia Aplicada –INTA. E-mail: nick_batista92@hotmail.com

⁵ Co-orientador. Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: rizaldo.pinho@embrapa.br

⁶ Orientadora. Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: alice.andrioli@embrapa.br