

Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (*Pecari tajacu*)

Relationship between Neubauer counting chamber and spectrophotometer used for the sperm concentration determination in collared peccaries (*Pecari tajacu*)

Andréia Maria da Silva¹ Gislayne Christianne Xavier Peixoto¹
José Artur Brilhante Bezerra¹ Thiberio de Souza Castelo¹
Erika Aparecida Araújo Santos¹ Alexandre Rodrigues Silva^{*}

RESUMO

Em ejaculados provenientes de 28 catetos, verificou-se a existência de relações entre a concentração espermática determinada por meio da câmara de Neubauer e a transmitância observada por espectrofotometria, utilizando comprimentos de onda variando de 530 a 590nm. Os ejaculados apresentaram uma concentração média de $283,9 \pm 30,8 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} , com variação de 30 a 640×10^6 espermatozoides mL^{-1} . Os valores para transmitância variaram entre 36,9 a 96,3, nos diferentes comprimentos de onda. Não foram detectadas relações significativas entre os dois métodos ($P > 0,05$). Dessa forma, não se recomenda a espectrofotometria para os procedimentos de rotina na determinação da concentração espermática em catetos.

Palavra-chave: espectrofotometria, cateto, concentração espermática, *Tayassu tajacu*.

ABSTRACT

In ejaculates derived from 28 collared peccaries, we verified the existence of relationships between sperm concentration determined by the Neubauer counting chamber and the transmittance verified by spectrophotometer, under wavelengths varying from 530 to 590nm. Ejaculates presented a concentration of $283.9 \pm 30.8 \times 10^6$ sperm mL^{-1} , varying from 30 to 640×10^6 sperm mL^{-1} . Values for transmittance varied from 36.9 to 96.3, under different wavelengths. No significant relationship was verified between two methods ($P > 0.05$). Thus, the spectrophotometer is not recommended for routine procedures of sperm concentration measurement in collared peccaries.

Key words: spectrophotometer, collared peccary, sperm concentration, *Tayassu tajacu*.

INTRODUÇÃO

Os *Pecari tajacu*, popularmente conhecidos como catetos, caititus ou porcos-do-mato, têm sido

criados comercialmente com objetivos econômicos, podendo representar, em algumas regiões da América Latina, uma importante forma de desenvolvimento sustentável (MIRANDA et al., 2010). Nesse sentido, o conhecimento dos aspectos reprodutivos de espécies silvestres constitui um dos fatores de maior importância, afetando diretamente a eficiência e a rentabilidade dos sistemas produtivos (MOLLINEAU et al., 2008).

A correta determinação da concentração espermática (CE) no ejaculado possibilita a adequação na produção de doses utilizadas em um programa de inseminação artificial. Por outro lado, a mensuração incorreta deste parâmetro pode levar a problemas na identificação de infertilidade ou, ainda, gerar prejuízos econômicos para um sistema de produção (OLDENHOF et al., 2010). Diferentes formas de se determinar a CE nos ejaculados já foram descritas. As câmaras de contagem celular, cujo coeficiente de variação é em torno de 10% (SOKOL et al., 2000), têm sido comumente aplicadas à avaliação do sêmen suíno (MAES et al., 2010), espécie mais filogeneticamente próxima aos catetos (THEIMER & KEIM, 1998), para os quais o método tem sido adaptado (KAHWAGE et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012).

Por outro lado, a espectrofotometria representa um método alternativo e preciso, sendo também utilizada eficientemente na determinação da CE em suínos (CORCINI et al., 2011). Este método oferece uma rápida estimativa do número de espermatozoides e evita a variabilidade dos resultados entre uma mesma leitura (CIERESZKO

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), 59625-900, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: alexrs@ufersa.edu.br. *Autor para correspondência.

& DABROWSKIB, 1993). Dentre os fatores que podem interferir na acurácia da determinação da CE por espectrofotometria, a depender do equipamento utilizado e das características da célula, destaca-se o comprimento de onda adotado, sendo que, para suínos, tem sido utilizada uma variação de ondas entre 530 a 595nm (CAMUS et al., 2011).

Apesar da praticidade, não existem relatos da utilização de espectrofotometria para a avaliação da CE em catetos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de relações entre a câmara de Neubauer e a espectrofotometria, sob diferentes comprimentos de onda, visando à validação desta última para a determinação da CE no sêmen de catetos coletados por eletroejaculação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 28 catetos machos adultos, com idade de $3,9 \pm 1,2$ anos, pesando $20,7 \pm 1,3$ kg, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS – IBAMA nº12.492-004) da UFERSA. Durante o experimento, que foi realizado entre março e julho de 2013, os animais permaneceram isolados das fêmeas, e mantidos ao ar livre em piquetes (20x3m) coletivos, com área coberta de 3x3m, submetidos a um fotoperíodo natural de aproximadamente 12 horas. Sua alimentação foi a base de uma dieta composta de milho (79,8%), farelo de soja (15,4%), farelo de trigo (1,45%), cálcio (2,6%), vitaminas (0,2%) e premix de minerais (0,05%), complementada com frutas tropicais, como o melão. A água foi fornecida *ad libitum*.

Contenção e coleta do sêmen

Após um jejum alimentar e hídrico de 12 horas, os animais foram contidos com o auxílio de um puçá. Em seguida, realizou-se a contenção química por meio da administração intravenosa de propofol (Propovan[®], Cristália, Fortaleza, Brasil), em bolus, na dose de 5mg kg^{-1} (SOUSA et al., 2009). Quando o animal apresentava sinais de despertar, o propofol era fornecido novamente ($1,25 \text{mg kg}^{-1}$), permitindo assim, o prolongamento da anestesia.

Para a coleta dos ejaculados, utilizou-se um eletroejaculador portátil (Autojac[®], Neovet, Campinas, Brasil), com eletrodo retal composto por fibras longitudinais previamente lubrificadas. Foi utilizado um protocolo contínuo de eletroejaculação (CASTELO et al., 2010), iniciado com dez repetições de 5V, sendo a intensidade aumentada em 1V, até serem atingidos 12V. Nesta voltagem, os estímulos

continuaram até o tempo máximo de 10 minutos, quando o procedimento era finalizado. O sêmen foi coletado em tubos plásticos (50mL) e imediatamente avaliado.

Avaliação do sêmen

As amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume, aspecto e coloração. A motilidade (%) e o vigor espermáticos (0-5) foram avaliados por microscopia (100x). Esfregaços corados com azul de bromofenol foram preparados com 5 μ l de sêmen para avaliação da integridade estrutural da membrana, tendo sido contadas 200 células por lâmina sob microscopia (400x). A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST), usando-se água destilada (0mOsm L⁻¹ - PEIXOTO et al., 2012).

Determinação da concentração espermática

Para a obtenção da concentração espermática (CE), uma amostra de 5 μ l de sêmen foi diluída em 1ml de solução de formalina tamponada (diluição de 1:200), seguida da homogeneização cautelosa da mistura. Uma pequena alíquota (10 μ l) foi colocada na câmara de contagem celular de Neubauer até o seu completo preenchimento (PEIXOTO et al., 2012), sendo posteriormente avaliada sob microscopia de luz (400x).

Determinação da tramitância por espectrofotometria

No intuito de se determinar a tramitância correspondente à concentração espermática de cada amostra, uma alíquota de 0,6mL de sêmen foi diluída em 5mL de solução salina formolizada a 0,1%, e posteriormente analisada em espectrofotômetro (SP 22[®], Biospectro, Belo Horizonte, Brasil). Neste equipamento, procedeu-se a leitura da tramitância sob diferentes comprimentos de onda: 530, 540, 550, 560, 570, 580 e 590nm. Ressalta-se que a tramitância corresponde à quantidade de luz que a célula permite passar através de si.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e erro padrão e analisados utilizando-se o programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para se comparar os resultados médios de tramitância obtidos em cada comprimento de onda, foi utilizado o teste PLSD de Fisher ($P < 0,05$). Para determinar a existência de relações entre a CE (variável independente) determinada na câmara de Neubauer e as tramitâncias obtidas por cada comprimento de onda (variáveis dependentes), foi aplicado o teste de

regressão simples e, em seguida, foi determinada a equação representativa por este mesmo teste ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Foram obtidos 28 ejaculados, sendo um de cada animal utilizado. O sêmen coletado apresentou volume médio de $2,6 \pm 0,2$ ml, com coloração variando de translúcida a branca e aspecto aquoso. Na tabela 1, são mostrados os valores referentes às demais características microscópicas dos ejaculados.

A análise dos dados obtidos possibilitou a elaboração de gráficos de dispersão estabelecidos entre a CE mensurada pela câmara de Neubauer e os valores de tramitância correspondentes, obtidos por espectrofotometria, em cada um dos comprimentos de onda, sendo geradas as equações de regressão. A partir destas, entretanto, verificaram-se baixas relações entre a CE e a tramitância, em todos os comprimentos de onda utilizados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar o uso da espectrofotometria para a determinação de CE em catetos, tendo sido verificada uma baixa e não significativa relação entre a referida técnica e os resultados obtidos pela câmara de Neubauer. De acordo com as relações apresentadas entre os métodos, poder-se-ia inferir que a espectrofotometria promove uma superestimação da CE em catetos. De fato, MURGAS et al. (2010) já haviam alertado que, apesar dos métodos baseados em densidade óptica, como a espectrofotometria, serem julgados mais objetivos e eficientes, deve-se considerar a superestimação dos dados, a qual pode propiciar número menor que o ideal de espermatozoides necessários à fertilização em doses inseminantes, além de induzir a adição excessiva de diluentes (LU et al., 2007).

Nos suínos, tem sido verificada uma contradição com relação ao uso da espectrofotometria

para determinação da CE. Resultados similares aos do presente estudo foram descritos por VIANNA et al. (2004) que, utilizando a câmara de Neubauer e a espectrofotometria sob um comprimento de onda de 520nm, sugerem que esta técnica tende a subestimar os valores de CE quando comparada à primeira, não sendo portanto recomendada para a espécie (VIANNA et al., 2004). Por outro lado, CAMUS et al. (2011), utilizando sistemas ópticos com comprimentos de onda variando de 530 a 595nm, sugeriram que ambos são acurados e apresentam baixa variação, quando utilizados para a mensuração da CE em suínos. Inclusive, estes autores utilizaram uma câmara de Thoma para a contagem celular, sendo esta considerada como uma referência padrão, mas afirmaram que ela mostrou-se ser o método menos preciso de todas as técnicas estudadas.

Sabe-se que a determinação da CE por espectrofotometria baseia-se na densidade da amostra, que sofre interferência da presença, além de espermatozoides, de células de descamação, leucócitos e sujidades, o que causa aumento da turbidez do ejaculado, gerando uma superestimativa da concentração espermática (DOUGLAS-HAMILTON et al., 2005). Ainda, sabe-se que o ejaculado dos catetos é naturalmente formado por três frações, sendo a primeira límpida e contendo poucos espermatozoides, a segunda possuindo maior quantidade destas células e a terceira composta por uma fração gel (HELLGREEN et al., 1989). Porém, a eletroejaculação não promove a separação adequada das frações, permitindo a mistura destas, causando a formação de grumos na amostra (DOUGLAS-HAMILTON et al., 2005). Assim, é possível que a presença de grumos da fração gel nos ejaculados dos catetos possa ter influenciado negativamente a leitura das amostras por meio da espectrofotometria.

Uma possível opção prática e fidedigna para a determinação da CE em catetos seria o equipamento denominado NucleoCounter™ (ChemoMetec, A/S, Allerød, Denmark), que tem sido utilizado em suínos por possibilitar a

Tabela 1 - Características microscópicas dos ejaculados de catetos (*Pecari tajacu*) coletados por eletroejaculação (n=28)

Parâmetros	Valores (média \pm EP)	Valores mínimos e máximos
Concentração (n° espermatozoides $\times 10^6$ mL ⁻¹)	283,9 \pm 30,8	30 - 640
Motilidade (%)	93,4 \pm 1,1	80 - 100
Vigor (0 a 5)	4,6 \pm 0,2	1 - 5
Integridade estrutural de membrana (%)	81,4 \pm 1,4	65 - 89
Integridade funcional de membrana (%)	79,8 \pm 7,3	75 - 91

Tabela 2 - Valores médios (\pm EP), máximos e mínimos para tramitância determinada por espectrofotometria, utilizando diferentes comprimentos de onda, e seu coeficiente de relação (R^2) com a concentração espermática determinada pela câmara de Neubauer em ejaculados de catetos (*Pecari tajacu* – n=28).

Comprimento de onda (nm)	Média \pm EP*	Valores mínimos e máximos	R^2	P
530	62,8 \pm 3,2	37,3 - 94,0	0,345	0,0724
540	63,1 \pm 3,1	32,6 - 94,6	0,351	0,0672
550	63,0 \pm 3,2	37 - 94,7	0,341	0,0758
560	63,2 \pm 3,2	37,2 - 95,1	0,338	0,0790
570	63,1 \pm 3,2	36,9 - 94,6	0,359	0,0608
580	62,4 \pm 3,2	36,9 - 95,4	0,289	0,1364
590	64,8 \pm 3,6	37,2 - 96,3	0,420	0,0512

* Não foi verificada diferença significativa quanto à tramitância determinada pelos diferentes comprimentos de onda ($P>0,05$).

marcação do núcleo celular através de fluoróforos específicos para o DNA (CAMUS et al., 2011). Entretanto, em equinos, foi sugerido que o equipamento pode erroneamente contabilizar, além dos espermatozoides, outros tipos celulares, como células de descamação e leucócitos, levando também a uma superestimação da CE (COMERFORD et al, 1998).

Finalmente, faz-se necessário ressaltar que, no tocante às demais características espermáticas, todas estavam dentro da normalidade para a espécie, conforme parâmetros de referência estabelecidos em animais coletados por eletroejaculação, relatados por PEIXOTO et al., (2012).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se não existirem relações significativas entre a concentração espermática de catetos determinada pela câmara de Neubauer e a tramitância verificada por espectrofotometria sob diferentes comprimentos de onda. Desse modo, não se recomenda o uso desta última em procedimentos de rotina para a avaliação andrológica em catetos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), mediante o protocolo nº 23091.000254/11-88.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira, administrador do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pela permissão para uso dos animais no experimento;

e ao Programa de Preservação da Biodiversidade – PPBio-Semiárido/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- CASTELO, T.S. et al. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v.74, p.1060-1065, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10002475>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.002.
- CAMUS, A. et al. Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? **Theriogenology**, v.75, p.577-583, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10005091>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.025.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKIB, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, v.109, p.367-373, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004484869390175X>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/0044-8486(93)90175-X.
- COMERFORD, K.L. et al. Validation of a commercially available fluorescence-based instrument to evaluate stallion spermatozoa concentration. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3-4, p.316-317, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008002807>>. Acesso em: 14 jan. 2014. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.093.
- CORCINI, C.D. et al. Comparação de diferentes diluentes na mensuração da concentração espermática de suínos em espectrofotômetro. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, p.1965-1968, 2011. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/5547>>. Acesso em: 23
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H. et al. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. **Journal of Andrology**, v.26, p.107-114, 2005. Disponível em: <<http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/full/26/1/107>>. Acesso em: 23 out. 2012.
- HELLGREEN, E.C. et al. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared

- peccary (*Tayassu tajacu*), **Journal of Reproduction & Fertility**, v.85, p.677-686, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2704003>>. Acesso em: 23 out. 2012.
- LU JIN-CHUN, et al. Comparison of three sperm-counting methods for the determination of sperm concentration in human semen and sperm suspensions. **Science**, v.38 n.4, p.232-236 2007. Disponível em: <<http://labmed.ascpjournals.org/content/38/4/232.short>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1309/1CWDWU8EP86HBJ0R.
- KAHWAGE, P.R. et al. Biometria testicular, eletroejaculação e características seminais de caïtutus, *Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Artiodactyla, *Tayassuidae*) mantidos em cativeiro na Amazônia Oriental. **Revista Acta Amazonica**, v.40, n.4, p.771-778 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672010000400019>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1590/S0044-59672010000400019.
- MAES, D. et al. Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.79, p.42-47, 2010. Disponível em: <<http://vdt.ugent.be/>>. Acesso em: 09 jul. 2013.
- MIRANDA, R.J.S. et al. A viabilidade econômica da criação de caïtutus (*Tayassu tajacu*): Um estudo de caso. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande, Brasil. **Anais...** Campo Grande: SOBER, 2010. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/720.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2012.
- MOLLINEAU, W.M. et al. A preliminary technique for electroejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*). **Animal Reproduction Science**, v.108, p.92-97, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432007002771>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.07.017.
- MURGAS, L.D.S. et al. Comparative study of different techniques of evaluation of spermatoc concentration in swines. **Archivos de Zootecnia**, v.59, n.227, p.463-466, 2010. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20103318574.html>>. Acesso em: 23 out. 2012.
- OLDENHOF, H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v.61, p.115-122, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122401000091X>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.06.002.
- PEIXOTO, G.C.X. et al. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v.134, p.191-196, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012002564>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.026.
- SOKOL, R.Z. et al. Comparison of two methods for the measurement of sperm concentration. **Fertility and Sterility**, v.73, p.591-594, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028299005907>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00590-7.
- SOUSA, A.L.P. et al. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.370-375, 2009. Disponível em: <<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320%2809%2900056-6/fulltext>>. Acesso em: 23 out. 2012. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.02.017.
- THEIMER, T.C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome B DNA sequences. **Journal of Mammology**, v.79, n.2, p.566-572, 1998. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/1382987?uid=2129&uid=2&uid=70&uid=4&sid=21102518844617>>. Acesso em: 09 jul. 2013.
- VIANNA, W.L. et al. Estudo comparativo da eficiência de diferentes técnicas de mensuração da concentração espermática em suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2054-2059, 2004. Disponível em: <<http://www.revista.sbz.org.br/artigo/visualizar.php?artigo=4148>>. Acesso em: 23 out. 2012.