

EFEITO DA PRÉ-FILTRAÇÃO DO DILUIDOR CITRATO SÓDIO-GEMA PARA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO NA FECUNDIDADE DE FÊMEAS BOVINAS^a

BRUNO HUMBERTO BASILE^b
ALDO WALDRIGUES^c

BASILE, B.H.; WALDRIGUES, A. — Efeito da pré-filtração do diluidor citrato sódio-gema para criopreservação do sêmen bovino na fecundidade de fêmeas bovinas.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo comparar o uso do diluidor citrato de sódio-gema estéril por pré-filtração com o mesmo diluidor preparado de forma convencional, isto é, sem a filtração na fecundidade de fêmeas bovinas. Para tanto utilizou-se sêmen de dois reprodutores da raça Nelore de 5 e 9 anos de idade, respectivamente. Foram criopreservados 4.000 doses de cada animal, subdivididas nos dois diluidores, e se procedeu à inseminação de 4.007 fêmeas aleatoriamente com sêmen em diluidor pré-filtrado e não filtrado. Ao diagnóstico de gestação (45/60 dias) obteve-se 79,9% de prenhez. No entanto, separando-se os dois lotes de fêmeas, observou-se uma frequência maior (82,8%) de gestantes inseminadas com sêmen em diluidor estéril do que nas com diluidor não estéril (77%). Apesar de não haver diferença estatística entre o número de fêmeas inseminadas com um ou outro diluidor, bem como em propriedades diferentes, houve diferença estatisticamente significativa entre o número de gestações e o tipo de diluidor, mostrando ser o diluido) pré-filtrado mais eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Sêmen; Diluidor; Citrato-gema; Inseminação Artificial.

1 — INTRODUÇÃO

A maioria das Centrais de Inseminação Artificial no Brasil, Estados Unidos e Europa, utilizam diluidores para sêmen à base de citrato de sódio-gema (Mies Filho, 1982). O mesmo é preparado com água bidestilada e/ou deionizada, glicerol estéril, antibióticos e gema de ovo. Diluidor preparado desta maneira, apesar dos cuidados na sua manipulação, não é estéril. Não só a água, apesar de bidestilada e/ou deionizada, não é estéril, como também o maior contaminante é a gema do ovo da galinha. Apesar de se usar ovos frescos (preferentemente do dia) sabe-se que nos mesmos há nível de contaminação por bactérias (Hetrick, Bottino, apud July et al, 1971 e Hafez, 1982), mesmo em ovos provenientes de granjas onde o controle sanitário apresenta alto grau de eficiência. Este diluidor pode veicular microorganismos ao sistema genital feminino que irão dificultar a fecundação. No entanto, após o preparo do diluidor, pode-se submetê-lo à pré-filtração a vácuo em membrana Seitz com poros de diâmetro conhecido, restando-se partículas acima do mesmo, como por exemplo bactérias.

2 — REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bratton et al (1949), utilizando vários tipos de diluidores para sêmen bovino resfriado e baseados no não retorno ao cio aos 60/90 dias após a inseminação, concluíram que o citrato-gema com sulfamidas foi o mais eficiente.

Almquist et al (1954), utilizando três tipos de diluidores, entre eles o citrato-gema, não observaram diferenças estatisticamente significativas no número de prenheses resultantes. Almquist & Wickershan (1962), ao analisarem os resultados de 4.547 primeiras inseminações em vacas, não encontraram diferenças significativas entre diluidores citratogema e à base de leite.

No Brasil, vários experimentos foram concluídos sobre índices de fertilidade na inseminação artificial, podendo-se destacar os estudos de Norte (1976), no Estado de Minas Gerais, onde foram inseminadas 3.734 (fêmeas, obtendo-se um índice de 79,8% (2.953 gestações), sem no entanto afirmar o tipo de diluidor utilizado. Vilela Barbosa (1976) relatando trabalhos de inseminação artificial no Estado de Pernambuco, afirma que um total de 1.001 vacas inseminadas obteve o coeficiente de fertilidade de 76,6%, utilizando até 3 inseminações.

Fonseca et al (1981), utilizando sêmen de três touros, inseminaram 878 fêmeas, obtendo resultados diversificados, de 62,6% a 81,1% de fertilidade, quando se levou em conta padrões de qualidade do sêmen.

Passos et al (1985) com o objetivo de estabelecer o melhor momento para a inseminação artificial, obtiveram um índice de fertilidade de 66,7%.

Hetrick Jr (1971 apud July et al, 1971) conclui que há 14% a 100% de contaminação dos ovos das galinhas logo após a postura. Esta contaminação se dá pelos mais diversos tipos de bactérias. Bottino (1971 apud July et al, 1971) afirma ser a infecção do saco da gema por *Escherichia coli* a

a - Projeto financiado pelo CONCITEC

b - Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina.

c - Departamento de Biologia - Universidade Estadual de Londrina.

mais constante. July et al (1971) concluíram que se uma galinha for portadora de infecção ovariana por *Salmonella*, de 60% a 70% dos seus ovos também estarão contaminados.

Coelho et al (1976) estudando contaminações de sêmen diluído e refrigerado, observaram o número de germes viáveis de zero a 46.300 microorganismos presentes nas amostras analisadas, encontrando os mais variados tipos de agentes.

Hafes (1982) preconiza que além dos cuidados especiais de assepsia no preparo dos diluidores se deve usar antibióticos para inibir o crescimento bacteriano. Preconiza também que os ovos a serem utilizados sejam previamente inspecionados e que sejam procedentes de granjas isentas de doenças.

Mies Filho (1982) afirma que a adição de antibióticos ao meio diluidor inibe o desenvolvimento da flora prepuccial colhida junto ao sêmen no momento da ejaculação. Mies Filho (1989) relata que o sêmen diluído e congelado em citrato-gema, após o teste de termoresistência rápida (TTR), foi superior aos demais diluidores, concluindo por um maior grau de degradação espermática quando estes diluidores são utilizados.

Com a finalidade de testar a eficiência do diluidor citrato sódio-gema pré-filtrado ou não na criopreservação de sêmen bovino foi realizado este projeto, pois os dados da literatura indicam ser este o diluidor conhecido mais utilizado pelas centrais de inseminação, bem como aquele que melhores resultados apresenta.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sêmen de dois reprodutores Puros de Origem (PO) da raça Nelore, com idade de 05 e 09 anos, ambos criados em regime de semi-estabulação.

De cada reprodutor foram colhidos, criopreservados e armazenadas 4.000 doses de sêmen em palhetas francesas de 0,5 ml. Utilizou-se a eletroejaculação como metodologia para a obtenção de sêmen.

Após cada colheita procedeu-se a avaliação da mobilidade, vigor espermático, porcentagem de espermatozoides vivos (coloração pós-vital de Blom, 1950), pH, concentração e volume, mantendo-se o sêmen em banho maria a 35°C.

De cada colheita, o volume obtido foi dividido em duas porções iguais e se acrescentou o diluidor preconizado por Salisbury (1941), modificado por Polge, et al (1949). A primeira fração do sêmen (I) acrescentou-se o diluidor citrato sódio-gema estéril por filtração à vácuo em filtro Seitz, tipo EKS, com 14 cm de diâmetro e 0,5 micrômetros de porosidade, e a segunda (II) acrescentou-se o mesmo diluidor, processado de forma convencional, porém não estéril. A concentração espermática das frações I e II seguiu a constante de 50×10^6 espermatozoides viáveis por dose. Após o período de resfriamento, o sêmen com o diluidor I foi ensado e congelado em vapor de nitrogênio líquido. Igual procedimento foi realizado com a fração com o diluidor II.

Efetuada a criopreservação o sêmen foi utilizado em 02 propriedades criadoras de bovinos da raça Nelore e efetuada sua aplicação em dose única, inseminando-se alternadamente com as frações I e II e identificando-se o animal inseminado.

As fêmeas utilizadas no experimento fazem parte de um rebanho com sanidade controlada, com vacinações de praxe e vermifugações periódicas e mineralização adequada,

criadas em pastagens artificial de *Brachiaria Brizantha* e *Estrela Africana Variedade Roxa*. Todas as fêmeas tinham parido na estação anterior, portanto consideradas férteis. Para detecção do Estro usou-se ruídos com desvio lateral de prepúcio e penis. As inseminações artificiais foram realizadas na primavera, verão e parte do outono (até 15 de maio). Numa das propriedades utilizou-se um rebanho de 700 matrizes da raça Nelore, registradas (PO) e a outra, pertencente ao mesmo proprietário, contava com um rebanho de aproximadamente 12.000 fêmeas, sendo utilizadas no experimento 3.307 matrizes Aneloras.

Aos 45/60 dias após a inseminação se fez o diagnóstico de prenhez por palpação retal nas fêmeas, que não apresentaram estro subsequente a inseminação.

A cada partida de sêmen congelado, fez-se sua avaliação e procedeu-se a teste de termoresistência rápida (TTR), conforme preconizada por Mies Filho (1982), sendo liberadas apenas as partidas com mobilidade de 20% ou mais e vigor acima de 02.

4 – RESULTADOS

No período compreendido entre janeiro de 1986 a fevereiro de 1989 foram inseminadas 4.007 fêmeas, sendo 2.010 com diluidor I (estéril) e 1.997 com diluidor II (não estéril). Do total de 4.007 ventres inseminados diagnosticou-se 3.205 (79,9%) gestações, sendo 1.666 por sêmen com diluidor I e 1.539 por diluidor II (Tab. 1).

TABELA 1 – INSEMINAÇÕES REALIZADAS E FREQUÊNCIAS DE GESTAÇÕES COM OS DILUIDORES I E II.

Diluidores	Nº de Inseminações	Prenhes Positiva	Porcentagem
I	2010	1666	82,8
II	1997	1539	77,0
TOTAL	4007	3205	
Média Geral	4007	3205	79,9

Ao teste de Qui-quadrado não houve diferença estatística entre a quantidade de fêmeas inseminadas com os diluidores I e II. A diferença encontrada entre a frequência de prenhez entre os dois diluidores é estatisticamente significativa ($\chi^2 = 22,0$; $P < 0,01$).

TABELA 2 – INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS REALIZADAS POR FAZENDA

	Nº de animais	Inseminadas Diluidor I	Inseminadas Diluidor II	Porcentagem
Fazenda A	700	372	328	17,5
Fazenda B	3.307	1.638	1.669	82,5
TOTAL	4.007	2.010	1.997	100,0

A tabela 2 indica o número de matrizes inseminadas artificialmente, não havendo diferenças estatísticas entre as inseminadas com diluidor I e II, para ambas as fazendas.

TABELA 3 – ÍNDICE DE FECUNDIDADE POR REPRODUTOR E POR FAZENDA

Reprodutor	FAZENDA A		FAZENDA B		TOTAL
	Diluidor I	Diluidor II	Diluidor I	Diluidor II	
Com 5 anos	150	127	673	632	1.582
Com 9 anos	151	128	692	652	1.623
TOTAL	301	255	1.365	1.284	
TOTAL GERAL	556		2.649		3.205

A tabela 3 mostra o número de gestações ocorridas com o uso dos diluidores I e II, indicando que o fator reprodutor foi igual em ambas as fazendas, não havendo diferenças estatísticas.

5 – DISCUSSÃO

A produção animal passa na atualidade por um incremento tecnológico de grandes proporções. Metodologias (inseminação artificial, superovulação, transferência de embriões e micromanipulação) estão sendo colocadas à disposição da bovinocultura procurando-se obter maior produtividade. Um dos métodos mais eficazes e de grande poder de propagação de genótipos é o da Inseminação Artificial. Este método muito já contribui e ainda contribuirá para a melhoria genética do plantel bovino brasileiro. Por isso se fez mister seu incremento metodológico, buscando maximizar a criopreservação de sêmen.

Bratton et al (1949), ao inseminarem 1924 fêmeas com sêmen resfriado, obtiveram 56,5% de não retorno ao cio aos 60/90 dias. Neste trabalho foram inseminadas 4007 ventres e se obteve 3.205 (79,9%) de gestações no mesmo período. Evidentemente há uma diferença significativa entre estes dois trabalhos, refletindo uma melhoria acentuada nas técnicas de inseminação artificial e/ou criopreservação do sêmen.

Os resultados de prenhez após inseminação artificial obtidos por Almquist et al (1954), Salisbury (1957), Almquist e Wickershan (1962) e Passos et al (1985), com porcentagens de 66,8 (2.674 inseminações); 68,4 (4.869

inseminações), 69,7 (4.547 inseminações) e 66,7% (230 inseminações), respectivamente, também ficaram abaixo dos obtidos no presente trabalho, tanto para o diluidor não estéril (77%) como para estéril (82,8%).

Os índices de fertilidade referidos por Norte (1976) e Vilela Barbosa (1976), de 79,8% (2.953 gestações por inseminação) e 76,6 (1.001 gestações por inseminação), respectivamente, são semelhantes aos 79,9 (média geral) obtido no presente experimento, porém abaixo dos 82,8% de gestações com diluidor pré-filtrado.

Já os resultados de Fonseca et al (1981), de 81,1% de fertilidade com sêmen de alto padrão se aproxima dos 82,8% do presente experimento.

Estas diferenças são resultantes de inúmeras variáveis, entre as quais se podem citar: qualificação mais adequada do pessoal que realiza a inseminação; incremento de técnicas, materiais e equipamentos, preparo das doses para criopreservação do sêmen, etc. Neste último item é que também se inclui, o fato de o diluidor ser pré filtrado ou não, o que parece ser verdadeiro com os dados da atual pesquisa.

6 – CONCLUSÃO

Após avaliações efetuadas conclui-se que:

- O uso do diluidor pré-filtrado aumenta a eficiência do sêmen na inseminação artificial.
- Aumenta a fecundidade por inseminação artificial.
- Proporciona uma melhor visualização do espermatozóide após a adição do diluente.

BASILE, B.H.; WALDRIGUES, A. – Sodium citrate-yolk sterilized by filtration diluter in bovine semen criopreservation.

SUMMARY

Sodium citrate-egg yolk is the usual diluent used for frozen bovine semen. The objective of this work was to compare the diluent prepared using steril sodium citrate-egg yolk, one obtained by filtration and the other non filtered. Semen from two Nelore bulls, 5 and 9 years old, were used. Four thousand doses from each animal, subdivided into the two diluents were used. Four thousand and seven females were inseminated at random with the steril and non steril diluents. Pregnancy diagnosis (45-60 days after insemination) resulted 79,9% positive tests. With the steril diluted semen a higher positive frequency was obtained – 82,8%. Whereas with the non steril diluted semen, the frequency obtained was 77,0%. Although there was no significant difference between the number of females inseminated with the two different diluted semen, and in two farms, there was a significant difference between positive pregnancy and the type of diluent used, showing that the steril diluted semen was more effective.

KEY-WORDS: Semen; Diluent; Sodium citrate-egg yolk; Artificial insemination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ALMQUIST, J.O. & WICKERSHAN, E.W. Diluents for bovine semen. XII Fertility and motility of spermatozoa in SKIMMILK with various levels of glycerol and methods of glycerolization. *J. Dairy Science*, 45 (6): 782-787, 1962.
- 2 - ALMQUIST, J.O.; FLIPSE, R.J.; THACKER, D.L. Diluters for bovine semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. *J. Dairy Science*, 37 (11): 1303-1307, 1954.
- 3 - BLOM, E. Interpretation of spermatid cytology in bulls. *Fertility and Sterility*, 1 (3): 223-238, 1950.
- 4 - BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H.; MUSGRAVE, S.D.; VANDEMARK, N.L. Livability and fertility of bovine spermatozoa in different diluents. *J. Dairy Science*, 32 (6): 604-608, 1949.
- 5 - COELHO, N.M.; MEGALE, F.; COELHO, A.M.B.; OLIVEIRA, A.A. Flora microbiana do sêmen diluído e refrigerado de *Bos taurus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 1976, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1976. v. 2, p. 280.
- 6 - FONSECA, V.O.; NORTE, A.L.; CHOW, L.A.; AZEVEDO, N.A. Inseminação artificial em bovinos de corte. II. Efeito da qualidade do sêmen sobre a fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 5, (3-4): 21-25, 1981.
- 7 - HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982. 720 p.
- 8 - JULY, J.R.; PANETTA, J.C.; BOTTINO, J.A. *Atualização em Avicultura e Ornitopatologia*. São Paulo: Verbodivino, 1971. 231 p.
- 9 - MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. v. 2, 783 p.
- 10 - MIES FILHO, A. Problemas de fertilidade com sêmen congelado importado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, 1989, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1989. p. 119-126.
- 11 - NORTE, A.L. Inseminação artificial no Nordeste de Minas (Vale do Mucuri). SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 1976, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1976. v. 2, p. 48-54.
- 12 - PASSOS, P.B.; FONSECA, V.O.; CHOW, L.A.; NORTE, A.L.; RUAS, J.R.M. Eficiência das inseminações realizadas 12 e 24 horas após a observação do estro na vaca Zebu. *Rev. Bras. Reprodução Animal*, 9 (2): 87-91, 1985.
- 13 - POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after Vitrification and Dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-669, 1949.
- 14 - SALISBURY, G.W. Recent research developments in the preservation and handling of bovine semen. *Cornell Vet.*, 31: 149-159, 1941.
- 15 - SALISBURY, G.W. Recent developments with bull semen diluents. *Anim. Breed. Abstracts*, 25 (2): 111-123, 1957.
- 16 - VILELA BARBOSA, J.N. Inseminação Artificial no Nordeste do Brasil. SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 1976, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1976. v. 2, p. 64-75.

Recebido para publicação em 11/12/1990.

End. correspondência:
Departamento de Clínicas Veterinárias - UEL