

UTILIZAÇÃO DO DILUENTE TRIS NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS.

The Use of Tris as Diluent in the Artificial Insemination of ewes.

Jairo Pereira Neves*, Pedro Newton Duarte Irala**, Carmem Iara Mazzoni Gonzalez***
e Wilson José Mateo Dornelles**

RESUMO

Para verificar a eficiência do Tris como diluidor na inseminação artificial ovina, foram utilizados 5 carneiros e 1.815 ovelhas da raça Corriedale, distribuídos aleatoriamente, pertencentes a três estabelecimentos tradicionais de criação. Estabeleceu-se concentrações por dose de inseminação de 20, 30 e 40 milhões de espermatozoides após cálculo baseado no volume e número de células espermáticas por milímetro cúbico, as quais foram comparadas com a concentração média obtida com a utilização do sêmen não diluído. Os resultados foram avaliados pelo índice de não retorno após 18 ± 5 dias da inseminação. Após aplicação do teste X^2 verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados com as testemunhas, evidenciando que o sêmen diluído em Tris para utilização imediata, proporcionou considerável aumento do número de ventres a serem inseminados sem diminuição da concepção.

SUMMARY

Five Corriedale rams and 1,815 ewes of the same breed were used in order to assess the efficiency of Tris as a diluent in artificial insemination. The animals were randomly selected from three typical sheep raising establishments. After calculating the volume and numbers of spermatoc cells (spermatozoa) per mm^3 , dosis of diluted semen at 20, 30 and 40 ($\cdot 10^6$) were established and compared with the average concentration of non diluted semen. It was concluded that there was no significant statistical difference among the tested groups and controls as revealed by the X^2 test. This indicates that Tris diluted semen for immediate use permits a considerable increase in the numbers of inseminated ewes without a decrease in the conception Rates.

* Professor Adjunto do Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria, 97100, Santa Maria, RS, Brasil.

** Médico Veterinário autônomo. Rua General Câmara, 1557, Uruguaiana, RS, Brasil.

*** Médica Veterinária, aluna do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

INTRODUÇÃO

Muito embora a inseminação artificial ovina venha sendo utilizada desde há muitos anos no Estado do Rio Grande do Sul com relativo sucesso, muito pouco tem sido feito para o seu aperfeiçoamento.

Uma das limitações do método tradicionalmente utilizado é o reduzido número de fêmeas que podem ser inseminadas, considerando-se um ejaculado. Segundo estimativa de MIES FILHO (7), com 1 ml de sêmen pode-se inseminar em torno de vinte ovelhas. Por outro lado são utilizados 2 ejaculados diários em média para que não haja redução do volume e concentração espermáticas.

Levando-se em consideração a existência de um reduzido número de reprodutores efetivamente melhorados, frente a rebanhos com elevado número de matrizes, dever-se-ia buscar um meio de utilizar o sêmen em maior número de ventres sem que houvesse redução da percentagem de parição.

O Tris que juntamente com outras substâncias vem sendo utilizado com sucesso em congelamento, tem condições de se constituir numa substância com propriedades de promover a diluição do sêmen para utilização imediata, tendo em vista sua peculiar característica tampão (DAVIS et alii, 1).

Este trabalho teve por finalidade verificar a eficiência do Tris como diluidor na inseminação artificial em ovinos.

REVISÃO DA LITERATURA

A inseminação ovina com sêmen diluído em leite foi inicialmente utilizada por SALAMON & ROBINSON (9). O sêmen foi diluído na proporção de 1:2 e 1:4 resultando numa concentração espermática de 150/200 milhões de espermatozoides por dose. O índice de não retorno após a primeira inseminação num representativo número de animais, com sêmen diluído em leite integral foi de 75% e em leite desnatado 76%.

Os mesmos autores trabalhando com gema de ovo-glicose-citrato-Penicilina, como diluente, obtiveram, após a inseminação de 301 ovelhas, o índice de não retorno de 70%.

A solução fisiológica foi utilizada por KILLEN & MOORE (3) em 1970 resultando numa concentração espermática de 30 a 40 bilhões de espermatozoides por dose, encontrando-se 90% de óvulos fecundados.

ENTWISTLE & MARTIN (2) utilizando como diluente uma solução de glicose-frutose e outros sais, obtiveram percentagem de parição de 48 e 53% após inseminação com, respectivamente, 50 e 100 milhões de espermatozoides por porção.

LAPWOOD et alii (6) usaram como diluente o leite desnatado. Após diluição, o sêmen foi centrifugado e utilizando uma dose de 50 milhões de espermatozoides obtiveram índice de não retorno de 56%. Os mesmos autores utilizando um diluente à base de glicose obtiveram 48% de não retorno após inseminação.

LANGFORD et alii (5), utilizando também leite desnatado mas com concentração de 90 milhões de espermatozoides por dose, obtiveram 78% de parição em ovelhas que tiveram cio sincronizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 5 carneiros e 1.815 ovelhas pertencentes a três estabelecimentos de criação localizados no município de Uruguaiana, Estado do Rio Grande do Sul.

Como lote testemunha utilizaram-se 1.504 ovelhas pertencente aos rebanhos que estavam sendo submetidos à inseminação, que corresponde ao total do lote, isto é, as ovelhas inseminadas nos 6 dias consecutivos em que se fez o controle. Todos os animais eram da raça Corriedale com idade entre 2 e 6 anos e apresentavam-se em condições sanitárias e nutricionais satisfatórias.

As ovelhas foram divididas aleatoriamente nos respectivos grupos e identificadas com o número do carneiro doador de sêmen.

O sêmen foi obtido mediante utilização de vagina artificial (mod. Hannover) e imediatamente colocado em banho-maria à uma temperatura de +30°C.

Logo após procedeu-se a avaliação do sêmen, segundo KRAUSE (4) que constou dos seguintes itens: volume, aspecto, turbilhonoamento, movimento progressivo, concentração e morfologia espermática. A concentração espermática foi determinada em câmara de contagem tipo Neubauer em que a diluição utilizada foi de 1:400.

Para a morfologia espermática empregou-se a fixação das amostras em solução de formol citrato e preparação úmida em microscópio de contraste de fase (X 1000).

Após o sêmen foi diluído com Tris* na proporção 1:1 que estava previamente aquecido a mesma temperatura, enquanto a concentração espermática e os cálculos para ajuste da diluição final fossem determinados.

Utilizaram-se concentrações de 20, 30 e 40 milhões de espermatozoides por inseminação as quais foram comparadas com as da inseminação feita tradicionalmente, ou seja, sem diluição, que corresponde a uma concentração espermática aproximada de 150 milhões.

Somente foram utilizados ejaculados de carneiros que apresentavam condições espermáticas satisfatórias de acordo com SALAMON (8).

A inseminação artificial foi realizada pela manhã em ovelhas que tinham sido previamente marcadas na noite anterior por rufiões vasectomizados, utilizados na proporção de 4%.

Para aplicação do sêmen utilizaram-se material e procedimento semelhante aos descritos por MIES FILHO (7). O volume utilizado por dose foi de 0,075 ml e a

* TRIS - TRIS (Hidroximetilaminometano)... 15,14 g.
 Frutose 6,25 g
 Ácido cítrico 8,90 g
 Água destilada 460,00 ml

inseminação do tipo cervical.

A avaliação dos resultados foi realizada pela determinação do índice de não retorno, calculado em percentual de acordo com o número de ovelhas que não mostraram sinais de cio após 18 ± 5 dias da inseminação, com posterior análise pelo teste χ^2 .

RESULTADOS

A Tabela 1 expresse os resultados referentes às características seminais dos carneiros utilizados no experimento necessário para o cálculo da diluição. Os demais itens necessários para a avaliação completa do sêmen que são movimento de massa, movimento progressivo e alterações morfológicas preencheram as exigências mínimas. A proporção sêmen/diluidor oscilou em função da concentração espermática.

A Tabela 2 expressa os índices de não retorno após inseminação com as diversas concentrações, por propriedade, comparadas com os índices do grupo testemunha em que foi utilizado o sêmen não diluído.

A Tabela 3 expressa a aplicação do teste χ^2 entre os grupos teste e testemunha por propriedade. As diferentes concentrações utilizadas pela pequena diferença que apresentam entre si e por terem sido utilizadas em propriedades distintas foram consideradas como um único grupo. Através desta análise estatística constatou-se que não houve diferença significativa no índice de não retorno entre os grupos testados com o testemunha.

DISCUSSÃO

Pelo que se pode observar nos resultados obtidos, a redução da concentração espermática pela diluição com Tris proporcionou um índice de não retorno não inferior ao obtido na inseminação tradicional, como sendo de 58%.

Este resultados mostrou-se superior aos encontrados por ENTWISTLE & MARTIN (2) que, com concentrações de 50 e 100 milhões/espermatozoides/dose, obtiveram índices de parição de 48 a 53%, respectivamente, levando-se em consideração que a diferença entre o índice de não retorno e parição é estimada em 5%. De igual modo LAPWOOD et alii (6), utilizando concentrações de 50 milhões por inseminação e um diluente a base de leite, obtiveram índice de não retorno pouco superior a 50%.

SALAMON & ROBINSON (9) obtiveram índices médios de 70% de parição diluindo o sêmen com diluente à base de leite e outros, mas utilizando uma concentração elevada por dose o que não se constitui em vantagem no sentido de aumentar o número de ovelhas a serem inseminadas.

Semelhante procedimento foi adotado por LANGFORD et alii (5) e por KILLEN & MOORE (3) com ótimos resultados (90%).

TABELA 1. Características do sêmen dos carneiros utilizados como doadores de sêmen, levadas em consideração para o cálculo da diluição.

Proporção	Carneiros	Volume (ml)	Concentração (milhões de espermatozoides por mm ³)	Dose de inseminação artificial (milhões de espermatozoides)	Proporção sêmen/diluidor
A	A 1	1,0	1,7	30	1:2
B	B 1	0,8	1,3	20	1:2
	B 2	1,0	2,0	40	1:4
C	C 1	1,6	3,0	40	1:4
	C 2	1,0	4,1	40	1:6

TABELA 2. Resultados por propriedade após inseminação com sêmen diluído em Tris nas diversas concentrações por dose.

Proporção	Carneiro (nº)	Concentração (milhões de espermatozoides por dose)	Ovelhas (nº)	%	
				nº	Não retorno
A	A 1	30	95	53	55,7
	A1-A2-A3	não dil.	542*	250	46,1
B	B 1	20	50	32	64,0
	B 2	40	47	25	53,0
	B1-B2-B3	não dil.	612*	355	58,0
C	C 1	40	69	41	59,4
	C 2	40	50	31	62,0
	C1-C2-C3	não dil.	350*	201	57,4

* Restante do lote inseminado em 6 dias.

TABELA 3. Aplicação do teste χ^2 nos resultados obtidos após inseminação considerando-se os grupos teste e testemunha por propriedade.

Proporção	Grupos	Ovelhas inseminadas	Não retorno		χ^2
			nº	%	
A	teste	95	53	55,7	2,57
	test.	542	250	46,1	0,44
B	teste	97	57	58,7	0,007
	test.	612	355	58,0	0,002
C	teste	119	72	60,5	0,24
	test.	350	201	57,4	0,08
ABC	TOTAL	1.815	988	54,4	3,339

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente experimento, conclui-se o seguinte:

1) O Tris utilizado como diluidor de sêmen para uso imediato na inseminação artificial ovina, nas condições descritas neste experimento, permitiu considerável aumento de ventres a ser inseminado por carneiro, sem diminuição do Índice de concepção.

2) Esta condição permite o aproveitamento mais racional dos reprodutores pela utilização de seu potencial genético em número maior de ventres com uma produção mais uniforme.

3) A utilização do diluidor em definitivo necessita estudos complementares visando o conhecimento do tempo de duração da solução sem perda de suas propriedades, da maneira de preservá-la e da melhor forma de acondicioná-la.

4) É imprescindível o controle e orientação do serviço pelo médico veterinário para maior segurança e eficiência do processo.

LITERATURA CITADA

1. DAVIS, I. S.; BRATTON, R. W.; FOOTE, R. H. Livability bovine spermatozoa at 50C in tris - buffered and citrate - buffered yolk - glycerol extenders. *J. Dairy Sci.*, 46:57-60, 1962.
2. ENTWISTLE, K. W. & MARTIN, I. C. A. Effects of the number of spermatozoa and of volume of diluted semen on fertility in the ewe. *Aust. J. Agric. Res.*, 23:467-72, 1972.
3. KILLEEN, I. D. & MOORE, N. W. Transport of spermatozoa, and fertilization in the ewe following cervical and uterine insemination early and late in oestrus. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23:1271-7, 1970.

4. KRAUSE, D. *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der Fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. Hannover, Escola Superior de Veterinária de Hannover. 1966, 165 p. (Tese de Habilitação "Venia Legendi").
5. LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; HACKETT, A. J.; AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S.; PETERS, H. F. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. *Can. J. Anim. Sci.*, 59:685-91, 1979.
6. LAPWOOD, K. W.; MARTIN, I. C. A.; ENTWISTLE, K. W. The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose, or ribose. *Aust. J. Agric. Res.*, 23:457-66, 1972.
7. MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 4. ed. Porto Alegre, Sulina, 1978. 765 p.
8. SALAMON, S. Die Künstliche Besamung beim Schaf. In: PAUFLER, S. K. et alii. *Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch*. Hannover, Verlag Schaper, 1974. vol. 1, p. 99-121.
9. SALAMON, S. & ROBINSON, T. J. Studies on the artificial insemination, age of the ewe, rams, and milk dilutens on lambing performance. *Aust. J. Agric. Res.*, 13:52-68, 1962.