

## Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo

[Conception rate of goats inseminated with semen cooled in egg yolk diluent at 5°C, for 12 or 24 hours]

A.P. Siqueira<sup>1</sup>, J.M. Silva Filho<sup>2\*</sup>, J.F. Fonseca<sup>3</sup>, J.H. Bruschi<sup>4</sup>, M.S. Palhares<sup>2</sup>,  
A.M. Borges<sup>2</sup>, M.C.M. Bruschi<sup>5</sup>, M.P. Peixoto<sup>5</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação - EV-UFMG – Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária – UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Embrapa Caprinos – Sobral, CE

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite – Coronel Pacheco, MG

<sup>5</sup>Médica veterinária autônoma

### RESUMO

Avaliou-se a capacidade fecundante do sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 (TI) ou 24 horas (TII), em container especial. Para tanto, utilizaram-se 62 fêmeas e dois reprodutores (B1 e B2) da raça Toggenburg, distribuídos em um esquema fatorial 2x2 (dois reprodutores e dois períodos de estocagem do sêmen). Após a coleta, o sêmen foi diluído em Tris-frutose-gema de ovo a 2,5%, envasado em palhetas de 0,25mL, com  $150 \times 10^6$  espermatozoides móveis e resfriado a 5°C. As fêmeas receberam duas doses de 22,5µg de PGF2α, em intervalos de 10 dias para a sincronização do estro. A partir da primeira aplicação de PGF2α, as fêmeas foram monitoradas para ocorrência de estro, três vezes ao dia. Realizou-se uma única inseminação, pela técnica de fixação da cervice, 12 horas após o início do estro. A motilidade e o vigor, após 12 ou 24 horas de resfriamento, foram de  $66,14 \pm 0,11\%$  e  $62,50 \pm 0,05\%$ , e  $3,46 \pm 0,61$  e  $3,27 \pm 0,50$ , respectivamente. Não houve influência ( $P > 0,05$ ) do reprodutor, nem do período de armazenamento do sêmen sobre a taxa de concepção das cabras, que foi de 49,1%.

Palavras-chave: caprino, sêmen resfriado, diluidor, inseminação artificial

### ABSTRACT

*The fertilizing capacity of goat semen cooled in egg yolk diluent at 5°C, for 12 or 24 hours was evaluated. Sixty-two Toggenburg does and two sexually mature Toggenburg bucks were used in a factorial treatment combination (two bucks and two storage periods). The semen was diluted in 2.5% Tris-fructose-egg yolk; envased in 0.25mL plastic straws, with  $150 \times 10^6$  mobile spermatozoa; and cooled at 5°C for 12 or 24 hours. The females received two doses of 22.5µg of prostaglandine F2α, at each 10-day intervals in order to synchronize the estrous. From the first PGF2α injection, estrous occurrence was monitored three times per day. Only one insemination was used, using the cervix fixation method, 12 hours after the estrous onset. The means of motility and strength, 12 (TI) and 24 hours (TII) after semen cooling at 5°C, were  $66.14 \pm 0.11\%$  and  $62.50 \pm 0.05\%$ , and  $3.46 \pm 0.61$  and  $3.27 \pm 0.50$ , respectively. Neither the sire nor the period of semen influenced ( $P > 0.05$ ) the conception rate of the does, which was 49.1%.*

Keywords: goat, colled semen, extender, artificial insemination

---

Recebido em 4 de janeiro de 2008

Aceito em 8 de outubro de 2008

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: monteiro@vet.ufmg.br

Financiamento: FAPEMIG (CAG nº 1243/05)

## INTRODUÇÃO

A utilização de reprodutores testados representa o maior instrumento para o melhoramento genético de características que somente são medidas nas fêmeas. Por não ser mensurada diretamente nos reprodutores, a seleção para produção de leite é feita pelo teste de progênie. Em bovinos leiteiros, tem-se aplicado considerável soma de recursos visando à implantação de testes de progênie. Entretanto, os elevados investimentos envolvidos impedem a utilização de reprodutores reconhecidamente melhoradores, em monta natural. Consequentemente, a inseminação artificial (IA) é um recurso para maximizar economicamente o seu uso.

No Brasil, a utilização da IA na espécie caprina ainda é limitada em comparação à sua aplicação em bovinos leiteiros, restringindo-se, basicamente, a trabalhos de pesquisa (Machado e Simplício, 1995). Isso ocorre devido à falta de informação técnica e de apoio aos criadores, ao custo inicial para implantação de programas de IA e à deficiência da escrituração zootécnica em muitas propriedades. Enfatiza-se, ainda, a baixa disponibilidade de sêmen e de reprodutores submetidos aos testes de progênie, à falta de estrutura para comercialização e transporte adequado para o sêmen e, principalmente, às dificuldades no processo de preservação do sêmen sob a forma congelada, com resultados insatisfatórios nos índices de concepção (Ritar e Salamon, 1983; Karatzas et al., 1997).

O elevado preço de compra e manutenção de um reprodutor caprino, as restrições envolvendo a importação de animais e de sêmen na forma congelada, o pequeno dano causado às células espermáticas no congelamento e, consequentemente, a alta viabilidade espermática (Singh e Purbey, 1996; Leboeuf et al., 2000) são fatores que justificam a difusão do resfriamento do sêmen caprino. Além disso, a viabilidade do sêmen caprino resfriado e armazenado facilita o transporte do material genético entre propriedades. Roca et al. (1997), ao utilizarem sêmen resfriado a 5°C, por até 36 horas, obtiveram taxa de concepção de 73,5%. Em ovinos, Colas e Guerin (1980) verificaram 51,0% de fertilidade utilizando o sêmen 24 horas após o resfriamento.

No Brasil, diferentes estudos têm envolvido o sêmen diluído e resfriado, transportado ou não, a temperaturas entre 5 e 17°C, em diferentes espécies (Palhares, 1997; Valle et al., 1999; Roner et al., 2006).

Sabe-se que o sêmen caprino apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies, sendo a mais importante a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais liberadas no plasma seminal (Simplício e Machado, 1989). Segundo Iritani e Nishikawa (1961), essas enzimas possuem atividade fosfolipase e hidrolisam a lecitina presente na gema de ovo em lisolecitinas e ácidos graxos altamente tóxicos para os espermatozoides. Sendo a lecitina o fosfolípide mais abundante nas membranas plasmáticas dos espermatozoides e também presente na gema de ovo, a composição enzimática do sêmen do bode e dos diluidores assume grande importância no processo de conservação do sêmen, congelado ou resfriado (Simplício e Machado, 1989). No caso dos diluidores à base de leite, uma fração proteica, também oriunda da glândula bulbo uretral, denominada BUSgp60, hidrolisa os seus triglicerídeos, resultando na produção de ácidos graxos tóxicos aos espermatozoides de caprinos, como o ácido oleico, capazes de inibir sua motilidade (Corteel et al., 1984; Leboeuf et al., 2000). O efeito BUSgp60 pode ser direto sobre os fosfolípidos da membrana dos espermatozoides ou indireto, pela produção de derivados tóxicos dos lípidos do leite.

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a capacidade fecundante do sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O período experimental compreendeu os meses de março a junho de 2005, representando a estação fisiológica de reprodução da espécie caprina na região da Zona da Mata em Minas Gerais.

Todos os animais foram mantidos em baias suspensas de piso ripado e manejados em sistema intensivo. As fêmeas foram alimentadas com silagem de milho, capim-elefante picado (*Pennisetum purpureum*) e/ou cana-de-açúcar, dependendo da disponibilidade, e concentrado

balanceado de acordo com a produção de leite, fornecido duas vezes ao dia. Os reprodutores receberam ração de milho e capim-elefante picado duas vezes ao dia. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade.

Foram utilizados como doadores de sêmen dois machos caprinos da raça Toggenburg, sexualmente maduros, com quatro anos de idade e peso de 60kg, e biometria testicular de 31 e 28cm, respectivamente, para os reprodutores 1 e 2 (B1 e B2).

Utilizaram-se 62 fêmeas da raça Toggenburg, de diferentes categorias reprodutivas (cabritas e cabras secas ou lactantes), em idade reprodutiva e livres de patologias ligadas à reprodução, distribuídas, aleatoriamente, em um esquema fatorial 2x2, considerando-se dois reprodutores e dois períodos de armazenamento do sêmen, 12 (TI) ou 24 horas (TII), resfriado a 5°C, após diluição em meio contendo gema de ovo (Evans e Maxwell, 1987).

Como não houve influência de reprodutor, nem interação reprodutor e tempo de estocagem do sêmen sobre a taxa de concepção, os dados dos reprodutores foram agrupados de forma a avaliar o efeito do tempo de estocagem do sêmen, independentemente do reprodutor utilizado. No tratamento 1, o sêmen foi resfriado a 5°C, e a inseminação ocorreu após 12 horas de estocagem; no tratamento 2, o sêmen foi resfriado a 5°C, e a inseminação ocorreu após 24 horas de estocagem.

Para a sincronização do estro, as fêmeas receberam duas aplicações de 22,5µg de prostaglandina sintética (d-cloprostenol<sup>1</sup>), na submucosa vulvar, intervaladas de 10 dias. Das 62 fêmeas submetidas à sincronização com PGF<sub>2</sub>α, seis (9,7%) não responderam à segunda aplicação e, portanto, não foram inseminadas. Uma cabra respondeu à segunda dose de prostaglandina e foi inseminada, mas persistiu em estro por 225 horas, sendo, por isso, retirada do estudo. Após a primeira aplicação de PGF<sub>2</sub>α, e até o dia do diagnóstico de gestação por ultrassonografia, os animais foram monitorados quanto ao início do estro, três vezes ao dia (6, 12 e 18h), com auxílio de um rufião cirurgicamente preparado.

A coleta de sêmen foi realizada pela técnica da vagina artificial, segundo Fonseca (2005)<sup>2</sup> – comunicação pessoal, duas vezes ao dia (7 e 19h), de cada reprodutor, nos dias 10 (dia da segunda

aplicação de PGF 2α), 11, 12 e 13, a partir da sincronização do estro. Após a coleta, o sêmen foi mantido à temperatura de 37°C, em banho-maria, e avaliado quanto às características físicas - volume (mL), cor (amarela a branca) e aspecto (aquoso a leitoso) -, e espermáticas. Após a avaliação, o sêmen foi diluído inicialmente na proporção de 1:1, em meio diluidor Tris-gema de ovo, segundo Evans e Maxwell (1987), obtendo-se concentração final de 150x10<sup>6</sup> espermatozoides móveis por dose inseminante (0,25mL).

Além disso, avaliaram-se a libido e o comportamento sexual dos animais, mensurando-se: tempo de reação, que é o decorrido entre a visualização da fêmea e a ereção do pênis; tempo para a monta, que compreende o período entre a ereção e a monta; duração da ejaculação; e número de saltos por ejaculado (Valle et al., 1999).

O sêmen foi conservado, em container apropriado (Palhares, 1997), até o momento da inseminação, após 12 ou 24 horas de armazenamento a 5°C.

Foi realizada uma única inseminação, pela técnica de fixação da cervice, 12 horas após a aceitação da monta e inseminadas apenas as cabras que responderam à aplicação da segunda dose de PGF<sub>2</sub>α até o quarto dia. Dessa forma, as cabras que entraram em cio após esse período não foram inseminadas por não se considerar este um cio induzido. O diagnóstico de gestação foi feito aos 21, 30 e 60 dias, por ultrassonografia transretal<sup>3</sup>.

Os dados referentes ao comportamento sexual dos bodes e as avaliações do sêmen foram submetidos à análise de variância (Sampaio, 2002) e aos testes *t* ou SNK (5%), para comparação de médias. Os dados relacionados à motilidade espermática foram transformados para ângulos, correspondendo a arco-seno √x, antes de serem submetidos à análise de variância. Os dados relativos à taxa de concepção foram processados pelo SÃS/1990 - e avaliados pelo teste do qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizaram-se 35 coletas de sêmen, e os dados referentes ao comportamento sexual, avaliação física do sêmen e desempenho reprodutivo dos bodes encontram-se na Tab. 1.

<sup>1</sup>Prolise® (fco 20 mL) – Tecnopec – São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Fonseca, J.F., 2005 - Embrapa Caprinos - Sobral, CE.

<sup>3</sup>Aloka, modelo SSD - 500 - Tokyo, Japão.

**Taxa de concepção de cabras...**

Tabela 1. Comportamento sexual, características físicas do sêmen e desempenho reprodutivo de bodes

Parâmetro	Bode 1 (n=18)	Bode 2 (n=17)
	Média ± DP	Média ± DP
Tempo de reação (s)	00:58:37±01:08:13a	00:30:16±00:35:08b
Tempo para a monta (s)	00:08:05±00:15:34a	02:42:01±01:58:04b
Duração da ejaculação (s)	00:01:20±00:00:38	00:02:02±00:01:01
Nº de saltos/ejaculado	1,17±0,51	1,00±0
Volume de sêmen (mL)	1,06±0,39	1,45±0,51
Motilidade (0-100%)	82,78±5,21	77,65±3,59
Vigor (0-5)	4,14±0,48	4,00±0,40
Turbilhonamento (0-5)	3,83±0,57	3,26±0,44
Total de spz/mL x 10 <sup>6</sup>	2020,28±642,74	1900,88±390,18
Total de spz móveis/mL x 10 <sup>6</sup>	1683,43±584,18a	1470,06±283,23b
Total de spz/ejaculado x 10 <sup>6</sup>	2118,69±1038,60	2779,24±1184,05
Total de spz móveis/ejaculado x 10 <sup>6</sup>	1775,11±937,90	2126,82±865,43
Nº de doses/ejaculado*(potencial)	11,83±6,25	14,18±5,77
Nº de cabras inseminadas/ejaculado	3,00±1,33	3,56±1,94

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si (P<0,05) pelo teste t.

\*Concentração de 150x10<sup>6</sup> spz móveis/dose. DP: desvio-padrão

A avaliação física do sêmen diluído com 0, 12 ou 24 horas de armazenamento a 5°C é apresentada na Tab. 2. A motilidade e o vigor dos ejaculados dos dois reprodutores, após 12 ou 24 horas do resfriamento do sêmen a 5°C, foram de 66,14±0,11% e 62,50±0,05%, e 3,46±0,61 e 3,27±0,50, respectivamente (P>0,05).

De acordo com Leboeuf et al. (2000), a maioria dos estudos relacionados à preservação do sêmen caprino não lavado e resfriado relata viabilidade e fertilidade por até oito horas, enquanto períodos de armazenamento mais longos resultam em baixa fertilidade. Azawi et al. (1993), ao avaliarem seis diluidores diferentes, observaram que os melhores resultados, em diferentes tempos de estocagem,

foram obtidos com o diluidor Tris-frutose-gema, com motilidade de 53,1%, com 24 horas de armazenamento, e 21,7% com 120 horas de armazenamento. Ressalta-se que os resultados descritos por esses autores são menores que os obtidos com 24 horas de armazenamento do sêmen (Tab. 2) Neste estudo. Ainda, na avaliação *in vitro* do sêmen resfriado a 5°C, evidenciou-se boa viabilidade espermática às 24 horas de armazenamento, pois não houve diferença (P>0,05) entre os tempos de armazenamento quanto aos parâmetros seminais estudados. Também Roca et al. (1997) observaram que os espermatozoides foram preservados a 5°C por um período um pouco mais longo, de até 36 horas, em meio diluidor contendo somente 2% de gema de ovo.

Tabela 2. Características físicas do sêmen de caprinos, diluído com 0, 12 ou 24 horas de armazenamento a 5°C, segundo o reprodutor

Reprodutor	0 hora		12 horas		24 horas	
	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
Bode 1	83±5,00 <sup>a</sup>	4,14±0,48 <sup>a</sup>	68,06±15,35 <sup>b</sup>	3,53±0,72 <sup>b</sup>	65,59±3,48 <sup>b</sup>	3,38±0,49 <sup>b</sup>
Bode 2	78±4,00 <sup>a</sup>	4,00±0,40 <sup>a</sup>	64,12±5,37 <sup>b</sup>	3,38±0,49 <sup>b</sup>	59,41±5,27 <sup>b</sup>	3,15±0,49 <sup>b</sup>

Médias na linha, para a mesma característica, seguidas de letras distintas diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

Resultados melhores que os obtidos neste experimento foram observados por Singh e Purbey (1996), ao avaliarem a viabilidade espermática *in vitro*, após 24 horas de resfriamento a 5°C, em meio diluidor Tris, com 20% de gema. A motilidade observada foi de 74,5% e a integridade acrossomal de 82,2%. Neste caso, a alta porcentagem de gema de ovo adicionada ao diluidor não resultou em prejuízos à motilidade espermática.

Não se observaram diferenças entre reprodutores (P>0,05) quanto às taxas de concepção obtidas (Tab. 3), nem efeito de interação reprodutor *versus* tratamento. Assim, as taxas de concepção obtidas para o sêmen resfriado a 5°C por 12 ou 24 horas foram de 55,6% e 42,9%, respectivamente (Tab. 3). A taxa de concepção com uma única inseminação em um ciclo foi de 49,1% (27/55), independentemente de reprodutor e tempo de estocagem do sêmen.

Tabela 3. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C, segundo o reprodutor e o tempo de armazenamento

Reprodutor	Taxa de concepção		Total
	12 horas	24 horas	
Bode 1	50,00% (7/14)	53,85% (7/13)	51,85% (14/27)
Bode 2	61,54% (8/13)	33,33% (5/15)	46,43% (13/28)
Total	55,56% (15/27)	42,86% (12/28)	49,09 (27/55)

Quanto à fertilidade, resultados expressivos foram relatados por Roca et al. (1997), ao utilizarem sêmen não lavado, preservado em meio diluidor contendo 2% de gema de ovo e resfriado a 5°C, quando obtiveram concepção de 73,5%, ao usarem duas inseminações por ciclo. Além disso, a concentração/dose inseminante utilizada por estes pesquisadores foi de  $240 \times 10^6$  sptz/mL, enquanto a utilizada no presente experimento foi de  $150 \times 10^6$  sptz/0,25mL. Enfatiza-se que a realização de mais de uma inseminação poderá favorecer a do momento mais próximo da ovulação.

Como não se observaram diferenças entre tratamentos quanto à taxa de concepção e às características seminais, espera-se que a utilização do sêmen com até 24 horas de armazenamento seja uma opção viável, o que facilitaria o transporte a longas distâncias. Contudo, recomenda-se estudar maior período de preservação do sêmen caprino, tendo em vista a grande variabilidade de respostas ao resfriamento encontradas na literatura, à escassez de pesquisas *in vivo* e à importância da difusão dessa técnica para a caprinocultura nacional.

### CONCLUSÕES

O fato de o sêmen caprino ter-se mantido fecundante por 24 horas, quando resfriado a 5°C, após diluição em diluidor com 2,5% de gema de ovo, comprovou a eficiência do container para o resfriamento do sêmen caprino.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos proprietários da Granja Água Limpa, localizada no município de Piau, Minas Gerais, pela cessão dos animais e das instalações, onde foi realizado este experimento.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZAWI, O.I.; AL-DAHASH, S.Y.A.; JUMA, F.T. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Rum. Res.*, v.9, p.347-352, 1993.
- COLAS, G.; GUERIN, Y.L. Insemination artificielle chez les ovins: acquisitions et perspectives. In: JOURNEES DE LA RECHERCHE OVINE ET CAPRINE, 5., 1980, Paris. *Anais...* Paris:1980. p. 162-184.
- CORTEEL, J.M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. Goat semen technology. In: THE MALE IN FARM REPRODUCTION SEMINAR, 1983, Nouzilly. *Proceedings...* Boston: M. Nijhoff: 1984. p.237-256.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Australia: Butterworths Pty Limited, 1987. 194p.
- IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. In: SILVER JUBILEE LABORATORY ANIMAL HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY, 1961, Kyoto. *Proceedings...* Kyoto, 1961. p.97-104.
- KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. et al. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.48, p.1049-1059, 1997.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.113-141, 2000.
- MACHADO, R.; SIMPLICIO, A.A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.19, p.61-72, 1995.

*Taxa de concepção de cabras...*

PALHARES, M.S. *Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado. I - Características termodinâmicas e funcionais, II – desempenho reprodutivo das éguas inseminadas.* 1997. 246f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.36, p.49-59, 1983.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I. et al. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadiana goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rum. Res.*, v.25, p.147-153, 1997.

RONER, M.N.B.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Desenvolvimento de um sistema de resfriamento e conservação de sêmen suíno. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.78-86, 2006.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal.* Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177

SINGH, L.P.; PURBEY, L.N. Preservability of goat spermatozoa in Tris and Citrate extenders at -196° C and 5°C. *Indian J. Anim. Sci.*, v.66, p.1139-1141, 1996.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.505-514, 1999.