

**UNIVERSIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTADO E DA REGIÃO
DO PANTANAL-UNIDERP**

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA DE OVINOS NA RAÇA SANTA INÊZ PARA
REPRODUÇÃO IN VITRO**

Campo Grande-MS

2008

Eliana Cristina Fabreti Calciolari

**SELEÇÃO ESPERMÁTICA DE OVINOS NA RAÇA SANTA INÊZ PARA
REPRODUÇÃO IN VITRO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado Profissionalizante em Produção e Gestão Agroindustrial da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produção e Gestão Agroindustrial.

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Orientadora Iandara Scherttert Silva

Prof. Dr. co-orientador Edison Rubens Arrabal Arias

Prof. Dr. co-orientador Fernando César Bauer

Campo Grande-MS

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: **Katiuscia Diniz Goulart**

Dissertação defendida e aprovada em 25 de julho de 2008 pela Banca Examinadora:

Profa. Doutora **Andrea Ferraz Fernandez (Orientadora)**

Prof. Doutor **Anor Victório Passari (FAIESP)**

Prof. Doutor **Fernando Paim Costa (UNIDERP)**

Prof. Doutor **Francisco de Assis Rolim Pereira**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Produção e Gestão Agroindustrial

Prof. Doutor **Raimundo Martins Filho**
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UNIDERP

DEDICATÓRIA

A todos àqueles que crêem em Deus

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, proteger e dar saúde para conquistar os objetivos almejados.

À minha família, em especial aos meus pais Artur e Edna, pelo apoio e confiança.

Ao meu marido, Carlinhos, pelo amor, carinho e apoio nos momentos bons e ruins.

À minha filha, Carla, que renunciou momentos, para que pudesse dedicar-me aos estudos.

À professora, orientadora e amiga, Iandara Schettert Silva, pela oportunidade, confiança e dedicação para a realização deste sonho.

Ao professor, co-orientador, Edison Rubens Arrabal Arias, pelo apoio estatístico do experimento.

Ao professor, co-orientador, Fernando César Bauer, pelas contribuições.

Ao professor Raysildo Barbosa Lôbo, pela orientação inicial, sua simplicidade e sabedoria tornaram-se um exemplo a seguir

Ao professor Gete Ottano da Rosa, pela constante atenção, meu respeito e eterna gratidão.

A todos os professores do Mestrado de Produção e Gestão Agroindustrial, pela contribuição no crescimento da ciência.

A todos os colegas e funcionários do Mestrado da UNIDERP, que contribuíram de alguma maneira para a realização deste experimento.

À colega e Médica Veterinária Janaína Baggio, com a qual partilhei todas as alegrias, tristezas e dificuldades da parceria para a realização do experimento.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução desta dissertação.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL e MÉTODO.....	8
3.1 Local e período do experimento.....	8
3.2 Amostras.....	8
3.3 Procedimentos.....	8
3.3.1 Descongelamento do sêmen.....	8
3.3.2 Diferentes proporções do gradiente descontínuo coloidal.....	9
3.4 Avaliações do experimento.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÃO.....	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da técnica do gradiente descontínuo coloidal (GDC), distribuição da fase 90% e fase 45% formando a coluna 09
- Figura 2** - Procedimento de montagem da coluna de gradiente coloidal descontínuo (GDC). A) tubo cônico apresentando apenas a fração de concentração a 90%. B) tubo após acréscimo da fração de concentração a 45%..... 14
- Figura 3** - Médias das concentrações de espermatozoides totais, móveis em tempo zero e móveis após 60 min. (M/ml = milhões por ml de pellet) após seleção em diferentes volumes de coluna GDC..... 15
- Figura 4** Pipetagem do sêmen ovino na coluna de gradiente coloidal descontínuo..... 16

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** - Distribuição dos volumes das fases de concentração 90% e 45% na coluna descontínua coloidal para todos os tratamentos de seleção espermática em ovinos..... 10
- QUADRO 2** - Distribuição das distâncias percorridas, em milímetros (mm), pelos espermatozóides em cada tratamento. Considerando o volume total (fase de concentração 90% + fase de concentração 45%)..... 10

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Análise de variância da seleção espermática em diferentes grandezas de coluna GDC. Campo Grande, Laboratório de FIV do Centro Biotecnológico da UNIDERP, 2007..... 13
- TABELA 2** - Médias das concentrações espermatozoides móveis (milhões por ml de pellet) após seleção em diferentes volumes de coluna GDC, nos tempos zero e sessenta minutos..... 13

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

- mL – mililitro
- mm – milímetro
- μL – microlitros
- μm – micrômetro
- $^{\circ}\text{C}$ – grau centígrado
- CO_2 – dióxido de carbono
- FIV – Fertilização *in vitro*
- GDC – gradiente descontínuo coloidal
- M/mL – milhões por mililitro
- PIV – produção *in vitro*
- RA – reprodução assistida
- RPM – rotação por minuto
- Seg – segundos
- ® – marca registrada

RESUMO

Com a finalidade de identificar os fatores que contribuem para a seleção e capacitação de espermatozóides *in vitro* de ovinos, o objetivo do experimento foi verificar a eficiência do método de gradiente descontínuo coloidal (GDC), usando diferentes volumes de meio, proporcionando diferentes tamanhos de coluna GDC. As atividades experimentais foram realizadas no laboratório de FIV do Centro Biotecnológico, localizado no campus III da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP, em Campo Grande – MS. Foram efetuadas em sêmen congelado da raça Santa Inês. A eficiência foi verificada através da análise do pellet, observando a concentração de espermatozóides viáveis. Constatou-se que houve melhores resultados utilizando os volumes de 0,600 mL à 90% de meio coloidal + 0,600 mL à 45% de meio coloidal e 0,700 mL à 90% de meio coloidal + 0,700 mL à 45% de meio coloidal, não havendo diferenças significativas entre eles.

Palavras-chave: biotécnica, FIV, ovino, reprodução, PIV, sêmen.

ABSTRACT

In order to identify the factors that contribute for selection and capacitation sperm's sheep in vitro, the objective in the experiment was to verify the efficiency of the method of colloidal discontinuous gradient (CGD), using different volumes of reagent, providing different sizes of CGD column. Activities experimental were performed in the laboratório de FIV do Centro Biotecnológico, localizado no campus III da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP, em Campo Grande – MS. Were held in frozen semen of racial Santa Inez. Its efficiency was verified by pellet analysis, noting the concentration of viable sperm. It was observed that there were better results using the volumes of 0,600 mL to 90% of colloidal reagent + 0,600 mL to 45% of reagent colloidal and the volumes of 0,700 mL to 90% of colloidal reagent + 0,700 mL to 45% of reagent colloidal and wasn't observed significant differences between them.

Keywords: biotechnical, IVF, IVP, reproduction, semen, sheep.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa um grande potencial para o desenvolvimento econômico e vem apresentando um ciclo de crescimento mundial. Esse crescimento tem sido intensificado, sobretudo nos países em desenvolvimento, nos últimos anos, que são detentores dos maiores rebanhos. Para acelerar o crescimento da produtividade, o investimento na biotecnologia de ponta em produção animal é respaldado pelo fato que o Brasil é líder em biodiversidade e o mercado interno de carne e leite estão entre o três maiores mercado do mundo.

O melhoramento genético é parte importante na garantia da utilização de recursos e ferramentas para o incremento da produtividade (Silva, 1983).

Conforme Machado (2007), as medidas relacionadas à reprodução são necessárias ao desempenho zootécnico e econômico, resultando em aumento das taxas de parição e de prolificidade.

No que diz respeito aos programas de melhoramento genético, a utilização das biotécnicas de reprodução têm possibilitado um crescimento qualitativo na produção, por garantir a seleção e proliferação de animais geneticamente superiores. Entre a biotécnicas de reprodução a produção *in vitro* (PIV) de embriões, segundo Bernardi (2005), ainda está em fase de

desenvolvimento, mas os estudos efetuados com a espécie ovina resultaram em contribuições significativas para a PIV de embriões de outras espécies, além de possuir bom potencial para a aplicação no melhoramento genético de rebanhos, produção de clones e animais transgênicos. Neste contexto, Hammerstedt (1996) declarou que a determinação dos aspectos qualitativos do sêmen se constitui num processo crítico na tomada de decisões para a seleção de reprodutores. Com isso é possível garantir o desenvolvimento de testes laboratoriais mais específicos com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática.

Pérez (1996) afirmou que os espermatozoides dos mamíferos após a ejaculação não são capazes de fecundar os oócitos, mesmo quando apresentam motilidade e aparente normalidade morfológica, capacidade que adquire no trato genital feminino em um processo denominado capacitação espermática.

A capacitação espermática está relacionada a mudanças fisiológicas e bioquímicas da membrana plasmática dos espermatozoides para que ocorram interações entre os eles e os oócitos. Entre os processos envolvidos podem-se verificar modificações como da fluidez da membrana, do fluxo de íons, entre outros (GORDON, 1994; BAZER et al., 1995; HARRISON, 1996).

Identificar os fatores que contribuem para a seleção e capacitação de espermatozoides *in vitro* e o estabelecimento dos procedimentos que permitam reduzir sua variação desses itens foi o objetivo deste trabalho de seleção espermática de ovinos na raça Santa Inês para reprodução *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O estabelecimento de programas de melhoria da produtividade, mediante o uso de estratégias de racionalização de manejo e de melhoramento genético garante um modelo empresarial e propõe recursos para estabelecer um melhor perfil de raças locais. Silva (1983), é de opinião de que em certos casos, raças substitutas têm comportamento menos eficiente no novo ambiente. Matos e Bettencourt (1995) estão de acordo com tais assertivas, ao declararem que devido a esses condicionalismos, assistiu-se, na última década, a novas orientações quanto à exploração de genótipos locais de animais domésticos em vias de extinção, que se prendem com a sua caracterização global e conservação genética.

De acordo com Machado (2007), o programa de melhoria produtiva consta de medidas relacionadas à reprodução dos animais e que intentam a melhoria do desempenho zootécnico e econômico do rebanho. Assim, os seus objetivos específicos são: aumentar as taxas de parição e de prolificidade (número de crias nascidas por parto), bem como acelerar os acasalamentos e a entrada em reprodução das borregas. Adicionalmente, contribui para a redução na taxa de mortalidade dos cordeiros. É fundamentado pelo conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie, da seleção de animais para reprodução (matrizes e reprodutores), dos sistemas de acasalamento (monta natural e reprodução assistida) e do diagnóstico de prenhez.

Dentro dos programas de melhoramento genético, as biotécnicas da reprodução têm possibilitado um verdadeiro avanço qualitativo na produção, em especial, por facilitar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores. Segundo Bernardi (2005), a produção *in vitro* de embriões (PIV) em ovinos ainda mantém um caráter experimental acentuado, mas dos estudos efetuados com a espécie ovina resultaram contribuições significativas para a PIV de embriões de outras espécies, principalmente no que diz respeito aos sistemas de cultivo *in vitro*. O autor afirma que os benefícios do co-cultivo de embriões com células do oviduto e da redução da concentração de oxigênio foram constatados com embriões ovinos e, posteriormente, utilizados com embriões de outras espécies de interesse zootécnico. Além da possível fonte de embriões para pesquisas básicas de biologia e fisiologia do desenvolvimento, a produção *in vitro* de embriões ovinos apresenta bom potencial para a aplicação no melhoramento genético de rebanhos ovinos, bem como na produção de clones e animais transgênicos.

A reprodução assistida (RA) é um conjunto de sistemas de acasalamento que serve de ferramenta para a disseminação de características produtivas de animais de elite para uma população de ovinos. Assim, segundo Machado (2007), o ganho genético nos rebanhos pode ser acelerado.

O reprodutor como parte imprescindível à cadeia de produção animal deve apresentar eficiente potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, capacidade de fecundação. Em particular, o potencial reprodutivo *in vitro* é cada vez mais utilizado para garantir a rápida transmissão de características produtivas desejáveis. Nesse sentido, Martins *et al* (2000) relataram que tem-se procurado, por intermédio das técnicas de reprodução assistida, testar e utilizar todas as estruturas celulares espermáticas que possam apresentar capacidade fecundante, tais como as células primordiais oriundas dos túbulos seminíferos. Nesse mesmo contexto, foi relatada por Kikuchi *et al* (1998), a utilização de espermatozoides epididimais e ejaculados. Entretanto, para o sucesso destas técnicas, são imprescindíveis que se conheçam os fatores e mecanismos envolvidos na sua capacidade fecundante, desde a formação até a saída através do ejaculado.

Hammerstedt (1996), também afirmou que a determinação dos aspectos qualitativos do sêmen se constitui num processo crítico na tomada de decisões para a seleção de reprodutores. Isso tem permitido um verdadeiro progresso, especialmente nas últimas décadas, na adaptação de testes laboratoriais mais específicos com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática, a partir da relação entre certas características estruturais e capacidade fecundante.

Na reprodução assistida (RA), de alta complexidade, como a fertilização *in vitro*, com ou sem micromanipulação de gametas, deve-se realizar o processamento dos espermatozóides no laboratório, para separar os gametas viáveis, remover toxinas e contaminantes, ou para melhorar o potencial fértil. Conforme Pérez (1996), a capacitação espermática está relacionada a mudanças fisiológicas e bioquímicas da membrana plasmática dos espermatozóides para que ocorram interações com os oócitos. Entre os processos envolvidos podem-se verificar modificações como fluidez da membrana e fluxo de íons.

Mesmo hoje, após mais de cinquenta anos da descoberta da capacitação, as bases moleculares não foram totalmente entendidas. Os primeiros relatos foram documentados por Austin (1952), da necessidade da capacitação em evidências experimentais em coelhos e ratos, e também Bedford e Chang (1983), concordaram com a importância da necessidade de capacitação espermática antes de fertilização, em mamíferos.

Bernardi (2005), em seu trabalho de produção *in vitro* de embriões (PIV) de ovinos, citou que o cultivo *in vitro* de embriões é uma ferramenta para melhoramento genético de rebanhos, dependente de avanços biotecnológicos. Entre esses, identificar os fatores que contribuem para as diferenças entre machos, em termos de capacitação e fecundação, assim como estabelecer protocolos que permitam reduzir essa variação, encontra-se entre os mais prioritários.

De acordo com Holm *et al.* (1994), a FIV pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado. No entanto, o sêmen fresco é utilizado principalmente quando machos de fertilidade comprovada estão disponíveis para a coleta. Sua

utilização apresenta os inconvenientes da necessidade de coletar o(s) macho(s) a cada FIV e da utilização restrita ao grupo de pesquisadores que dispõem desses machos. A partir do relato de sucesso e da praticidade do uso de sêmen congelado o mesmo foi incluído na maioria dos protocolos.

Segundo Parrish *et al.*(1995), após o descongelamento, para captura de espermatozoides viáveis de bovinos, o sêmen é depositado sobre gradiente de Percoll, consistindo de 2 mL de Percoll 45% e 2 mL de Percoll 90%, previamente preparado e incubado a 39°C a 5% de CO₂ em ar, por, no mínimo 1h. Mais especificamente, Fernandes (2005) utilizou esta mesma proporção em touros nelore, procedendo a centrifugação a 700 g por 20 minutos a 30°C. Em seguida retirou o sobrenadante e ressuspendeu o *pellet* com 2 mL de TALP-sp. Na seqüência, procedeu a nova centrifugação a 700 g por 5 minutos a 30°C, seguido de ressuspensão com meio de fecundação. Nesta etapa, uma amostra de sêmen diluído em solução de fecundação foi retirada para avaliação das características seminais pós-gradiente de Percoll, sendo que o restante foi usado para fertilização *in vitro*.

O descongelamento seminal pode ser um fator relevante para o sucesso da capacitação, pois pode influenciar na concentração de partida de espermatozoides viáveis do sêmen e afetar diretamente, em proporção, o resultado final. Diferentes autores verificaram este comprometimento. Borg *et al.* (1997) compararam o descongelamento do sêmen eqüino a 75°C e a 37°C e não encontraram diferenças na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozoides vivos. Vidament *et al.* (2001) estudaram a motilidade espermática do sêmen eqüino descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento (37°C e 30seg, 50°C e 10seg, 50°C e 20seg, 60°C e 10seg, 75°C e 5seg, 75°C e 10seg e 75°C e 15seg) e observaram diferença para o descongelamento a 75°C e 15 segundos, que diferiu dos demais, quando a motilidade era zero.

A importância da eficiência no descongelamento é também abordada por Soler *et al.* (2003) que demonstraram os efeitos da viabilidade e fertilidade de espermatozoides epididimais criopreservados de cervídeos, descongelados em

diferentes protocolos de descongelamento (37°C por 20 segundos; 60°C por 8 segundos; 70°C por 5 segundos). Os autores observaram que o primeiro protocolo de descongelamento é o mais adequado. Por outro lado, Fürst *et al.* (2005) verificaram que taxa de motilidade total do sêmen congelado de eqüino, com resfriamento prévio foi superior ($P < 0,05$) à do protocolo sem resfriamento, tanto no descongelamento a 75°C (44,0% *versus* 24,5%), quanto a 37°C (46,7% *versus* 25,20%). Mas dentro de cada protocolo, a temperatura de descongelamento (75°C ou 37°C) não afetou ($P > 0,05$) a taxa de motilidade total.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local e período do experimento

As atividades experimentais foram conduzidas no Laboratório de FIV do Centro Biotecnológico, localizado no Campus III da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal-UNIDERP. O período experimental ocorreu durante o mês de novembro de 2007.

3.2 Amostras

Foram utilizadas 39 palhetas de sêmen congeladas de ovino da raça Santa Inês, todos do mesmo doador, lote e partida.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Descongelamento do sêmen:

O experimento foi realizado a partir de paletas de sêmen congelado de ovinos, eram descongelados em banho-maria a 36°C por 10 seg.

3.3.2 Diferentes proporções do gradiente descontínuo coloidal:

Após descongelamento, o sêmen de ovino era submetido a coluna GDC em duas camadas: concentrações 90% e 45% respectivamente, com 13 tratamentos de proporções (volume e distância), conforme Quadros 1 e 2.

Foram realizadas três repetições, para cada uma das quais, 13 tubos (tratamentos) foram utilizados. Era previamente enriquecido e preparado a coluna de GDC e os tubos incubados a 37°C à 5% de CO₂ em ar por, no mínimo 30 min. Conforme Figura 1, em cada tubo foi distribuída primeiro a fração com gradiente mais denso na porção inferior (concentração 90%) e depois com gradiente menos denso (concentração 45%), de modo que formou uma interface entre eles. O sêmen descongelado era depositado, delicadamente, sobre o gradiente superior, formando outra interface e era centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos para impulsionar os espermatozoides através das camadas de densidades diferentes, separando-os, assim, do plasma seminal, outros elementos celulares e provocando as mudanças bioquímicas e fisiológicas. Ao final do processo, no fundo do tubo, adquiria-se um pellet com essa fração de espermatozoides viáveis. A camada superior era removida e descartada e esse pellet era submetido à avaliação.

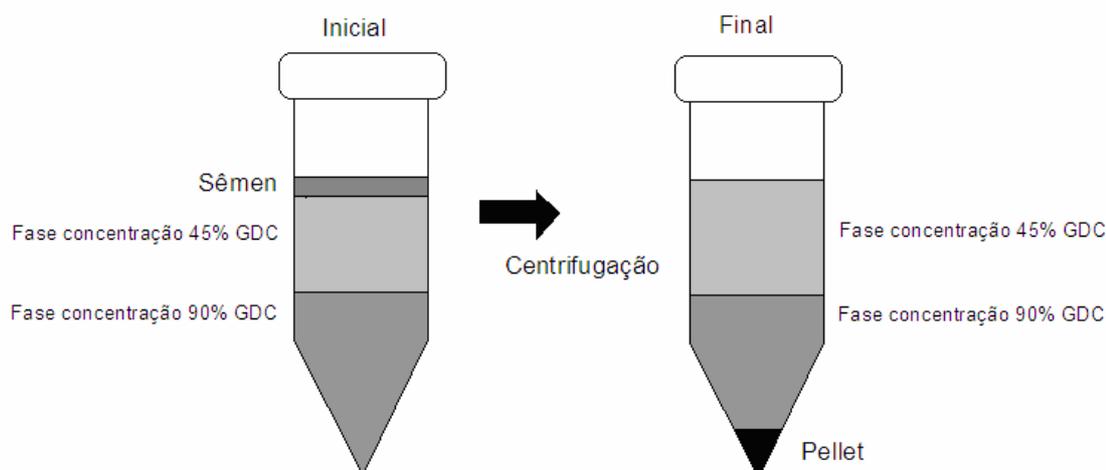


Figura 1 - Esquema da técnica do gradiente descontínuo coloidal (GDC), distribuição da fase 90% e fase 45% formando a coluna.

QUADRO 1 - Distribuição dos volumes das fases de concentrações 90% e 45% na coluna descontínua coloidal para todos os tratamentos de seleção espermática em ovinos.

Tratamento	Volume Fase 90%	Volume Fase 45%
1	0,300 mL	0,300 mL
2	0,400 mL	0,400 mL
3	0,500 mL	0,500 mL
4	0,600 mL	0,600 mL
5	0,700 mL	0,700 mL
6	0,800 mL	0,800 mL
7	0,900 mL	0,900 mL
8	1,000 mL	1,000 mL
9	1,200 mL	1,200 mL
10	1,400 mL	1,400 mL
11	1,600 mL	1,600 mL
12	1,800 mL	1,800 mL
13	2,000 mL	2,000 mL

3.4 Avaliações do Experimento

Logo após a capacitação, no tempo zero e após 60 min. foram realizadas as análises do pellet, avaliando as concentrações totais e móveis dos espermatozóides. O pellet e todo material utilizado na avaliação eram mantidas a temperatura de 37°C para garantir suas características.

A concentração total foi realizada através da diluição do pellet em água destilada, na proporção 1:6 e as células espermáticas foram contadas em câmara de Neubauer, em microscopia óptica a 400x. A concentração total foi expressa em milhões por ml de pellet.

QUADRO 2 - Distribuição das distâncias percorridas, em milímetros (mm), pelos espermatozóides em cada tratamento. Considerando o volume total (fase de concentração 90% + fase de concentração 45%).

Tratamento	Volume Total	Distância percorrida
1	0,600 ml	15 mm
2	0,800 ml	18 mm
3	1,000 ml	19 mm
4	1,200 ml	20 mm
5	1,400 ml	21 mm
6	1,600 ml	24 mm
7	1,800 ml	25 mm
8	2,000 ml	26 mm
9	2,400 ml	29 mm
10	2,800 ml	32 mm
11	3,200 ml	34 mm
12	3,600 ml	37 mm
13	4,000 ml	40 mm

As concentrações de espermatozoides móveis foram realizadas diluindo o pellet em meio sêmen na proporção 1:6, foram colocadas entre lâmina e lamínula, em microscopia óptica a 100x. Para análise da motilidade, foi observada em 200 células espermáticas a quantidade de células móveis, foi transformada em percentagem e calculada a concentração em milhões por ml, através do resultado da concentração total.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da análise de variância e do teste de comparação de médias oriundos dos tratamentos encontram-se retratados nas Tabelas 1 e 2. Verifica-se que o coeficiente de variação foi baixo (inferior a 1%) indicando uma ótima precisão experimental. Um dos fatores para o êxito experimental foi a manutenção de temperatura específica a 36°C por 10 segundos no descongelamento das palhetas, o qual manteve a concentração de partida dos espermatozóides viáveis do sêmen e diretamente, em proporção no resultado final. Importância que foram abordadas por Borg *et al.* (1997), ao compararem o descongelamento do sêmen eqüino, por Vidament *et al.* (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen eqüino descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento, por Soler *et al.* (2003), que demonstraram os efeitos da viabilidade e fertilidade de espermatozóides epididimais criopreservados de cervídeos, descongelados em diferentes protocolos de descongelamento e por Fürst *et al.* (2005), quando verificaram a taxa de motilidade total do sêmen eqüino congelado em diferentes protocolos.

Os resultados dessa pesquisa comprovaram a eficiência do uso de sêmen congelado, concordando com Holm *et al.* (1994), que afirmaram o sucesso e a praticidade do uso de sêmen congelado na FIV.

TABELA 1– Análise de variância da avaliação da seleção espermática em diferentes grandezas de coluna GDC. Campo Grande, Laboratório de FIV do Centro Biotecnológico da UNIDERP, 2007.

FV	G.L.	Capacitação espermática	
		Q.M. tempo zero	Q.M. 60 minutos
Volume da coluna	12	3965,003**	594,406**
Repetição	2	0,646 ^{n.s.}	0,008**
Erro	24	0,374	0,072
Total	38		
Média		70,30	33,718
C.V. (%)		0,87	0,79

** e^{n.s.} significativo à 1% e não significativo a 5% pelo teste F.

TABELA 2 - Médias das concentrações espermatozóides móveis (milhões por ml de pellet) após seleção em diferentes volumes de coluna GDC, nos tempos zero e sessenta minutos.

fase 90%+45%(mL)	Tempo Zero	60 minutos
0,600	96,97 D	53,83 A
0,800	102,70 C	51,33 B
1,000	108,00 B	49,10 C
1,200	113,10 A	46,57 D
1,400	114,20 A	40,77 E
1,600	89,00 E	36,63 F
1,800	75,77 F	34,43 G
2,000	63,93 G	31,97 H
2,400	44,27 H	24,60 I
2,800	35,73 I	22,33 J
3,200	28,23 J	16,17 K
3,600	22,90 K	15,30 L
4,000	19,13 L	15,30 L
Média	70,295	33,718

Pode-se verificar, pelo teste de comparação de médias, a indicação de associação entre a grandeza da coluna e as concentrações de espermatozoides móveis finais.

Na avaliação da motilidade espermática, após a finalização do processo de seleção *in vitro*, foram comparadas as médias pelo teste de Tukey e foi observado nos tratamentos onde a coluna total era 1,200 mL e 1,400 mL os melhores resultados, conforme demonstrado na Tabela 2.

Há a necessidade de estudos e realizações das FIV para verificar pontos de interrogação, como os tratamento com volume total da coluna 0,600 mL, 0,800 mL e 1,000 mL em que a proporção de espermatozoides móveis, em relação ao total foi menor em comparação com os tratamentos onde a coluna total eram 1,200 mL e 1,400 mL, no entanto após 60 min , foi observado uma maior resistência, isto é, uma degradação menor dos espermatozoides selecionados.

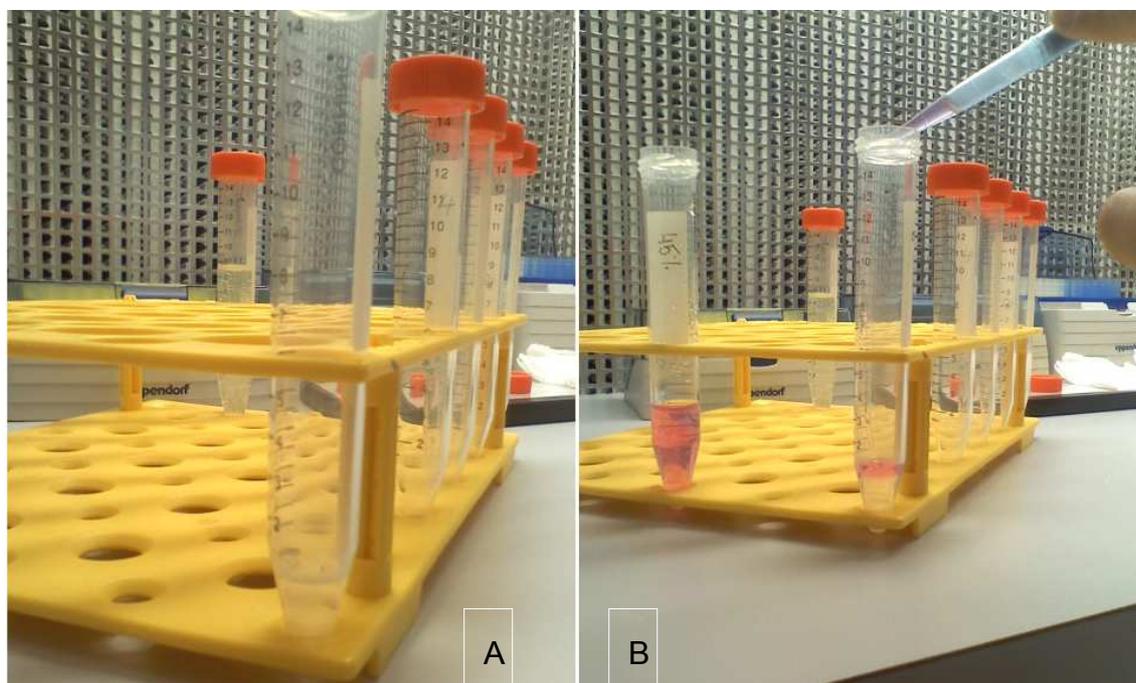


Figura 2 –Procedimento de montagem da coluna GDC. A) tubo cônico apresentando apenas a fração de concentração a 90%. B) tubo cônico após acréscimo da fração de concentração a 45%.

Conforme Hammerstedt (1996), sobre a importância de testes laboratoriais com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática e facilitar nas tomadas de decisões. Os resultados desse experimento garantem uma melhor eficácia na utilização dos tratamentos onde a coluna total era 1,200 mL e 1,400 mL (Figura 3).

No entanto, na avaliação da motilidade espermática após 60 min. da finalização do processo de seleção *in vitro*, foram comparadas as médias pelo teste de Tukey e foi observado um padrão decrescente nos resultados, tendência que pode ser observada nos resultados apresentados na Tabela 2.

No tempo zero, a proporção de espermatozoides móveis em relação ao número total de espermatozoides foi crescente até o tratamento 5, e a partir daí, decrescente até o tratamento 13. No entanto, após 60 min. observou-se que a proporção de espermatozoides móveis em relação ao total foi sempre decrescente (Figura 3).

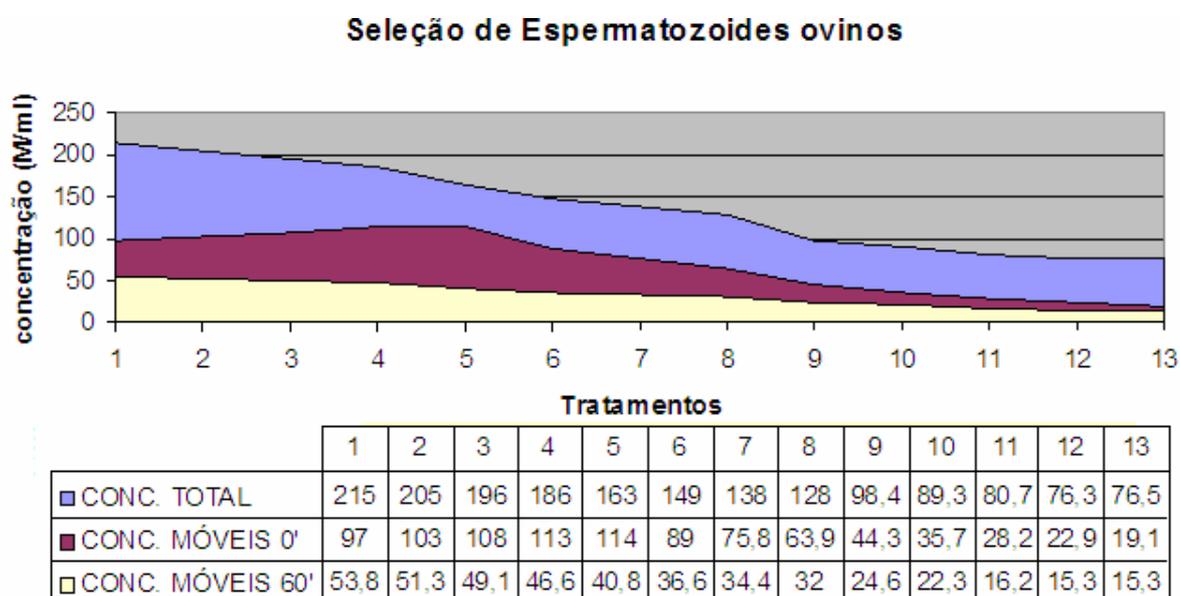


Figura 3- Médias das concentrações de espermatozoides totais, móveis em tempo zero e móveis após 60 min. (M/ml = milhões por ml de pellet) após seleção em diferentes volumes de coluna de GCD.

A distância percorrida pelos espermatozoides no gradiente coloidal, inicia-se com aproximadamente 15 mm no tratamento 1, aumentando constantemente até o tratamento 13, onde chega a percorrer uma distância de aproximadamente 40 mm. A distribuição das distâncias percorridas em cada tratamento pode ser observado no quadro 2. Levando em consideração o tamanho das células espermáticas, aproximadamente 50 μm , estes percorrem distâncias 300 a 800 vezes seu tamanho.

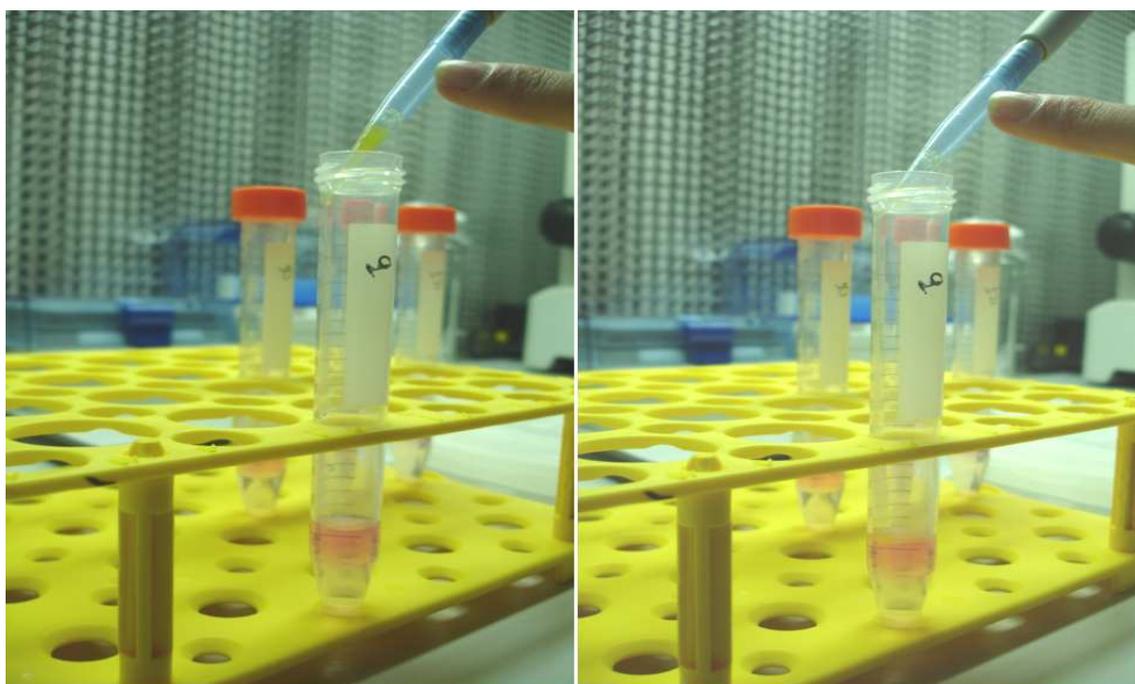


Figura 4 – Pipetagem do sêmen ovino na coluna de gradiente coloidal descontinuo.

Em comparação com os protocolos descritos por Parrish et al.(1995) e por Fernandes (2005), para capacitação de espermatozoides bovinos e touro nelore, em que o sêmen é depositado sobre gradiente de Percoll® consistindo de 2 mL de Percoll® 45% e 2 mL de Percoll 90%, o experimento demonstrou que estas proporções de coluna GCD não propõem os melhores resultados para ovinos, e ainda neste caso, estabelece uma grande economia, Já que os tratamentos 4 e 5 podem são executados respectivamente com apenas 0,6 mL da concentração 45% e 0,6 mL da concentração 90%, e 0,7 mL da concentração 45% e 0,7 mL da concentração 90% (Figura 4).

Tendo em vista que no experimento foi utilizado apenas sêmen da raça Santa Inês, faz-se necessário comparar os resultados em outras raças de ovinos, para verificar se há efeito genotípico que possa diferir nos resultados.

5. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A produção *in vitro* de embriões a partir de sêmen congelado de ovinos, é eficaz na obtenção de espermatozóides com alta motilidade.

Os melhores resultados para seleção de espermatozóides em ovinos da raça Santa Inez, ocorrem através das colunas com volume total de GDC de 1,200 mL e 1,400 mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSTIN, C.R. The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**, London, v.170, n. 326, ago, 1952.

BAZER, F.W.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. p.191-216.

BEDFORD, J.M.; CHANG, M.C. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. **Biology of Reproduction**, Madison, v.28, n.1, p.108-120, fev. 1983.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.1, p.1-16, 2005.

BORG, K.; COLEMBRANDER, B.; FAZELI, A. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v.48, n.4, p.531-536, set. 1997.

FERNANDES, C. E. S. **Perfil eletroforético, características estruturais e fertilidade *in vitro* do sêmen de touros Nelores submetidos à degeneração testicular por insulação**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista - USP, 2005. 106 p. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, USP, Botucatu).

FURST, R.; CARVALHO, G. R.; FURST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.5, p.599-607, out.. 2005.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 1ª ed. Wallingford: CAB International, 1994. Cap. 3, p.143-69. 1994.

HAMMERSTEDT, R.H. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, n.11, p.77-87, abr. 1996.

HARRISON, R. A. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v.8, n.4, p.581-594, jun. 1996.

HOLM, P.; IRVINE, B.; ARMSTRONG, D. T.; SEAMARK, R. F. In vitro production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen semen and oviductepithelial cell co-culture for IVF. **Theriogenology**, New York , v.41, p.217, 1994.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N. Cryopreservation and ensuing "in vitro" fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4°C. **Theriogenology**, New York, v.50, n.4, p.615-633, set. 1998.

MACHADO, R. **Manejo Reprodutivo**. in CHAGAS, A. C.S. **Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, cap.4, p.28-36, março, 2007.

MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; MATARAZZO, R. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididymal spermatozoa by analysis of motility, acrosomal status, penetration ability in oocytes and integrity of spermchromatin. **Biology of Reproduction**, Madison, v.62, n.1, p.156, 2000.

MATOS, C. A. P.; BETTENCOURT, C. M. V. Preservação da variabilidade genética em pequenas populações de animais domésticos. **Revista Portuguesa de Zootecnia** , Vila Real, v. 2, n.º. 1, p.49-58, 1995 .

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO, P. J. L. Effect of bovine sperm separation by either swimup or percoll methods on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, New York, v.44, n.7, p.859-869, nov. 1995.

PÉREZ, L.J. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, New York, v. 45, n.6, p.1037-1046, abr. 1996.

SILVA, J. M. P. Conservação dos recursos genéticos. **Ministério da Agricultura, Florestas e Alimentação, Instituto Nacional de Investigação Agrária e de Extensão Rural**. Divulgação N°. 15.1983.

SOLER, A.J.; GARCIA, A.J.; SANTOS, M.R.F.; ESTESO, M.C.; GARDE, A.J.J. Effects of thawing procedure on post-thawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.24, n.5, p.1-19, set/out. 2003.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, G. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science.**, Amsterdam, v.68, n.3-4, p.201-218, 2001.