

## Fertilidade de sêmen suíno avaliada pelo teste de ligação dos espermatozóides a um substrato sintético<sup>(1)</sup>

Goreti Ranincheski dos Reis<sup>(2)</sup>, Mari Lourdes Bernardi<sup>(3)</sup>, Ivo Wentz<sup>(2)</sup>, Fernando Pandolfo Bortolozzo<sup>(2)</sup>, Karl Fritz Weitze<sup>(4)</sup>, Rupert Amann<sup>(5)</sup>, Claudia Kellers<sup>(4)</sup> e Jana Zemmrich<sup>(4)</sup>

Resumo — O objetivo deste trabalho foi avaliar a fertilidade de sêmen suíno pelo teste de ligação de espermatozóides a um substrato sintético. A motilidade (MOT) e o porcentual de espermatozóides ligados (PEL) foram avaliados após 5, 24, 48 e 72 horas de armazenamento a 17°C. O PEL foi determinado em soluções contendo 6,25 ou 12,5 milhões de espermatozóides/mL, com ou sem albumina sérica bovina (BSA), preparadas a partir de dois a cinco ejaculados de cada um dos quatro machos. Cinquenta e oito leitoas foram inseminadas, uma vez, 24 horas após o início do estro. Houve correlação positiva ( $P = 0,0001$ ;  $r = 0,33$ ) entre a MOT e o PEL. O PEL foi maior com 12,5 milhões de espermatozóides/mL e na presença de BSA ( $P < 0,05$ ). Após 72 horas, o macho 3 apresentou PEL inferior ao dos outros três ( $P < 0,05$ ). As taxas de clivagem (TC) e de embriões morfológicamente normais não diferiram entre indivíduos, mas o macho 3 apresentou menos de 70,0% de TC no quartil superior, enquanto os outros tiveram mais de 75,0%. Os machos diferem quanto à capacidade de ligação de seus espermatozóides ao substrato sintético, a partir de 24 horas de armazenamento do sêmen. A ligação dos espermatozóides ao substrato sintético é maior com a inclusão de BSA e com o aumento da concentração espermática.

Termos para indexação: albumina sérica, inseminação artificial, ligação espermatozóide-ovócito.

### Boar semen fertility evaluated by a sperm-binding assay to a synthetic substrate

Abstract — The objective of this work was to evaluate boar semen fertility by a sperm-binding assay to a synthetic substrate. Motility (MOT) and percentage of bound sperm (PSB) were evaluated after 5, 24, 48 and 72 hours of storage at 17°C. PSB was analyzed in solutions containing 6.25 or 12.5 million of spermatozoa/mL, with or without bovine serum albumin (BSA), processed from two to five ejaculates of four boars. Fifty eight gilts were inseminated, a single time, 24 hours after the beginning of estrus. There was a positive correlation ( $P = 0.0001$ ;  $r = 0.33$ ) between MOT and PSB. Higher percentages of PSB were observed with 12.5 million of spermatozoa/mL and in the presence of BSA ( $P < 0.05$ ). After 72 hours, boar 3 showed lower PSB ( $P < 0.05$ ) than the other boars. The cleavage (TC) and normal embryo rates did not differ among boars, but boar 3 showed less than 70.0% of TC belonging to the superior quartile while boars 1, 2 and 4 had more than 75.0%. After 24 hours of sperm storage, boars differ in their sperm binding to the synthetic substrate. Binding of swine spermatozoa to the synthetic substrate is higher in the presence of BSA and with the increase of spermatic concentration.

Index terms: serum albumin, artificial insemination, sperm-egg binding.

<sup>(1)</sup>Aceito para publicação em 29 de agosto de 2003.

Extraído da tese de doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

<sup>(2)</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Veterinária, Setor de Suínos, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS. E-mail: grreis@hotmail.com, ivowentz@vortex.ufrgs.br, fbortol@vortex.ufrgs.br

<sup>(3)</sup>UFRGS, Faculdade de Agronomia, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS. E-mail: bernardi@orion.ufrgs.br

<sup>(4)</sup>Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Reproduktionsmedizin, Bünteweg 15, D30559, Hannover, Alemanha. E-mail: karl.fritz.weitze@tiho-hannover.de, claudiakellers@excite.com, janazemmrich@hotmail.com

<sup>(5)</sup>BioPore Inc., 819 Marble Drive, Fort Collins, CO 80526, USA. E-mail: ramann@lamar.colostate.edu

### Introdução

A estimativa visual da motilidade (Colenbrander & Kemp, 1991) e das alterações de morfologia (Woelders, 1991) da célula espermática tem sido utilizada para a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen suíno. No entanto, estudos têm mostrado que, quando estiver acima de 60,0%, a motilidade espermática não permite a predição da fertilidade do macho suíno, *in vivo* (Flowers, 1996). Machos suínos com variação de motilidade espermática de 53,8% a 72,5%, no oitavo dia de armazenamento do sêmen *in vitro*, não apresentaram diferenças nas taxas de parto e tamanho de leitegada (Xu et al., 1998). Após a inseminação de leitoas com doses de 3 bilhões de espermatozoides, Tardif et al. (1999) não observaram correlação entre a motilidade espermática e a fertilidade, representada pelo número de fetos em relação ao número de corpos lúteos, nas 5 semanas de gestação. Em virtude da pequena variação observada na normalidade de acrossoma, no sêmen suíno mantido resfriado durante uma semana, Vazquez et al. (1998) sugerem que este parâmetro estaria relacionado com a capacidade fecundante do espermatozoide somente na presença de elevado percentual de anormalidades.

Testes que incluem a interação dos gametas masculino e feminino, tais como o de ligação à zona pelúcida (Ivanova & Mollova, 1993; Fazelli et al., 1995; Ferreira, 1998), de penetração no ovócito (Gadea et al., 1998) e de fecundação (Martinez et al., 1993; Xu et al., 1996, 1998) *in vitro* têm sido avaliados quanto à possibilidade de melhorar a predição da fertilidade, embora o número de estudos, na espécie suína, ainda seja pequeno.

Um novo teste *in vitro* foi desenvolvido por Barbato et al. (1998), baseado na capacidade de ligação de espermatozoides de aves e mamíferos a um substrato da membrana perivitelina do ovo de galinha, simulando a interação dos gametas. Neste teste, o substrato sintético teria uma ação homóloga à zona pelúcida de ovócitos de mamíferos. A versão comercial (BioPore - SBA) do teste de ligação (Sperm-Binding Assay, SBA), similar ao terceiro teste descrito por Barbato et al. (1998), consiste de uma microplaca contendo um extrato da membrana perivitelina do ovo de galinha, enriquecido com uma

proteína de ligação denominada prosaposina ou glicoproteína-1 sulfatada, conjugada a um corante fluorescente. Após exposição ao substrato sintético, avalia-se o percentual de espermatozoides ligados.

A grande variação que ocorre entre os ovócitos, quanto à capacidade de aderência da célula espermática (Xu & Foxcroft, 1996), diminui a exatidão da observação de diferenças entre machos. Com o uso de um substrato sintético, como é o do teste SBA, espera-se maior uniformização da resposta de um mesmo macho e, com isto, maior probabilidade de observar diferenças entre machos, na capacidade de ligação de seus espermatozoides.

O teste SBA tem sido usado para identificar galos (Barbato et al., 1998) e perus (Gill et al., 1999b) subfêrteis, bem como registrar diferenças nas populações de espermatozoides humanos e avaliar os danos espermáticos decorrentes do congelamento (Amann et al., 1999a). O teste também tem sido usado para avaliar se a versão sintética (FertPlus®) de um fragmento da prosaposina, presente no plasma seminal, e envolvido na ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina de aves, aumentaria a ligação e a fertilidade dos espermatozoides de touros (Amann et al., 1999a, 1999b), cachacos (Amann et al., 1999a), perus (Gill et al., 1999a) e homens (Amann et al., 1999a, 1999c).

O emprego do teste SBA ainda está restrito ao campo experimental, por causa do elevado custo do equipamento necessário para determinar o percentual de espermatozoides ligados ao substrato. No entanto, sua praticidade, quando comparado a outros testes que avaliam aspectos da interação espermatozoide-ovócito, justifica a obtenção de mais informações sobre a espécie suína.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da concentração espermática, da presença de BSA e dos machos sobre a capacidade de ligação dos espermatozoides ao substrato sintético do teste e as taxas de clivagem e de embriões normais, após inseminação.

### Material e Métodos

Foram utilizados dois a cinco ejaculados de cada um dos quatro machos, que, após coleta e avaliação, foram processados em diluente comercial, com o acréscimo ou

não de albumina sérica bovina (BSA). As doses de sêmen (DS), contendo 1 bilhão de espermatozoides em um volume final de 80 mL, foram conservadas a 17°C durante o período de avaliação.

As doses de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade (MOT) e quanto à capacidade de ligação dos espermatozoides ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay), após 5, 24, 48 e 72 horas de armazenamento. A MOT foi avaliada entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico (160x), a partir de uma alíquota de 1 mL retirada da DS após incubação a 37°C por dez minutos. Amostras independentes foram utilizadas para a avaliação da MOT e da capacidade de ligação pelo teste SBA. Na realização do teste SBA, foi determinada a concentração espermática de cada DS, em câmara hematocitométrica. Em seguida, foram preparadas quatro soluções seminais de trabalho (ST), para cada macho, contendo 6,25 ou 12,5 milhões de espermatozoides/mL, em diluente com e sem BSA.

Inicialmente, foi efetuada a hidratação do substrato sintético, pela lavagem dos 96 poços da placa do teste SBA, com diluente sem BSA. Logo após, foi efetuada a secagem da placa com papel absorvente, e a pipetagem de 100 µL do diluente sem BSA, em cada poço a ser utilizado para o teste. Posteriormente, foram pipetados 100 µL de cada uma das quatro ST, em seis poços para cada macho avaliado, de acordo com um mapa da placa, previamente determinado. A placa foi incubada a 37°C durante 60 minutos. Após a incubação, as ST e o diluente foram desprezados e a placa lavada com diluente sem BSA, secada com papel absorvente e conservada, sem a tampa, numa área limpa e seca, durante a noite. No dia seguinte, a placa seca e com tampa foi colocada em local limpo e seco, até o momento da leitura para a determinação do percentual de ligação. Antes da leitura, a placa foi submetida à temperatura de 60°C por 18 horas. O percentual de espermatozoides ligados (PEL) ao substrato do teste SBA foi determinado, em microscopia de fluorescência, e expresso por massa de proteína ligada, segundo Barbato et al. (1998).

Simultaneamente à avaliação seminal *in vitro*, foram inseminadas 14, 16, 15 e 13 leitoas, com DS dos machos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, uma única vez, 24 horas após a observação do estro. Das 58 fêmeas inseminadas, 20 receberam DS do primeiro dia de armazenamento (5, 4, 5 e 6 DS dos machos 1, 2, 3 e 4, respectivamente) e 38 do terceiro dia (9, 12, 10 e 7 DS dos machos 1, 2, 3 e 4, respectivamente). As fêmeas foram abatidas, em média, três a cinco dias após a ovulação, que foi monitorada por ultra-sonografia transcutânea. Os embriões foram coletados após a lavagem dos cornos uterinos com meio PBS acrescido de 1,0% de BSA. A morfologia e o estágio de desen-

volvimento das estruturas recuperadas foram avaliados sob estereomicroscópio (Sugie et al., 1982) e pela coloração de núcleos, a qual foi efetuada usando uma solução de Hoechst na concentração de 50 µg/mL de água bidestilada. A visualização dos núcleos foi efetuada em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm).

Foram determinadas as taxas de recuperação (percentual de estruturas recuperadas/número de corpos lúteos), de clivagem (percentual de embriões clivados/estruturas recuperadas) e de embriões morfológicamente normais, estes em relação aos embriões clivados (percentual de embriões normais/embriões clivados) e também às estruturas recuperadas (percentual de embriões normais/estruturas recuperadas). Foram considerados anormais os embriões degenerados ou que estavam cronologicamente atrasados em seu desenvolvimento.

Foi também verificada a frequência de distribuição dos resultados do teste SBA, nos quatro machos suínos, dentro dos quatro percentis, conforme Gill et al. (1999b).

As taxas de recuperação, de clivagem e de embriões morfológicamente normais foram submetidas à transformação arco-seno raiz quadrada. De acordo com Gill et al. (1999b), os percentuais de ligação dos espermatozoides foram submetidos à transformação Logit:

$PEL = [\ln(P/1-P)]$ , em que P é o percentual de espermatozoides ligados.

Após transformação, os dados referentes às taxas de recuperação, de clivagem e de embriões normais foram analisados pelo procedimento GLM (SAS Institute, 1999), sendo considerados os efeitos do macho, da BSA, do tempo de armazenamento das doses de sêmen e das interações duplas entre estes fatores. O percentual de ligação dos espermatozoides e a MOT foram analisados como medidas repetidas pelo procedimento MIXED (SAS Institute, 1999), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade. Quanto aos percentuais de ligação, foram avaliados o efeito da BSA, do macho, da concentração espermática, do momento de avaliação e da interação dupla entre esses fatores. Os dados são apresentados sob a forma de médias sem a transformação. Foi avaliada a relação entre MOT e PEL pela correlação de Spearman.

## Resultados e Discussão

Os percentuais médios de espermatozoides ligados (PEL) variaram de 0,05% a 8,97% ( $2,57\% \pm 0,18$ ) na concentração de 6,25 milhões de espermatozoides/mL, tendo sido inferiores ( $P < 0,01$ ) aos da concentração de 12,5 milhões de espermatozoides/mL, que varia-

ram de 0,43% a 8,83% ( $2,74\% \pm 0,16$ ). Em perus, com o uso de sêmen in natura, maiores PEL ( $P < 0,05$ ) foram observados, utilizando 2 ou 4 milhões de espermatozoides/mL, em comparação às concentrações de 1, 6 ou 8 (Gill et al., 1999b). Analisando o sêmen humano in natura, Amann et al. (1999a) observaram que diferenças no PEL, entre amostras, foram mínimas com o uso de concentrações maiores que 2 milhões de espermatozoides/mL. Segundo esses autores, a ligação do espermatozóide ao substrato do teste SBA ocorre numa forma dose-dependente. Entretanto, usualmente, o PEL decresce progressivamente com o aumento do número de espermatozoides, uma vez que ocorre redução da probabilidade de ligação, por causa do aumento da competição, independentemente do potencial de ligação da célula espermática (Gill et al., 1999b).

Os valores de PEL na presença de BSA variaram de 0,11% a 8,97% ( $3,24\% \pm 0,19$ ) e foram superiores ( $P < 0,01$ ) aos observados na sua ausência, os quais variaram de 0,05% a 8,38% ( $2,07\% \pm 0,05$ ). Embora a inclusão de BSA, no sêmen humano in natura e no sêmen bovino congelado, não tenha afetado os resultados de ligação (Amann et al., 1999a), a BSA aumentou o percentual de ligação espermática. A BSA tem sido acrescentada em alguns diluentes de sêmen suíno em razão de seu provável efeito protetor, cujo mecanismo ainda não é totalmente conhecido (Weitze, 1991). Por ter alta afinidade a várias substâncias de baixa massa molecular, a BSA pode estar envolvida na remoção de um fator inibidor presente no espermatozóide, podendo, assim, aumentar a sua motilidade (Weitze, 1991). De fato, maiores percentuais ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides móveis ( $73,7\% \pm 0,99$ ) foram verificados nas doses seminais contendo BSA comparadas às processadas sem BSA ( $62,5\% \pm 1,53$ ), considerando a média de todos os momentos de avaliação. Por sua vez, sabe-se que a BSA está envolvida na remoção do colesterol da membrana espermática e conseqüentemente na alteração na permeabilidade desta, facilitando a capacitação espermática in vitro (Yanagimachi, 1989; Visconti et al., 2002). Assim, a facilitação da capacitação também poderia explicar a maior capacidade de ligação dos espermatozoides visto que o substrato sintético simula o papel da zona pelúcida na interação espermatozóide-ovócito.

Os coeficientes de variação (CV) do PEL, 5 horas após a diluição, foram 31,0%, 31,7%, 54,0% e 73,0%, respectivamente, nos machos 1, 4, 3 e 2, sendo especialmente altos os dois últimos valores. Em humanos, Amann et al. (1999d) observaram, no sêmen in natura, CV de 31,0%, similar ao apresentado pelos machos 1 e 4. Porém, a variação encontrada em perus foi de 17,0% e considerada satisfatória para o emprego desse teste na avaliação da fertilidade (Gill et al., 1999b). A variação em suínos parece ser maior do que nas outras espécies, embora ainda não seja conhecida a razão para tal e nem esteja divulgada a variação do valor de ligação dos espermatozoides que pode ser satisfatória para a aplicação do teste SBA, nessa espécie.

Houve efeito ( $P = 0,027$ ) da interação entre o tempo de armazenamento e o macho (Tabela 1). Houve redução ( $P < 0,05$ ) do PEL, nas 72 horas de armazenamento, apenas no macho 3. Em perus, redução ( $P < 0,05$ ) no PEL (5,24% para 2,88%) foi verificada mais cedo, com 24 horas de armazenamento (Gill et al., 1999b).

Gill et al. (1999b) descrevem a importância de utilizar um teste capaz de diferenciar os machos logo após a coleta do ejaculado. Considerando a avaliação efetuada nas 5 horas de armazenamento das doses de sêmen, contendo 12,5 milhões de espermatozoides/mL e a presença de BSA, os machos avaliados não apresentaram diferenças no potencial de ligação de seus espermatozoides (Tabela 1). Nas 24 e 48 horas, o macho 3 apresentou PEL inferior ao do macho 4 e, nas 72 horas, esse mesmo macho teve PEL inferior ( $P < 0,05$ ) ao dos outros três. O fato de diferenças entre os machos aparecerem com o aumento do tempo de armazenamento deixa dúvidas quanto à possibilidade

**Tabela 1.** Porcentuais de espermatozoides suínos (média±erro-padrão) ligados ao substrato do teste Sperm-Binding Assay (SBA) em diferentes períodos de armazenamento das doses de sêmen resfriado<sup>(1)</sup>.

Macho	Tempo de armazenamento (horas)			
	5	24	48	72
1	3,99±0,6Aa	3,57±0,4Aab	1,92±0,2Aab	3,75±0,6Aa
2	2,70±0,5Aa	2,63±0,4Aab	1,88±0,3Aa	2,80±0,5Aa
3	1,86±0,3Aa	2,01±0,3Aa	1,60±0,3Aa	0,84±0,2Bb
4	4,17±0,4Aa	4,84±0,5Ab	4,71±0,6Ab	3,68±0,4Aa

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

de de efetuar esse teste logo após a coleta do ejaculado.

Em relação à motilidade espermática, não foi verificada interação entre o tempo de armazenamento e os machos, nem diferenças entre eles. Houve redução ( $P < 0,05$ ) na motilidade média do sêmen, nas 72 horas (63,2%) de armazenamento, em relação à motilidade observada nas 5 (82,4%), 24 (78,7%) e 48 horas (73,8%). Foi observada correlação positiva ( $P = 0,0001$ ), embora baixa ( $r = 0,33$ ), entre MOT e PEL. Dessa forma, a MOT explicaria apenas 11,0% ( $R^2 = 0,1102$ ) da variação no percentual de ligação. Este valor é semelhante ao observado em humanos ( $R^2 = 0,1082$ ), após o descongelamento dos espermatozoides. O valor da correlação entre MOT e PEL mostra que, além da motilidade, outros aspectos funcionais da célula espermática devem estar relacionados à capacidade de ligação do espermatozoide ao substrato do teste SBA (Amann et al., 1999d).

Uma das formas de classificar os machos de acordo com os resultados do teste SBA é pela frequência de distribuição dos percentuais de ligação, dentro dos quartis superior (QS), intermediários (QIM) ou inferior (QI), conforme efetuado por Gill et al. (1999b). O macho 1 apresentou 75,0% de seus ejaculados com valores de PEL situados no QS, enquanto nenhum ejaculado do macho 3 apresentou valor de PEL dentro deste quartil (Tabela 2). Ainda não há informações sobre a melhor forma de observar diferenças entre os machos pelos resultados do teste SBA, mas se constata que, mesmo utilizando a classificação de acordo com a frequência de distribuição dos PELs em quartis, há grande variação entre as avaliações de um mesmo macho, na espécie suína.

Foram avaliados dois a cinco ejaculados por macho, número semelhante aos três a quatro ejaculados utilizados na avaliação da capacidade de ligação ao substrato do teste SBA por espermatozoides humanos (Amann et al., 1999d), bovinos (Amann et al., 1999a) ou de perus (Gill et al., 1999b). Contudo, considerando a possibilidade de maior variabilidade em suínos, entre ejaculados de um mesmo macho, é necessário aumentar o número de ejaculados avaliados por macho.

A taxa média de recuperação de estruturas após a lavagem dos cornos uterinos foi de 79,3%, não tendo diferido de acordo com os machos ( $P > 0,05$ ). Embora as taxas de clivagem (TC) e de embriões morfológicamente normais tenham sido semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre os quatro machos, o macho 3 apresentou percentual inferior a 70,0% de suas inseminações com TC pertencentes ao quartil superior, enquanto os outros tiveram mais de 75,0% das TC neste quartil (Tabela 3). As taxas de embriões morfológicamente normais observadas com o uso de doses de sêmen do primeiro dia de armazenamento, calculadas em relação aos embriões fecundados ( $87,7\% \pm 6,3$ ) ou estruturas recuperadas ( $81,5\% \pm 6,8$ ),

**Tabela 2.** Distribuição dos ejaculados de machos suínos conforme os percentuais de espermatozoides ligados ao substrato do teste Sperm-Binding Assay (SBA) situados nos quartis inferior (QI), intermediário (QIM) e superior (QS), 5 horas após a diluição do sêmen<sup>(1)</sup>.

Macho	Número de ejaculados em cada quartil		
	QI	QIM	QS
1	0/4	1/4	3/4
2	2/4	1/4	1/4
3	2/5	3/5	0/5
4	0/2	1/2	1/2

<sup>(1)</sup>QI =  $\leq 25\%$ ; QIM entre 26% e 75%; QS =  $\geq 75\%$ .

**Tabela 3.** Taxas de clivagem (TC) e de embriões normais, em relação ao número de embriões clivados (TENC) ou de estruturas recuperadas (TENR) e sua distribuição percentual nos quartis inferior (QI) e superior (QS), de acordo com os machos avaliados<sup>(1)</sup>.

Macho	TC <sup>(2)</sup>	QI	QS	TENC <sup>(2)</sup>	QI	QS	TENR <sup>(2)</sup>	QI	QS
2	88,3 $\pm$ 5,8a (11-100)	3/16	13/16	80,8 $\pm$ 8,2a (20-100)	4/16	11/16	71,3 $\pm$ 9,1a (11-100)	5/16	7/16
3	79,6 $\pm$ 8,3a (23-100)	5/15	10/15	59,3 $\pm$ 11,9a (0-100)	6/15	7/15	54,4 $\pm$ 11,7a (0-100)	8/15	6/15
4	86,8 $\pm$ 7,2a (20-100)	3/13	10/13	71,9 $\pm$ 9,1a (0-100)	4/13	6/13	64,0 $\pm$ 10,2a (0-100)	4/13	4/13

<sup>(1)</sup>QI =  $\leq 25\%$ ; QS =  $\geq 75\%$ . <sup>(2)</sup>Valores expressos em percentual  $\pm$  erro-padrão; números entre parênteses significam mínimo e máximo; médias de TC, TENC e TENR seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

foram superiores ( $P < 0,05$ ) às do terceiro dia ( $66,3\% \pm 6,2$  e  $58,8\% \pm 6,5$ ), mas não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da interação do tempo de armazenamento com os machos ou com a BSA.

Considerando o conjunto dos resultados, o macho 3 é o de menor fertilidade pois seu PEL foi inferior ao dos demais machos, nas 72 horas de armazenamento do sêmen (Tabela 1); apresentou 40,0% e 60,0% dos seus PELs distribuídos, respectivamente, nos QI e QIM, sem nenhum valor de PEL no QS (Tabela 2), e apresentou percentual inferior a 70,0% (67,7%) das suas inseminações com TC percentes ao quartil superior (Tabela 3). No entanto, tais constatações devem ser consideradas com precaução, pois a validade do uso deste teste, como preditor de fertilidade na espécie suína, necessita de confirmação em estudos conduzidos com maior número de machos.

### Conclusões

1. A inclusão da albumina sérica bovina e o aumento da concentração espermática aumentam o percentual de espermatozóides suínos ligados ao substrato sintético do teste SBA.

2. Há diferenças entre machos na capacidade de ligação de seus espermatozóides ao substrato sintético do teste SBA, a partir de 24 horas de armazenamento do sêmen a 17°C.

### Agradecimentos

À BioPore Inc. pelo fornecimento das placas do teste SBA (Sperm-Binding Assay).

### Referências

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; SHABANOWITZ, R. B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases to binding to an egg-membrane substrate. **Journal of Andrology**, Champaign, v. 20, n. 1, p. 34-41, 1999a.

AMANN, R. P.; SEIDEL JUNIOR, G. E.; BRINK, Z. A. Exposure of thawed frozen bull sperm to a synthetic peptide before artificial insemination increases fertility. **Journal of Andrology**, Champaign, v. 20, n. 1, p. 42-46, 1999b.

AMANN, R. P.; SHABANOWITZ, R. B.; HUSZAR, G.; BRODER, S. J. Increased *in vitro* binding of fresh and frozen-thawed human sperm exposed to a synthetic peptide. **Journal of Andrology**, Champaign, v. 20, n. 5, p. 655-660, Sept. 1999c.

AMANN, R. P.; SHABANOWITZ, R. B.; HUSZAR, G.; BRODER, S. J. *In vitro* sperm binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. **Journal of Andrology**, Champaign, v. 20, n. 5, p. 648-654, Sept. 1999d.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, p. 686-699, 1998.

COLENBRANDER, B.; KEMP, B. Factors influencing semen quality in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, v. 40, p. 105-115, 1991. Supplement.

FAZELLI, A. R.; HOLT, C.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; HOLT, W. V.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, p. 17-27, 1995.

FERREIRA, F. M. **Functional aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay**. 1998. 77 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha, 1998.

FLOWERS, W. L. Semen evaluation, extension, packaging and transport methods. In: ANUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. **Proceedings...** Nashville: American Association of Swine Practitioners, 1996. p. 469-479.

GADEA, J.; MATÁS, C.; LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 56, p. 95-108, 1998.

GILL, S. P. S.; DONOGHUE, A. M.; AMANN, R. P. Exposure of turkey sperm to a synthetic peptide before insemination increases fertility. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 426-429, 1999a.

GILL, S. P. S.; DONOGHUE, A. M.; HOLSBERGER, D. R.; AMANN, R. P.; HULET, R. M. Identifying potentially subfertile toms via a sperm-binding assay. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, p. 1208-1218, 1999b.

- IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 397-410, 1993.
- MARTINEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 547-557, 1993.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). **SAS/STAT user's guide**: version 8. Cary, 1999. 1464 p.
- SUGIE, T.; SEIDEL JUNIOR, G. E.; HAFEZ, E. S. E. Transferência de embriões. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982. p. 659-688.
- TARDIF, S.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILEY, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 447-459, 1999.
- VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; MATAS, C.; BLANCO, O. The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 33, p. 267-270, 1998.
- VISCONTI, P. E.; WESTBROOK, V. A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A. B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 53, p. 133-150, 2002.
- WEITZE, K. F. Long-term storage of extended boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 1, p. 231-253, 1991. Supplement.
- WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 1, p. 145-164, 1991. Supplement.
- XU, X.; FOXCROFT, G. R. IVM/IVF technology for assessment of semen quality and boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 31, p. 31-36, 1996.
- XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTO, W.; FOXCROFT, G. R. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 3079-3089, 1998.
- XU, X.; SETH, P. C.; HARBISON, D. S.; CHEUNG, A. P.; FOXCROFT, G. R. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig and IVF systems. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, p. 1325-1337, 1996.
- YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, v. 38, p. 27-33, 1989. Supplement.