

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE MACHOS SUÍNOS: SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO E  
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA A UM SUBSTRATO SINTÉTICO**

**GORETI RANINCHESKI DOS REIS**

**PORTO ALEGRE**

2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE MACHOS SUÍNOS: SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO E  
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA A UM SUBSTRATO SINTÉTICO**

**GORETI RANINCHESKI DOS REIS<sup>1</sup>**

Tese apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias

**Orientador:** Prof. Dr. Ivo Wentz

---

<sup>1</sup>Mestre em Medicina Veterinária

**PORTO ALEGRE**

2002

Goreti Ranincheski dos Reis

**AVALIAÇÃO DE MACHOS SUÍNOS: SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO E  
CAPACIDADE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA A UM SUBSTRATO SINTÉTICO**

Aprovada em 26 de MARÇO de 2002

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Ivo Wentz

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Fabiane Mendonça Ferreira, UNICRUZ

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Ilmo Wentz, UFSM

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Rui Fernando Félix Lopes, UFRGS

Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais, Ocirio e Julieta, e à minha família pelo amor, apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha formação profissional e pessoal.

Ao Professor Ivo Wentz pela orientação e pelas oportunidades de aprendizado que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Professora Mari Lourdes Bernardi pela coorientação, amizade e companherismo.

Ao Professor Fernando Pandolfo Bortolozzo pela coorientação, colaboração e sugestões.

Aos amigos e colegas do Setor de Suínos da FAVET/UFRGS, especialmente à Anamaria, ao Carlos, ao Cleandro, à Djane, ao Eduardo, à Fabiane, ao Giancarlo, à Lia, ao Marchetti, à Pati Ohata, ao Pozzobon, ao Razia, ao Schneider, pela amizade e pelo carinho recebidos durante a nossa convivência.

Em especial, ao amigo de todas as horas Cezar Dobler Castagna que compartilhou com cumplicidade não apenas os momentos alegres, mas também todas as dificuldades, enfrentadas e superadas, nos últimos quatro anos.

Aos estagiários, bolsistas e futuros colegas pelo carinho e alegre convivência. Em especial à Patrícia Schwarz e ao Luís Eduardo pelo carinho, amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Carmen, à Andréa, à Vera e à Simone.

Aos amigos e colegas do Instituto de Reprodução da Escola Superior de Veterinária de Hannover, especialmente ao Professor Karl Fritz Weitze, à Professora Dagmar Waberski, à Claudia, à Jana, à Inis, à Meike, ao Franke, ao Manfred, ao Dietmar, à Petra, à Inga pela hospitalidade, amizade, apoio e auxílio durante a minha estada na Alemanha.

Ao Programa PROBRAL (CAPES/DAAD) pela oportunidade de intercâmbio com o Instituto de Reprodução da Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, onde foi realizada parte deste trabalho.

À Perdigão Agroindustrial S/A pela oportunidade de execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

### **Avaliação de Machos Suínos: Sensibilidade ao Resfriamento e Capacidade de Ligação Espermática a um Substrato Sintético**

Autor: Goreti Ranincheski dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Ivo Wentz

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mari Lourdes Bernardi

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo

O presente trabalho constou de três estudos. No primeiro estudo, cinco ejaculados de 30 machos foram analisados conforme a manutenção da MOT a 17°C, sendo classificados em três tipos: MOT <60% nas 72h (EI); MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h (EII) e MOT ≥60% nas 144h (EIII). Doze machos foram selecionados e distribuídos em três grupos: MAIOR, MÉDIA e MENOR sensibilidade espermática ao resfriamento. Em seguida, foram coletados cinco ejaculados de cada macho, sendo a MOT avaliada a cada 24h, e a integridade da membrana espermática (IM) e de acrossomas normais (NAR) nas 24, 72, 120 e 168h. Machos menos sensíveis ao resfriamento apresentaram menor variação na MOT do período pré- para o pós-seleção. Diferenças entre os machos foram observadas desde as 24 até 168h para MOT, nas 120 e 168h para MI e nas 72 e 168h para NAR. A MOT foi mais afetada que MI e NAR durante o armazenamento do sêmen *in vitro*. No estudo 2 foi avaliada a possibilidade de reverter a sensibilidade espermática ao resfriamento pela troca de plasma seminal (PS) entre machos com diferente manutenção da MOT a 17°C. Foram utilizados ejaculados de cinco cachos selecionados e classificados como: menor (MES) e maior sensibilidade ao resfriamento (MAS). Foram utilizados seis tratamentos, com cinco repetições cada. Nos tratamentos T1 e T3, o sêmen dos machos MES e MAS, respectivamente, foram processados de acordo com o protocolo convencional. Foi efetuada centrifugação (800g por 10 min) e adição do PS (10mL) homólogo para os espermatozóides MES e MAS, respectivamente, nos T2 e T4. Após a centrifugação, foi realizada a troca do PS, sendo que espermatozóides dos machos MES foram expostos ao PS dos machos MAS (T5) e o PS dos machos MES foi adicionado aos espermatozóides dos machos MAS (T6). A MOT foi avaliada a cada 24h, durante sete dias de conservação. NAR e de IM foram avaliados nas 24, 72, 120 e 168h. Diferenças na MOT, entre os machos MES (T1) e MAS (T3), foram observadas após armazenamento de 48h. Não foram observadas alterações em MOT e IM, quando foi efetuada a troca de PS entre os machos MES e MAS. Não foi possível reverter a maior sensibilidade ao resfriamento de espermatozóides suínos, após a ejaculação, com a adição de 10% do PS de machos com sêmen de menor sensibilidade. No terceiro estudo, foi avaliada a fertilidade de sêmen suíno pelo teste de ligação de espermatozóides a um substrato sintético. A MOT e o percentual de espermatozóides ligados (PEL) foram avaliados nas 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. Houve correlação positiva ( $r=0,33$ ) entre a MOT e o PEL. Os machos diferem quanto à capacidade de ligação de seus espermatozóides ao substrato sintético, a partir de 24 horas de armazenamento do sêmen. Maior percentual de espermatozóides ligados ao substrato sintético é verificado com a inclusão de BSA e com o aumento da concentração espermática.

**Palavras-chave:** espermatozóide, ligação espermatozóide-oócito, motilidade, plasma seminal, resfriamento, sêmen, suíno

## ABSTRACT

### *Evaluation of Boars: Chilling Sensitivity and Sperm Binding Ability to a Synthetic Substrate*

*Author: Goreti Ranincheski dos Reis*

*Advisor: Prof. Dr. Ivo Wentz*

*Co-Advisor: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Mari Lourdes Bernardi*

*Co-Advisor: Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo*

*This thesis was composed by three studies. In the first study was evaluated if twelve boars selected according to the maintenance of sperm motility (MOT), at 17°C, showed the same pattern on subsequent collections and to evaluate the behaviour of normal acrosomes (NAR) and plasma membrane integrity (MI) during storage. Five ejaculates from 30 boars were evaluated according to the time of maintenance of MOT at 17°C, and they were classified in three types: MOT <60% at 72h (EI); MOT ≥60% at 72h and <60% at 144h (EII) and MOT ≥60% at 144h (EIII). Twelve boars were selected and classified, in three groups: HIGH, INTERMEDIATE and LOW chilling sensitivity. After this, five ejaculates from each boar were collected and MOT was evaluated each 24h, the plasma membrane integrity (MI) and the normal acrosomes (NAR) at 24, 72, 120 and 168h of storage. Males less sensitive to cooling showed a lower variation of MOT, between pre- and post-selection periods. Differences among males for MOT were observed from 24 up to 168h, at 120 and 168h for MI and at 72 and 168h for NAR. MOT was more affected than MI and NAR during in vitro storage of swine semen. In the second study was evaluated the possibility of reverting the chilling sensitivity by the exchange of seminal plasma between boars with different maintenance of motility (MOT) at 17°C. Five boars were selected and classified in: low (MES) and high (MAS) chilling sensitivity. Six treatments, with five replications each one, were utilized. In T1 and T3, semen from boars MES and MAS, respectively, were processed according to the conventional protocol. Centrifugation (800 g for 10 min) was performed and homologous PS (10mL) was added to sperm MES and MAS, respectively, in T2 and T4. After centrifugation, sperm from boars MES was exposed to PS from boars MAS (T5) and the PS of boars MES was added to sperm of boars MAS (T6). Sperm motility was evaluated each 24h during seven days of conservation. NAR and IM were evaluated at 24, 72, 120 and 168h. Differences in MOT, between boars MES (T1) and MAS (T3), were observed after 48h of storage. No alterations in MOT and IM were observed when PS was changed between MES and MAS boars. It was not possible to reverse the higher chilling sensitivity of ejaculated swine sperm, with the addition of seminal plasma of more resistant boars. In the third study, it was evaluated the boar semen fertility by a sperm-binding assay to a synthetic substrate. Motility (MOT) and percentage of bound sperm (PSB) were evaluated at 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. There was a positive correlation ( $r=0.33$ ) between MOT and PSB. 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.*

**Key-words:** *chilling, motility, semen, seminal plasma, spermatozoa, sperm-egg binding, swine*

## LISTA DE TABELAS

### ESTUDO 1

TABELA 1 - Distribuição dos 30 machos avaliados na pré-seleção de acordo com o número de ejaculados de cada tipo .....	43
TABELA 2 - Número de ejaculados de cada tipo observados nos 12 machos selecionados .....	44
TABELA 3 - Coeficientes de variação da motilidade (MOT), membranas íntegras (MI) e acrossomas normais (NAR) no terceiro e sétimo dia de armazenamento do sêmen de machos suínos selecionados de acordo com a manutenção da motilidade <i>in vitro</i> .....	45
TABELA 4 - Percentuais de motilidade do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média $\pm$ desvio-padrão) .....	46
TABELA 5 - Percentuais de membranas espermáticas íntegras do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média $\pm$ desvio-padrão) .....	47
TABELA 6 - Percentuais de acrossomas normais do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média $\pm$ desvio-padrão) .....	48
TABELA 7 - Correlação entre motilidade, acrossomas normais (NAR) e integridade de membrana (MI) de sêmen suíno resfriado a 17°C, nos diversos momentos de avaliação .....	49

### ESTUDO 2

TABELA 1 - Motilidade (MOT) e integridade de membrana (IM) de espermatozóides (sptz) de machos suínos menos (MES) ou mais (MAS) sensíveis ao resfriamento a 17°C, na presença de plasma seminal (PS) homólogo ou heterólogo (média $\pm$ desvio-padrão) .....	62
---	----

### **ESTUDO 3**

- TABELA 1 - Percentuais de espermatozóides suínos (média  $\pm$  erro-padrão) ligados ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay) em diferentes momentos de avaliação das doses de sêmen resfriado .... 76
- TABELA 2 - Distribuição dos ejaculados de machos suínos conforme os percentuais de espermatozóides ligados ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay) situados nos quartis inferior (QI), intermediários (QIM) e superior (QS), 5 horas após a diluição do sêmen ..... 77
- 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 . 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

± - mais ou menos

μL – microlitro

% - percentagem

BSA – albumina sérica bovina

BTS – diluente Beltsville Thawing Solution

CFDA – diacetato de carboxifluoresceína

CIA – Central de inseminação artificial

DS – dose de sêmen

EI – ejaculados com motilidade espermática <60% nas 72h, após diluição e armazenamento a 17°C

EII - ejaculados com motilidade espermática ≥60% nas 72h e <60% nas 144h, após diluição e armazenamento a 17°C

EIII - ejaculados com motilidade espermática ≥60% nas 144h, após diluição e armazenamento a 17°C

EL – espermatozóides ligados

g – força centrífuga relativa

h – horas

IA – inseminação artificial

IM – integridade de membrana espermática

kDa – Kilodalton

mg - miligrama

mL – mililitro

MAIOR – machos com no mínimo 4/5 ejaculados com motilidade espermática <60% nas 72h

MAS – machos com motilidade espermática <60% nas 72h, após diluição e armazenamento a 17°C

MÉDIA – machos com no mínimo 4/5 ejaculados com motilidade espermática ≥60% nas 72h e <60% nas 144h

MENOR - machos com no mínimo 4/5 ejaculados com motilidade espermática ≥60% nas 144h

MES – machos com motilidade espermática  $\geq 60\%$  nas 144h, após diluição e armazenamento a 17°C

min - minutos

MOT – motilidade espermática

MI – membranas espermáticas íntegras

NAR – acrossomas com borda apical normal

°C – graus Celsius

PEL – perceptual de espermatozoides ligados

PI – iodeto de propídio

QI – quartil inferior

QIM – quartis intermediários

QS – quartil superior

SBA – teste de ligação espermática a um substrato sintético

T – tratamento

TC – taxas de clivagem

TENC – taxas de embriões clivados

TENR – taxas de estruturas recuperadas

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 VARIAÇÃO NA SENSIBILIDADE DO ESPERMATOZÓIDE SUÍNO AO RESFRIAMENTO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 O PLASMA SEMINAL E A FUNÇÃO ESPERMÁTICA EM SUÍNOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 AVALIAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO PELO TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES A UM SUBSTRATO SINTÉTICO .....</b>	<b>25</b>
<b>3 ESTUDO 1 – DIFERENÇAS ENTRE MACHOS SUÍNOS NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA A 17°C</b>	
RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	32
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS .....	39
<b>4 ESTUDO 2 – VIABILIDADE ESPERMÁTICA APÓS A TROCA DE PLASMA SEMINAL ENTRE MACHOS SUÍNOS COM DIFERENTE SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO</b>	
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	52
INTRODUÇÃO .....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
CONCLUSÕES .....	59

	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>ESTUDO 3 – FERTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO AVALIADA PELO TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES A UM SUBSTRATO SINTÉTICO</b>	
	<b>RESUMO .....</b>	<b>64</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>65</b>
	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>65</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentro de um sistema suinícola, o macho suíno tem diversas funções importantes tais como estimular a antecipação da puberdade em leitões (HUGHES, 1982), diminuir o intervalo desmame-estro (HEMSWORTH E BARNETT, 1990) e auxiliar na detecção do estro (BORTOLOZZO e WENTZ, 1998). No entanto, o principal papel do cachaço é o seu uso para o acasalamento das fêmeas.

A capacidade reprodutiva do cachaço, caracterizada por uma maior produção de leitões nascidos e desmamados por fêmea/ano, é um fator essencial no retorno econômico numa criação de suínos (WENTZ et al., 1998), uma vez que um número pequeno de machos é responsável pela prenhez de um grande número de fêmeas. Com o emprego da inseminação artificial (IA), a importância do cachaço é reforçada, pois apesar da redução no número de machos, cada macho será utilizado sobre um número maior de fêmeas, potencializando a necessidade de doadores de sêmen em quantidade e qualidade adequadas. Assim, a avaliação da capacidade reprodutiva e a qualidade do sêmen são importantes para prevenir a redução na eficiência reprodutiva de rebanhos suínos (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000).

Os métodos *in vitro* comumente utilizados (motilidade e morfologia espermática) nas centrais de inseminação artificial, para avaliação da qualidade seminal, permitem descartar machos inférteis, pelos baixos valores em um destes parâmetros (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993; VAZQUEZ et al., 1998). Porém, esses testes não permitem determinar o grau de fertilidade dos machos que apresentam parâmetros seminais considerados normais (WOELDERS, 1991; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000).

Tentativas vêm sendo realizadas no sentido de desenvolver um teste *in vitro* que seja capaz de prever com exatidão a fertilidade do macho. Testes que avaliam a interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida (ZP) têm sido utilizados e considerados como promissores na predição da fertilidade. Um novo teste, denominado SBA (Sperm Binding-Assay), foi desenvolvido, baseado na capacidade de ligação da célula espermática à ZP, utilizando um substrato sintético similar à mesma, mimetizando *in vitro* a interação entre o gameta masculino e o feminino (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998). O maior número de estudos com este teste tem sido efetuado em galos (BARBATO,

CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998) e perus (GILL et al., 1999), embora tenha também sido empregado nas espécies humana (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999; AMANN et al., 1999ab), bovina (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999; AMANN, SEIDEL e BRINK, 1999) e suína (AMANN, Hammerstedt e Shabanowitz, 1999). Na espécie suína, no entanto, o mesmo não foi empregado para diferenciar machos conforme o potencial de fertilidade.

Devido ao grande número de inseminações efetuadas com sêmen resfriado, na espécie suína, além de conhecer o potencial de fertilidade do cachaço seria importante identificar os doadores com diferente sensibilidade espermática ao resfriamento, bem como determinar se esta variabilidade é decorrente ou não de um efeito do plasma seminal. Esta identificação permitiria o descarte dos cachaços com maior sensibilidade ao resfriamento e o uso estratégico daqueles com longa manutenção da motilidade espermática.

Devido ao grande número de inseminações efetuadas com sêmen resfriado, na espécie suína, além de conhecer o potencial de fertilidade do cachaço seria importante identificar os doadores com diferente sensibilidade espermática ao resfriamento. Doses de sêmen de doadores, com longa manutenção da motilidade espermática *in vitro* poderiam ser utilizados estrategicamente em momentos que requerem o armazenamento por períodos superiores a 48h (BORTOLOZZO e WENTZ, 1997). Da mesma forma, esta identificação permitiria o descarte dos cachaços com maior sensibilidade ao resfriamento.

Pelo fato de efeitos benéficos do plasma seminal já terem sido verificados no aumento da resistência do espermatozóide suíno aos danos do choque térmico (PURSEL, JOHNSON e SCHULMAN, 1973; BERGER e CLEGG, 1985) e na melhora da motilidade (MAXWELL, WELCH e JOHNSON, 1997; GUTHRIE, MAXWELL e JOHNSON, 2000), seria também importante determinar um possível envolvimento de componentes seminais na variabilidade entre cachaços na sensibilidade espermática ao resfriamento.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos:

- verificar se cachaços selecionados conforme o tempo de manutenção da motilidade espermática a 17°C mantêm este padrão da motilidade e se a integridade da membrana espermática e de acrossoma seguem o mesmo comportamento da motilidade, ao longo do período de armazenamento *in vitro*;

- avaliar a possibilidade de ocorrência de um efeito do plasma seminal na sensibilidade espermática ao resfriamento, a partir da troca cruzada entre cachacos com diferente manutenção da motilidade espermática a 17°C e
- averiguar se a concentração espermática e a presença de albumina sérica bovina afetam o percentual de espermatozóides ligados ao substrato sintético do teste SBA (Sperm-Binding Assay).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Variação na sensibilidade do espermatozóide suíno ao resfriamento

O resfriamento do sêmen auxilia na preservação das células espermáticas em decorrência da desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND et al., 1994). No entanto, o espermatozóide suíno é particularmente sensível ao resfriamento e pouco resistente a baixas temperaturas (DE LEEUW et al., 1991), sendo comum a redução da viabilidade espermática, mais acentuada quando são usadas temperaturas inferiores a 15°C. Por este motivo, o sêmen usado para a inseminação artificial é, em geral, diluído e armazenado a uma temperatura de 15 a 18°C (GLOSSOP, 1996).

A sensibilidade do espermatozóide a baixas temperaturas tem sido caracterizada por alterações no acrossoma, ruptura da membrana plasmática e danos mitocondriais, conduzindo à perda da permeabilidade seletiva da membrana, diminuição da atividade respiratória e da glicólise, e conseqüente diminuição da viabilidade espermática (DE LEEUW et al., 1991).

Diferenças na sensibilidade do sêmen ao congelamento entre cachaaos é um fato conhecido (LARSSON e EINARSSON, 1976; MARIANO, 1988; ROCA et al., 2000; OHATA, 2001). Da mesma forma, há variações na sensibilidade ao processo de resfriamento do sêmen entre machos suínos. Benson et al. (1967) utilizaram 10 ejaculados para cada um dos 10 machos analisados, com o objetivo de avaliar o efeito da incubação (5h a 38°C) e do choque térmico sobre a motilidade espermática. Os autores constataram que a variação média na motilidade entre os ejaculados dentro dos machos foi menor (11%) que a variação entre os machos (27%), sendo que seis machos tinham ejaculados com alta motilidade espermática e pequena variação, enquanto três machos apresentaram sêmen de motilidade moderada, mas grande variação entre os ejaculados.

Ao avaliar as características biológicas e bioquímicas do sêmen, durante a preservação *in vitro*, Mariano (1988) encontrou cachaaos com maior e menor sensibilidade espermática ao resfriamento (respectivamente, >50% e <50% de motilidade espermática após 48h a 15°C).

Waberski et al. (1991) investigaram o efeito da qualidade do sêmen de dez cachaaos, durante o armazenamento a 17°C por três a cinco dias, sobre os resultados de fertilidade. Considerando apenas os cinco machos que não apresentavam elevados

percentuais de espermatozoides com problemas de morfologia, dois apresentaram motilidade espermática menor ou igual a 60%, no quinto dia de armazenamento. Quando o sêmen desses machos foi utilizado na IA, após cinco dias de armazenamento, a fertilidade foi inferior à dos demais machos, além de apresentarem decréscimos de 10% e 20% entre o terceiro e quinto dia de armazenamento. Os outros três machos não apresentaram decréscimo na fertilidade ou tiveram uma redução máxima de 6%, entre o terceiro e quinto dia de armazenamento. Segundo os autores, a redução na fertilidade *in vivo*, entre o terceiro e quinto dia de armazenamento, parece estar relacionada à magnitude da queda dos índices de motilidade espermática ao longo do armazenamento.

Ao estudar o efeito do tempo de armazenamento (0, 24, 48, 72 e 96h), em diferentes temperaturas (25, 20, 15 ou 10°C), sobre a qualidade do sêmen de 16 cachorros, Paulenz, Kommisrud e Hofmo (2000) relataram uma variabilidade entre machos na sensibilidade ao resfriamento. Foi verificada, pelos autores, a presença de cachorros com menores e maiores reduções na motilidade espermática (6,6 versus 66,2%) e integridade de acrossoma (13 versus 43%) de zero até 96h de armazenamento a 10°C.

A razão pela qual machos suínos apresentam diferenças na longevidade espermática *in vitro* ainda não está esclarecida. A longevidade, segundo Colenbrander et al. (2000), é uma qualidade do sêmen que difere entre os ejaculados, podendo também ser uma particularidade do macho. Tem sido citado o possível envolvimento de componentes do plasma seminal (PS), bem como de componentes da própria célula espermática afetando a longevidade do sêmen (GADELLA et al., 1993).

Apesar da constatação da diferença entre machos, em termos de longevidade espermática durante o resfriamento, para Colenbrander et al. (2000), poucos esforços têm sido feitos para investigar as possíveis causas dessa variabilidade.

Um dos aspectos que tem sido investigado é a composição lipídica do sêmen. Cerolini et al. (2000b), ao estudarem as alterações na viabilidade, susceptibilidade à peroxidação e a composição dos ácidos graxos da fração fosfolipídica do espermatozoide suíno, durante o resfriamento, constataram uma diminuição dos principais ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (PUFAs), particularmente do 22:6n-3 (ácido docosahexanóico), em detrimento de um aumento da concentração dos saturados, ao longo de cinco dias de armazenamento a 19°C. Ainda não foi evidenciado se essas modificações

ocorrem de modo desigual para os diferentes machos, mas Cerolini et al. (2000a) observaram que a redução, em particular do ácido docosahexanóico, foi maior (-41% vs. -31 e -26%) no grupos de cachacos cujas amostras de sêmen apresentaram menor motilidade espermática (28% vs. 42 e 45%), após o descongelamento.

Considerando a existência de variabilidade na sensibilidade do sêmen ao resfriamento e ao congelamento de diferentes cachacos, alguns estudos foram efetuados para investigar a possível correlação entre esses dois aspectos. Poderia ser importante, em termos práticos, se fosse possível selecionar machos com alta resistência ao congelamento, através de sua menor sensibilidade ao resfriamento, ou vice-versa. Mariano (1988) constatou que o grupo de cachacos com uma maior resistência ao resfriamento (>50% de motilidade espermática após 48h a 15°C) também mostraram maiores valores percentuais de motilidade e de acrossoma intacto, embora alguns desses machos apresentaram valores inferiores a 30% de motilidade e 50% de acrossoma intacto, após o descongelamento. Ohata (2001) investigou se machos considerados como de Longa ( $\geq 60\%$  de motilidade espermática nas 168h) ou Curta (<60% de motilidade espermática nas 48h) manutenção da viabilidade durante o resfriamento a 15°C apresentavam diferenças na resposta ao congelamento. Os doadores de Longa manutenção da motilidade espermática apresentaram um percentual de acrossomas normais, após descongelamento, superior (68,9%) aos de Curta (61,7%). No entanto, não foi observada diferença, entre os dois grupos de machos, na motilidade espermática após descongelamento. É importante salientar que dentro do grupo previamente considerado de Curta houve uma variação na motilidade espermática (46-55%) semelhante ao que ocorreu no grupo Longa (46-59%), indicando que alguns machos previamente selecionados como sendo de alta ou baixa sensibilidade ao resfriamento não apresentaram um comportamento similar, quando submetidos ao congelamento. Dessa forma, parece que a seleção de doadores para o resfriamento não pode basear-se na sensibilidade ao congelamento e vice-versa, sendo necessários estudos investigando a sensibilidade específica a cada um destes procedimentos de conservação do sêmen.

## **2.2 O plasma seminal e a função espermática em suínos**

Resultados contraditórios têm sido relatados no que se refere à influência do plasma seminal sobre as funções da célula espermática.

Alguns estudos têm mostrado a presença de um fator inibidor da motilidade espermática no PS de suínos. Esse fator, já purificado e parcialmente caracterizado (IWAMOTO et al., 1992; STRZEZEK et al., 1992), é um peptídeo, componente de um complexo glicoprotéico, provavelmente pertencente à família das espermadesinas, que causa a inibição da motilidade, e induz mudanças na organização molecular da membrana, reduzindo a susceptibilidade do espermatozóide aos danos da peroxidação lipídica (KORDAN et al., 1998).

Por outro lado, tem sido demonstrado que a exposição de espermatozóides suínos ao PS possibilita uma melhora na sua motilidade. Guthrie, Maxwell e Johnson (2000) verificaram que, em razão da melhora observada na motilidade, na viabilidade e na integridade acrossomal de espermatozóides submetidos a baixas ou altas diluições, durante o processo de congelamento, na presença do PS, o mesmo poderia ser usado como um aditivo no diluente de descongelamento. Da mesma forma, uma melhora na motilidade espermática foi verificada com a adição de 10% de PS ao diluente de espermatozóides sexados (MAXWELL, WELCH e JOHNSON, 1997).

Estudos de Moore e Hibbitt (1977) mostraram apenas um pequeno efeito do PS sobre a motilidade espermática e susceptibilidade espermática ao choque térmico, embora outros autores tenham observado um efeito benéfico do PS no aumento na resistência de espermatozóides suínos aos danos causados pelo choque térmico. Ao realizar uma incubação prévia de espermatozóides suínos epididimários, com o PS, Berger e Clegg (1985) observaram um aumento de 60 a 80% na resistência seminal ao choque térmico. Butler e Roberts (1975) verificaram que, após a ejaculação, os espermatozóides são extremamente sensíveis ao choque térmico. Porém, segundo Graham (1994), a contribuição do PS sobre esta mudança da resistência espermática, por ocasião da ejaculação, ainda não é conhecida. Ao estudarem este fato, alguns pesquisadores (PURSEL, JOHNSON e RAMPACEK, 1972; PURSEL, JOHNSON e SCHULMAN, 1972) verificaram que espermatozóides suínos adquirem resistência ao choque térmico quando incubados *in vitro* a 30°C, mesmo na ausência do plasma seminal. No entanto, o mecanismo que induz esta resistência ainda não é conhecido, mas segundo Pursel, Johnson e Schulman (1973), isto ocorre devido a uma propriedade inerente da célula, embora a adição de PS possibilite uma proteção adicional contra o choque térmico. Já para Tamuli e Watson (1992), o

desenvolvimento da resistência das células espermáticas ao choque térmico não depende da presença do PS.

Embora espermatozóides ejaculados sejam mais sensíveis ao processo de congelamento que os epididimários (BERGER e CLEGG, 1985; RATH e NIEMANN, 1997), ainda não está comprovado se essa sensibilidade está relacionada exclusivamente ao contato com o PS (RATH e NIEMANN, 1997). Da mesma forma, dúvidas ainda existem quanto à necessidade de remoção ou não do PS antes de realizar o congelamento do sêmen. Para Salamon (1973), a retirada do PS não levou a alterações na qualidade espermática após o descongelamento. Da mesma forma, Fazano (1986) não observou efeitos prejudiciais sobre a célula espermática, na ausência ou não do PS.

No entanto, apesar dessas observações, há evidências de que o resfriamento e o congelamento/descongelamento, entre outros processos, alteram a função da célula espermática, e que alguns desses efeitos podem estar associados com a remoção do PS (MAXWELL e JOHNSON, 1999). Proteínas específicas do PS, de origem epididimária ou das glândulas anexas, segundo Rodríguez-Martínez e Eriksson (2000), têm capacidade de inibir a desestabilização da membrana espermática, que ocorre, por exemplo, durante a criopreservação (WATSON e GREEN, 2000) ou a capacitação (MAXWELL et al., 1998). Assim, a desestabilização ocorreria como uma consequência da remoção de uma parte das proteínas seminais, as quais se associam periféricamente à membrana do espermatozóide (CALVETE et al., 1997; MAXWELL e JOHNSON, 1999).

Consideráveis esforços vêm sendo aplicados no estudo dos componentes do PS, especialmente as proteínas, e sua correlação com a fertilidade *in vivo*.

Diferenças protéicas foram detectadas por Killian, Chapman e Rogowski (1993), entre o PS de touros de alta e baixa fertilidade. Estes pesquisadores demonstraram a presença de quatro proteínas no PS bovino, as quais possuem alta correlação ( $r= 0,89$ ) com a fertilidade.

Em suínos, Flowers (1997) efetuou inseminações, utilizando a mistura da fração rica em espermatozóides e do PS do macho dominante (progenitor da maioria dos leitões) com as frações e o PS de outros machos não dominantes, com o objetivo de verificar se a dominância estava relacionada ao espermatozóide ou ao PS. Para o autor, a maior sobrevivência espermática, no trato reprodutivo da fêmea, dos espermatozóides do macho dominante é explicada pelo PS, provavelmente pela sua composição, uma vez que o número de leitões

oriundos com o uso do macho não dominante foi maior, quando seus espermatozóides foram misturados com o PS de um macho dominante. Estudos posteriores mostraram a existência de correlação entre a concentração de duas proteínas do PS e os maiores percentuais de penetração *in vitro* de oócitos e a paternidade das leitegadas, obtida após a realização de inseminações heterospérmicas (FLOWERS, 1998).

Pelo fato de proteínas do PS serem consideradas capazes de influenciar a capacidade de fecundação da célula espermática suína (FLOWERS, 1997/98), tem sido sugerido que algumas delas poderiam atuar como preditoras da fertilidade do macho (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000). Entre essas proteínas seminais podem ser citadas as espermadesinas, proteínas de baixo peso molecular (TÖPFER-PETERSEN e CALVETE, 1996) que, após serem secretadas pelas vesículas seminais, se aderem ao espermatozóide, por ocasião da ejaculação, e o acompanham *in vitro* (SANZ et al., 1993) e *in vivo* (CALVETE et al., 1997), até o oócito (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998), tendo um papel importante no reconhecimento espermatozóide-zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN et al., 2000; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000).

Diversos estudos *in vitro*, em diferentes espécies, têm sido realizados para analisar a ocorrência ou não de efeito do PS homólogo ou heterólogo sobre algumas funções da célula espermática. Em processos de criopreservação do sêmen suíno, Sandoval et al. (1991) investigaram um possível efeito de proteção do PS de machos de “boa congelabilidade” nas células espermáticas de machos de “má congelabilidade”. Grupos de ejaculados de machos previamente selecionados como de boa ou de má congelabilidade, de acordo com os resultados pós-descongelamento, foram centrifugados e resuspendidos no próprio PS (homólogos) e no PS do grupo oposto (heterólogos). Metade de cada grupo foi submetido ao choque térmico após 0, 60 e 120 minutos de incubação a 38°C; a outra metade foi congelada em macrotubos. A motilidade espermática e a morfologia de acrossoma antes e após o choque térmico, e após descongelamento, foram avaliadas. A origem do plasma seminal não afetou a susceptibilidade do espermatozóide ao choque térmico, bem como não foram alteradas as características pós-descongelamento do sêmen. Contudo, a incubação antes do choque térmico aumentou a resistência dos espermatozóides aos danos ocorridos devido ao congelamento, independente da origem do plasma seminal, sendo este efeito mais visível nas células espermáticas dos machos de “má congelabilidade”. Em eqüinos,

Aurich et al. (1996) observaram que a adição de 30% de PS, de machos com alta motilidade espermática pós-descongelamento, aos ejaculados de machos com baixa motilidade pós-descongelamento aumentou significativamente a motilidade de 24,0 para 34,5%, e a integridade de membrana de 27,0 para 34,3%. Ao contrário, o acréscimo de PS de machos com baixa motilidade espermática pós-descongelamento ao sêmen de machos com alta motilidade pós-descongelamento reduziu significativamente a motilidade de 36,0 para 30,0%, mas não afetou a integridade de membrana. Para os autores, a composição individual do PS afeta a resistência dos machos eqüinos à criopreservação do sêmen, embora os fatores seminais responsáveis ainda não sejam conhecidos. Na espécie bovina, Henault et al. (1995) conduziram experimentos com o modelo de produção *in vitro* de embriões e verificaram que adicionando a espermatozoides epididimários de touros de baixa fertilidade, PS de touros de alta fertilidade, a taxa de penetração *in vitro* de oócitos do primeiro grupo foi melhorada significativamente, de forma a se igualar às taxas do grupo de alta fertilidade. Por outro lado, não foi verificada, por Henault e Killian (1996), uma melhora na capacidade de fecundação de espermatozoides ejaculados de touros de baixa fertilidade com a adição de PS de touros com alta fertilidade. Para estes autores, componentes do PS ligam-se fortemente à superfície espermática, por ocasião da ejaculação, sendo que os fatores inibidores da fertilidade demonstraram, aparentemente, serem de difícil remoção, por procedimentos simples de lavagem, ao serem comparados aos fatores estimulantes, presentes nos machos de alta fertilidade. Na espécie ovina, têm sido mostrado que a adsorção de proteínas do PS está envolvida na reversão e na prevenção dos danos ocorridos na membrana espermática em decorrência do choque térmico. Em um primeiro estudo, Barrios et al. (2000) demonstraram que a adsorção de proteínas seminais, particularmente de três frações (3, 6 e 7), obtidas por cromatografia de exclusão, podem reverter os danos na membrana espermática causados pelo choque térmico. Esta adsorção é um processo concentração-dependente, o qual induz a restauração da superfície da célula espermática em relação à quantidade de proteína presente no meio de incubação. Diferenças observadas na composição, entre as três frações isoladas, resultaram especialmente de uma banda principal de aproximadamente 20 kDa, a qual representa mais de 40% do total de proteínas na fração 6, sendo menos proeminente nas outras duas frações. Pelo fato da fração 6 ter mostrado a mais alta atividade, os autores sugerem que esta banda

principal deve ser a responsável pela capacidade de restauração da permeabilidade da membrana espermática. Em outro estudo com ovinos, Pérez-Pé, Cebrián-Pérez e Muiño-Balanco (2001) separaram os espermatozóides do PS, pelo procedimento dextran/swim-up, obtendo um percentual de 72% de células viáveis, determinadas pela integridade da membrana espermática (IM) à fluorescência. Espermatozóides já livres do PS foram incubados, com a presença (0,7, 1,4 ou 2,1 mg) ou não (controle) de proteínas do PS (>3 kDa), antes de serem submetidos ao choque térmico. No grupo controle, os espermatozóides foram fortemente afetados pelo choque térmico, mostrando uma redução no percentual de membranas intactas de 72,2 para 24,6%. Entretanto, com a adição das proteínas foi observado um efeito benéfico imediato na sobrevivência espermática, em todas as amostras avaliadas. Este efeito foi concentração-dependente, uma vez que o percentual de células apresentando membrana intacta aumentou significativamente com o aumento da concentração protéica, sendo já verificado imediatamente após o choque térmico (0h). Foi observada uma continuidade na proteção da membrana espermática (40,5 para 42,6%; de 0 para 1h) no meio contendo a maior concentração de proteínas (2,1 mg), após uma 1h de incubação a 20°C. No entanto, nas concentrações de 0,7 (36,5 para 33,5%) e 1,4 mg (43,3 para 34,9%) foi verificado um leve declínio. Foi também verificado neste estudo, um efeito benéfico sobre a preservação da viabilidade espermática com a inclusão de 25, 37 ou 75 µM de ácidos graxos oléico-linoléico. Houve uma interação positiva entre estes ácidos graxos e as proteínas do PS, sendo que com a adição de 25 µM de ácido oléico-linoléico, na presença de 2,1mg de proteínas, foi observado um aumento significativo de espermatozóides com membranas íntegras de 37,2 para 50,7%, em relação às amostras controle (25%), após 1h de incubação. Do mesmo modo, as proteínas do PS auxiliaram na capacidade da vitamina E em melhorar a sobrevivência da célula espermática. Um maior percentual de espermatozóides com membrana íntegra (>57%) foi observado, logo após o choque térmico (0h), na amostra contendo vitamina E (1,6 mM) e proteína (2,1 mg), quando comparado ao valor (26%) obtido na amostra controle. Para os autores, a redução funcional observada nos espermatozóides ovinos submetidos ao choque térmico, livres do PS, poderia ser prevenida pela adição de proteínas seminais, o que levaria à manutenção de elevados valores de células viáveis. No entanto, segundo os autores, os componentes do PS que são responsáveis por esses efeitos ainda devem ser identificados.

### 2.3 Avaliação de sêmen suíno pelo teste de ligação dos espermatozóides a um substrato sintético

A estimativa visual do percentual de espermatozóides móveis (COLENBRANDER e KEMP, 1991) e das alterações morfológicas (WOELDERS, 1991) são métodos simples e rápidos para a avaliação da qualidade espermática, e têm sido rotineiramente empregados nas CIAs para selecionar os ejaculados destinados à IA (JOHNSON et al., 1996). No entanto, o emprego desses testes não possibilita a identificação, a priori, do potencial de fertilidade dos cachacos (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000).

Testes que avaliam parâmetros diretamente relacionados à interação do espermatozóide com a zona pelúcida têm sido propostos como capazes de permitir uma melhor predição da fertilidade do macho suíno (WOELDERS, 1991). Entre estes testes, têm sido citados o teste de hemizona (FAZELLI et al., 1995a; FERREIRA, 1998), e os testes de penetração (IVANOVA e MOLLOVA, 1993; MARTINEZ et al., 1998) e de fecundação *in vitro* (MARTINEZ et al., 1993; XU et al., 1996b/1998).

Embora em outras espécies (FAZELLI et al., 1995b; FAZELLI et al., 1997), os resultados obtidos com o teste de hemizona mostraram uma correlação com a fertilidade *in vivo*, em suínos, Ferreira (1998) comparou os resultados do teste com os dados de fecundação competitiva *in vivo* (inseminação heterospérmica) e não observou uma significativa associação entre a capacidade de ligação e o número de fetos produzidos. Com referência ao teste de penetração *in vitro*, alguns estudos já mostraram a sua correlação significativa com a fertilidade do cachaco (IVANOVA e MOLLOVA, 1993; MARTINEZ et al., 1998; GADEA, MATÁS e LUCAS, 1998). Estudos com a fecundação *in vitro*, em suínos, mostraram que há diferenças entre machos quanto à taxa de penetração, podendo afetar os resultados da FIV (XU et al., 1996a).

Mais recentemente, um novo teste laboratorial, denominado SBA, foi desenvolvido para avaliar a capacidade de ligação do espermatozóide ao oócito. Este teste de ligação consiste da avaliação da capacidade do espermatozóide em se ligar a um substrato sintético, mimetizando a interação entre os gametas masculino e feminino, tendo o substrato uma atuação homóloga à da zona pelúcida de oócitos de mamíferos, embora o mecanismo exato desta interação ainda não seja conhecido (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1988).

O substrato sintético do teste SBA, a prosaposina ou glicoproteína-1 sulfatada (SGP-1), é uma proteína encontrada em grande quantidade no citoplasma e secreções das células de Sertoli (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999). Nas células de Sertoli, a prosaposina é sintetizada com uma forma precursora (65 a 67 kDa) e modificada para uma forma secretora (70 kDa), tendo funções provavelmente diferentes (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999). A função da prosaposina secretada nos fluidos reprodutivos masculinos vem sendo elucidada, a partir do momento em que foi demonstrado (HAMMERSTEDT, 1996; BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998) o seu envolvimento na ligação do espermatozóide à membrana perivitelina do ovo de galinha.

Inicialmente, Barbato, Cramer e Hammerstedt (1998) desenvolveram uma série de testes de ligação espermática *in vitro* para avaliar a subfertilidade em galos, utilizando a membrana perivitelina (MP) do ovo de galinha. Os primeiros dois testes utilizaram segmentos intactos da MP de ovos de galinha sobre uma lâmina ou um extrato solubilizado da membrana contido dentro de uma microplaca. A detecção dos espermatozoides ligados era efetuada por fluorescência, utilizando um corante DNA-específico, sendo a contagem dos mesmos realizada por um técnico treinado. Para o terceiro teste, foi desenvolvido um aparelho fluorométrico leitor de microplaca, utilizando o extrato da MP do ovo da galinha pré-corado, para a determinação dos espermatozoides ligados. O uso do teste permitiu a detecção de diferenças na fertilidade entre quatro populações de galos, mostrando uma alta correlação entre a ligação espermática *in vitro* e a fertilidade. Também foi observada uma baixa correlação com os outros parâmetros seminais e uma relação não linear entre os resultados do teste e a fertilidade, com a identificação dos machos com baixa ligação espermática e baixa fertilidade. Testes com outras espécies também foram efetuados, sendo observado que tanto espermatozoides de galos como de perus podiam se ligar à MP de ovos de galinhas. Ao avaliar a ligação de espermatozoides de galos e de alguns mamíferos (touro, camundongo, cavalo e homem) à MP do ovo de galinha, foi verificada a existência de uma regressão altamente significativa entre a concentração espermática e o número de espermatozoides ligados. Espermatozoides ovinos imaturos (e imóveis), oriundos da cabeça do epidídimo, mostraram uma baixa ligação, similar à verificada com os oriundos da cauda do epidídimo, após o descongelamento; espermatozoides isolados da cauda do epidídimo,

apresentando motilidade espermática superior (>70%), mostraram maior capacidade de ligação. Para os autores, o teste pode ser usado para a detecção, e conseqüente descarte de amostras seminais ou de galos que possuem sêmen aparentemente normal pelos testes tradicionais de avaliação seminal, mas que diferem na capacidade de ligação do espermatozóide à ZP, evitando, dessa forma, a realização dos onerosos testes de progênie.

Barbato, Cramer e Hammerstedt (1988) desenvolveram uma versão comercial (BioPore® - SBA) do teste de ligação, similar ao terceiro da série de testes que os autores haviam avaliado. Na versão comercial do teste SBA, espermatozóides capazes de se ligar ao substrato sintético, um extrato da MP do ovo de galinha, são quantificados. Este extrato da MP, enriquecido pela proteína de ligação, a prosaposina, é conjugado a um corante fluorescente. Após incubação a 32°C (aves) ou 37°C (homem, touro e suíno), durante 60 min, os espermatozóides que ficaram aderidos ao substrato são determinados por fluorescência, após coloração do seu DNA, sendo o valor expresso por massa de proteína ligada.

Em perus, Gill et al. (1999) avaliaram o uso do teste BioPore® SBA para a identificação de machos potencialmente subfêrteis. Os autores tiveram como objetivos: a) a análise do efeito do armazenamento do sêmen e da concentração espermática sobre o percentual de espermatozóides ligados (EL) ao substrato; b) a classificação individual de machos, como de baixa ou alta capacidade de ligação ao substrato, com base em três ejaculados avaliados por macho, e c) a determinação da existência ou não de correlação entre os resultados do teste SBA e a fertilidade dos machos. O armazenamento do sêmen por 24h mostrou uma redução significativa no percentual médio de EL ( $2,88\% \pm 0,06$ ) comparado ao sêmen *in natura* ( $5,24\% \pm 0,15$ ). Baseado apenas nas avaliações com sêmen *in natura*, o percentual de EL foi significativamente maior para as concentrações 2 ou 4 milhões de espermatozóides/mL do que para as outras três (1, 6 ou 8). Considerando apenas as duas concentrações espermáticas (2 e 4 milhões de espermatozóides/mL), o percentual médio de EL foi de 0,94 a 5,38%. Nos testes efetuados com 4 milhões de espermatozóides/mL, os valores percentuais de ligação espermática ao substrato variaram de 0,11 a 12%. Diferenças significativas foram observadas entre os machos no percentual de EL. Dois experimentos foram realizados para comparar a fertilidade e a eclosão dos ovos de peruas, após inseminações com pool de sêmen de subpopulações de perus,

classificados de acordo com a sua capacidade de ligação espermática ao substrato do teste SBA. No primeiro experimento, a fertilidade e eclosão médias foram significativamente menores para as fêmeas inseminadas com sêmen de perus com baixo percentual de EL. No outro experimento, a fertilidade de fêmeas não foi diferente com o uso do sêmen de machos com alto ou baixo percentual de ligação, após inseminações efetuadas durante as semanas 32 a 39. No entanto, um declínio consistente na eclosão foi verificado, após 40 semanas de idade, mas apenas para as fêmeas inseminadas com sêmen de perus com baixa ligação. Por outro lado, com o uso do pool de sêmen de perus com alta ligação, a eclosão permaneceu elevada ( $\geq 80\%$ ). Esses resultados têm uma importância comercial visto que a maioria dos perus mostra um declínio na fertilidade e eclosão com o envelhecimento. Para os autores, o teste SBA detecta diferenças na qualidade espermática entre indivíduos, e que as mesmas influenciam na fertilidade. Além disso, o SBA parece ser capaz de detectar mais precocemente os machos (com 33 a 34 semanas de idade), cujo sêmen poderia, com o envelhecimento, levar a uma baixa fertilidade.

Na espécie humana, o teste SBA (BioPore®) foi usado para a avaliação dos danos observados na célula espermática, decorrentes da criopreservação (AMANN et al., 1999a). Os percentuais de EL variaram de <1 a 38% para o sêmen *in natura* (57 homens) e de <1 a 13% para o sêmen congelado (34 homens). Avaliando o sêmen *in natura*, houve uma correlação significativa entre a motilidade espermática e %EL no SBA, embora baixa, sendo a motilidade associada a menos de 30% da variação no percentual de EL. No entanto, é importante salientar que os resultados de motilidade espermática utilizados para a determinação dessa correlação foram obtidos antes das amostras seminais serem incubadas. Para o sêmen congelado, a correlação ( $r= 0,329$ ) entre os dois parâmetros de avaliação foi significativa, tendo a motilidade espermática explicado menos de 11% da variação no percentual de EL. Considerando os dados do sêmen *in natura*, foram observadas diferenças significativas entre machos no percentual médio de EL, e foi, também, verificado um coeficiente de variação de 31% para os ejaculados, dentro do mesmo doador (2 a 4 ejaculados/macho). Numa comparação direta, o percentual de EL foi menor para as alíquotas de sêmen congelado (2,2%) do que o apresentado pelas alíquotas do sêmen *in natura* (13,3%), obtidas dos mesmos doadores ( $n=17$ ). Com base na correlação entre os percentuais dos ELs de amostras do sêmen *in natura* e do sêmen congelado dos 17

ejaculados ( $r = 0,527$ ), foi concluído que a variação no percentual do EL para o sêmen *in natura* explicou menos de 30% da variação no percentual de EL para as amostras seminais congeladas ( $r^2 = 0,278$ ). Para os autores, o teste SBA pode ser utilizado como um instrumento para o diagnóstico em humanos, embora, ainda deva ser determinado se amostras seminais com baixo percentual de EL têm um baixo potencial fecundante.

Outros estudos têm utilizado o teste SBA para avaliar a ocorrência de uma melhora na capacidade de ligação dos espermatozóides, de diversas espécies, à zona pelúcida e na fertilidade, quando são expostos a um fragmento sintético da prosapsina (peptídeo FertPlus®).

Uma melhora na fertilidade foi observada após a exposição de espermatozóides de peru ao peptídeo, antes da IA (GILL, DONOGHUE e AMANN, 2000). A exposição a este peptídeo sintético também mostrou aumento na fertilidade do sêmen congelado de galos (HAMMERSTEDT et al., 2001) e de bovinos (AMANN, SEIDEL e BRINK, 1999). Em alguns homens, foi relatada uma melhora na capacidade de ligação do espermatozóide ao oócito, pela exposição *in vitro* de seus espermatozóides ao fragmento sintético da prosaposina (AMANN et al, 1999b). Outros estudos efetuados com espermatozóides de homens, touros e suínos também mostraram um efeito benéfico, na capacidade de ligação espermática ao substrato do teste SBA, ao serem expostos anteriormente ao peptídeo FertPlus® (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999).

Embora o teste SBA não tenha sido utilizado exclusivamente para diferenciar machos suínos quanto à fertilidade, ele já foi usado para avaliar o efeito da adição do FertPlus® na fertilidade de machos suínos (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999). Estudos para averiguar quais são os fatores que influenciam a capacidade de ligação dos espermatozóides suínos ao substrato sintético do teste, além de determinar se o mesmo permite a diferenciação do potencial de fertilidade dos machos, são importantes na otimização do emprego dos machos da espécie suína.

### **3 ESTUDO 1**

**DIFERENÇA ENTRE MACHOS SUÍNOS NA MANUTENÇÃO DA  
VIABILIDADE ESPERMÁTICA A 17°C**

# DIFERENÇA ENTRE MACHOS SUÍNOS NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE ESPERMÁTICA A 17°C

## DIFFERENCE AMONG BOARS IN THE MAINTENANCE OF SPERM VIABILITY AT 17°C

Goreti R. Reis<sup>1</sup>, Mari L. Bernardi<sup>2</sup>, Patrícia Schwarz<sup>3</sup>,  
Fernando P. Bortolozzo<sup>4</sup>, Ivo Wentz<sup>5</sup>

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar se cachaços selecionados conforme o tempo de manutenção da motilidade espermática (MOT) a 17°C, apresentavam o mesmo perfil em coletas subsequentes, além de avaliar o comportamento das variáveis acrossomas normais (NAR) e membranas íntegras (MI) durante o armazenamento. Cinco ejaculados de 30 machos foram analisados conforme a manutenção da MOT a 17°C, sendo classificados em três tipos: MOT <60% nas 72h (EI); MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h (EII) e MOT ≥60% nas 144h (EIII). Doze machos foram selecionados e distribuídos em três grupos: MAIOR, MÉDIA e MENOR sensibilidade espermática ao resfriamento. O critério utilizado foi que no mínimo 4/5 dos ejaculados fossem classificados como EI para MAIOR, EII para MÉDIA e EIII para MENOR. Em seguida, foram coletados cinco ejaculados de cada macho, sendo a MOT avaliada a cada 24h, e NAR e MI nas 24, 72, 120 e 168h. Machos menos sensíveis ao resfriamento apresentaram menor variação na MOT dos seus ejaculados do período pré- para o pós-seleção. O coeficiente de variação foi menor para MI e NAR do que para MOT. Diferenças entre os machos foram observadas desde as 24 até 168h para MOT, nas 120 e 168h para MI e nas 72 e 168h para NAR. A MOT foi mais afetada que MI e NAR durante o armazenamento de sêmen suíno *in vitro*.

**Palavras-chave:** motilidade, resfriamento, sêmen, suíno

---

<sup>1</sup>Doutora, Pesquisadora do Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor da FEPAGRO, Estrada do Conde, 6000, CEP 92990-000, Eldorado do Sul/RS. E-mail: grreis@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutora, Prof<sup>a</sup> Adjunto, Depto de Zootecnia, Faculdade de Agronomia da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS. E-mail: bernardi@orion.ufrgs.br

<sup>3</sup>Acadêmica de Medicina veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS. E-mail: patriciaschwarz@hotmail.com

<sup>4</sup>Doutor, Prof. Adjunto, Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS. E-mail: fpbortol@vortex.ufrgs.br

<sup>5</sup>Doutor, Prof. Adjunto, Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre/RS. E-mail: ivowentz@vortex.ufrgs.br

## ABSTRACT

The objective of this study was to verify if boars selected according to the maintenance of sperm motility (MOT), at 17°C, showed the same pattern on subsequent collections and to evaluate the behaviour of normal acrosomes (NAR) and plasma membrane integrity (MI) during storage. Five ejaculates from 30 boars were evaluated according to the time of maintenance of MOT at 17°C, and they were classified in three types: MOT <60% at 72h (EI); MOT ≥60% at 72h and <60% at 144h (EII) and MOT ≥60% at 144h (EIII). Twelve boars were selected and classified, in three groups: HIGH, INTERMEDIATE and LOW chilling sensitivity. The criterion used was that a minimum of 4 from 5 ejaculates was classified as EI for HIGH, EII for INTERMEDIATE and EIII for LOW groups. After this, five ejaculates from each boar were collected and MOT was evaluated each 24h, MI and NAR at 24, 72, 120 and 168h of storage. Males less sensitive to cooling showed a lower variation concerning the MOT of their ejaculates, between pre- and post-selection periods. The coefficient of variation of MI and NAR was lower than that of MOT. Differences among males for MOT were observed from 24 up to 168h, at 120 and 168h for MI and at 72 and 168h for NAR. MOT was more affected than MI and NAR during *in vitro* storage of swine semen.

**Key words:** chilling, motility, semen, swine

## INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento *in vitro* do sêmen suíno é observada uma queda gradativa na motilidade espermática. A diferença entre machos quanto à sensibilidade ao processo de resfriamento já foi reportada em suínos (MARIANO, 1988; PAULENZ, KOMMISRUUD e HOFMO, 2000), existindo machos cuja motilidade espermática é mantida por um período maior de tempo, enquanto outros apresentam uma queda mais precoce (WABERSKI, DIRKSEN e WEITZE, 1991). Doses de sêmen de doadores, que mantêm a viabilidade espermática *in vitro* por um maior período de tempo, poderiam ser utilizadas em situações estratégicas de inseminação (BORTOLOZZO e WENTZ, 1997).

A fertilidade do macho é de difícil predição, sendo sugerida (RODRIGUEZ-MARTINEZ, ZHANG e LARSSON, 1997) a análise combinada de diversos parâmetros seminais para possibilitar uma estimativa mais exata do potencial fecundante do sêmen. No

entanto, por ser a fertilidade comprometida com valores de motilidade abaixo de 60% (FLOWERS, 1997), este valor é usualmente utilizado como referência para a utilização das doses de sêmen na inseminação artificial (IA) de suínos.

A estimativa visual da motilidade (COLENBRANDER e KEMP, 1990) e das alterações de morfologia (PURSEL, JOHNSON e RAMPACEK, 1972; WOELDERS, 1991) têm sido os testes mais comumente empregados para a avaliação da qualidade seminal. Cada vez mais têm sido empregadas técnicas que permitem avaliar a integridade das membranas, como as colorações fluorescentes (WOELDERS, 1991; JOHNSON, MAXWELL e DOBRINSKY, 1996). Essas colorações, apesar de não serem de execução difícil, necessitam de equipamentos onerosos e de técnicos treinados, o que ainda restringe sua utilização ao campo experimental.

Este estudo teve como objetivo verificar se cachacos selecionados conforme o tempo de manutenção da viabilidade espermática durante o armazenamento a 17°C, através da avaliação da motilidade, mantinham este padrão ao longo das coletas, e para avaliar o comportamento dos parâmetros acrossomas normais e membranas íntegras, ao longo do armazenamento e das coletas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados, como doadores de sêmen, machos suínos selecionados do plantel de 170 animais de uma central de IA (CIA). A genética utilizada foi de uma linhagem comercial constituída pelas raças Large White, Landrace e Pietrain. A frequência de coletas dos machos, praticada como rotina na CIA, é de uma coleta a cada sete dias, entre sete e dez meses de idade, três coletas a cada 14 dias dos 11 aos 12 meses e duas coletas a cada sete dias a partir dos 13 meses.

Inicialmente, foi realizada a avaliação de 30 machos suínos, durante os meses de janeiro a maio, com um intervalo médio de duas semanas entre as análises. Foi avaliada a motilidade (MOT) de cinco ejaculados destes 30 machos, por um período de sete dias, a 17°C. Os ejaculados foram classificados em três grupos, de acordo com o período de manutenção da MOT, sendo: MOT <60% nas 72h (EI); MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h (EII) e MOT ≥60% nas 144h (EIII). Dos 30 machos, foram selecionados 12, os quais tinham entre 9 e 22 meses de idade. Os machos foram considerados como de maior

(MAIOR), média (MEDIA) e menor (MENOR) sensibilidade espermática ao resfriamento. O critério utilizado foi que dos 5 ejaculados no mínimo 4 fossem classificados como EI para MAIOR, EII para MEDIA e EIII para MENOR, respectivamente. Todos os ejaculados dos machos selecionados apresentaram valores de MOT acima de 80%, na avaliação pós-diluição.

Em seguida, foram avaliados cinco ejaculados de cada um dos machos selecionados (3, 4 e 5 machos no grupo MAIOR, MEDIA e MENOR, respectivamente), durante o período de junho a setembro, com um intervalo médio de três semanas entre as análises. As amostras de sêmen, contendo três bilhões de espermatozoides em diluente BTS (Beltsville Thawing Solution), foram armazenadas a 17°C. A avaliação da MOT foi efetuada a cada 24h durante sete dias de armazenamento. Os percentuais de acrossomas normais (PURSEL, JOHNSON e RAMPACEK, 1972) e de membranas espermáticas íntegras (HARRISON e VICKERS, 1990) foram avaliados nas 24, 72, 120 e 168h de armazenamento.

A MOT foi avaliada entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico (100x), a partir de uma alíquota de 1 mL de sêmen incubada em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Para a avaliação dos acrossomas normais (NAR), uma alíquota de 20µL foi retirada da DI e diluída em 0,5 mL de formol citrato a 2,94%. Posteriormente, uma gota do preparado foi avaliada entre lâmina e lamínula em microscópio óptico de contraste de fase (1000x). Foram examinadas 200 células de cada preparado. O percentual de membranas íntegras (MI) foi avaliado por coloração com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), conforme Harrison e Vickers (1990). Uma solução contendo 950µL de sêmen da DI, 20µL de CFDA (20µM - Calbiochem, Lajolla, CA), 10µL de PI (7,3µM - Sigma Chemical Co., Deisenhofen) e 20µL de paraformaldeído (1,7 µM) foi incubada a 30°C durante 8 minutos. Após a incubação, uma alíquota de 4µL foi avaliada, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (filtro EX/DM/BF= 450-490/510/520nm). Foram analisadas 200 células espermáticas por amostra, sendo utilizados os critérios de Ortman e Rodriguez-Martinez (1994) para a contagem das células com membranas íntegras.

Para a comparação entre os machos, os dados referentes à MOT, NAR e MI foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (SAS, 1998). Quando o efeito da semana de coleta foi significativo este permaneceu no modelo. Os dados foram

submetidos à transformação arcoseno raiz quadrada, antes de serem submetidos à análise. No entanto, as médias não transformadas são apresentadas nos resultados. Foram avaliadas as relações entre os parâmetros estudados pela correlação de Spearman (SAS, 1998).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na tabela 1 está a distribuição do número de machos conforme o número de ejaculados de cada tipo. O número de machos com 4 ou mais ejaculados de cada tipo foi menor para os dois extremos de sensibilidade (EI e EIII), havendo uma maior concentração de machos no grupo de sensibilidade média (EII).

Considerando os 150 ejaculados armazenados e examinados durante a pré-seleção, 22% apresentaram motilidade inferior a 60% nas 72h enquanto 73% dos ejaculados estavam com motilidade inferior a 60% nas 144h de armazenamento, confirmando a ocorrência de queda de motilidade ao longo do armazenamento (WEITZE, 1991; WABERSKI, DIRKSEN e WEITZE, 1991).

Na tabela 2 está a distribuição do número de ejaculados de cada tipo verificado em cada macho selecionado, antes e após a seleção. Em 3 machos, foram coletados 4 ejaculados ao invés de 5, no período pós-seleção. Os machos selecionados como sendo mais sensíveis ao resfriamento (Grupo MAIOR) apresentaram alguns ejaculados de sensibilidade média (tipo EII), com apenas 1 dos 15 ejaculados coletados sendo de menor sensibilidade (tipo EIII). Machos considerados menos sensíveis ao resfriamento (Grupo MENOR) não apresentaram nenhum ejaculado de maior sensibilidade (tipo EI), sendo os que apresentaram menor mudança de perfil no período pós-seleção em relação ao pré-seleção. A maior variação foi observada nos machos de sensibilidade média (Grupo MÉDIA) que, no período pós-seleção, apresentaram aumento do número de ejaculados de baixa sensibilidade (tipo EIII). Dos 4 machos selecionados neste grupo MÉDIA 2 comportaram-se como sendo do grupo MENOR.

Na Tabela 3 estão os coeficientes de variação (CV) observados para MOT, MI e NAR, de cada macho, no terceiro e sétimo dias de armazenamento. De um modo geral houve um aumento gradativo no CV com o aumento do tempo de armazenamento. Os menores CV foram observados para NAR, estando todos abaixo de 20% no 7º dia (Tabela 3). Os índices de MI apresentaram variação um pouco maior à do NAR, mas inferior à

observada para MOT. Os três machos do grupo MAIOR foram os que apresentaram alto CV para MOT, já nas 72h de avaliação, evidenciando uma maior variação entre seus ejaculados. Machos do grupo MENOR foram os que apresentaram menores CV para MOT (Tabela 3).

Considerando os dados das Tabelas 2 e 3, alguns machos apresentaram comportamento diferente do observado no período pré-seleção, em termos de uniformidade dos ejaculados, especialmente nos grupos MEDIA e MAIOR. Benson et al. (1967) reportaram uma maior variação entre machos do que entre ejaculados do mesmo macho. No entanto, em seu estudo, o sêmen foi avaliado apenas durante 5h de manutenção a 38°C, não podendo ser comparado diretamente às avaliações efetuadas durante um longo tempo de armazenamento, como foi o caso do presente estudo. De fato, como comentado anteriormente, o CV aumentou com o tempo de armazenamento, dificultando o processo de seleção, pela diminuição da uniformidade dos ejaculados de um mesmo macho. As razões pelas quais os diferentes ejaculados de um mesmo macho apresentam variação na manutenção da motilidade, durante o resfriamento, ainda não são conhecidas. Considerando que espermatozóides ejaculados adquirem maior sensibilidade ao choque térmico ao percorrerem os túbulos epididimários, segundo Watson (1995), a diferença na frequência de coletas e a duração do trânsito espermático no epidídimo poderiam contribuir para a variação dos ejaculados de um mesmo macho. A variação entre ejaculados de um mesmo macho também foi observada na capacidade dos espermatozóides em se ligar à zona pelúcida, levando Harrison (1997) a apresentar a hipótese de que o conteúdo de espermadesinas esteja envolvido, o que denotaria, diferenças na composição do plasma seminal de um ejaculado para outro. O fato das espermadesinas estarem ou não envolvidas com a sensibilidade ao resfriamento, ainda não foi estudado.

Especula-se que a redução na viabilidade espermática *in vitro* esteja relacionada ao decréscimo dos ácidos graxos polinsaturados, conforme observado por Cerolini, Maldjian e Surai (2000), durante o armazenamento do sêmen suíno. A peroxidação dos lipídios da membrana espermática também parece estar envolvida nas alterações estruturais e bioquímicas ocorridas durante o resfriamento (JONES e MANN, 1997), levando à perda da permeabilidade seletiva da membrana (DE LEEUW, COLENBRANDER e VERKLEIJ,

1991). No entanto, não há estudos que tenham investigado se estes aspectos diferem entre machos ou entre ejaculados de um mesmo macho.

A diferença de resposta entre ejaculados de um mesmo macho revela a dificuldade em efetuar uma classificação dos machos conforme a sensibilidade ao resfriamento, objetivo do presente estudo. Kennedy e Wilkins (1984) chamaram a atenção para o fato da avaliação de um único ejaculado não ser um bom indicativo do potencial produtivo do macho, pois os parâmetros de avaliação seminal apresentam baixa repetibilidade, sendo de 0,21 para a motilidade. Para ter uma estimativa mais precisa do potencial de produção de doses inseminantes, estes autores recomendaram a coleta de 9 a 15 ejaculados. No presente estudo, se forem considerados os 10 ejaculados coletados dos 12 machos, nos períodos pré- e pós-seleção, aqueles considerados menos sensíveis (grupo MENOR) foram os que apresentaram, no total, um maior número de ejaculados do tipo esperado (Tabela 2).

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão os percentuais médios de MOT, MI e NAR, respectivamente, para cada macho selecionado. Apesar de terem sido efetuadas avaliações diárias para MOT, somente são apresentados os dados dos dias em que foram avaliados os três parâmetros, de modo a estabelecer um paralelo entre eles. Foi observado, de modo geral, que os machos dos grupos MÉDIA e MENOR não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ), em termos de MOT, MI e NAR. Conforme salientado anteriormente, dos machos selecionados para o grupo MÉDIA alguns apresentaram comportamento semelhante aos do grupo MENOR, sendo evidenciado pelos índices de MOT próximos ou acima de 60%, no 7º dia (machos 6 e 7; Tabela 4). O macho 9, apesar de ter apresentado todos os ejaculados do tipo MÉDIA (EII), no pós-seleção (Tabela 2), apresentou queda acentuada da MOT no 5º e 7º dias (Tabela 4).

O percentual médio de MI, para todos os machos, nas 24h de armazenamento, foi de 77%, similar ao valor de 74% observado por Ortman e Rodriguez-Martinez (1994), logo após a diluição do sêmen.

Embora os valores de MI sejam, de modo geral, superiores aos de MOT, diferenças maiores entre estes dois parâmetros, aparecem no 5º e 7º dias para os machos MÉDIA e MENOR. Nos machos MAIOR a queda da MOT é mais acentuada que a da MI, fazendo com que as diferenças entre os dois parâmetros se acentuem ao longo do armazenamento. (Tabelas 4 e 5).

Os machos apresentaram diferentes percentuais de MOT, em todos os dias de avaliação, mas diferiram em termos de MI, no 5º e 7º dias (Tabelas 4 e 5), e de NAR, no 3º e 7º dias (Tabela 6) de armazenamento. De modo geral, os valores de NAR foram elevados, mesmo após 7 dias de armazenamento. Não foi observado nenhum valor individual de NAR abaixo de 80%, nas 72h de armazenamento, mesmo para os machos de MÉDIA ou MAIOR sensibilidade ao resfriamento. Assim, alguns machos que diferiram em termos de MOT apresentaram percentuais de NAR semelhantes (Tabelas 4 e 6).

Cabe salientar que os machos não foram selecionados por diferenças estatísticas em seus parâmetros, mas considerando um valor mínimo de 60% de motilidade, abaixo do qual pode haver uma queda na eficiência reprodutiva (FLOWERS, 1997). Se for efetuado um paralelo para MI, do total de 228 avaliações efetuadas, compreendendo o 1º, 3º, 5º e 7º dias, 33 (14,5%) valores estiveram abaixo de 60%, ao longo do armazenamento. Dos 20 valores com esta característica, observados nas 168h, 11 foram oriundos de machos de MAIOR sensibilidade e 4 de um macho MEDIA (macho 9). Na Tabela 4, pode ser observado que este macho também apresentou valores de MOT baixos no 5º e 7º dias. Em termos de NAR, 19 (8,3%) valores individuais foram abaixo de 85%. Quinze destes valores foram observados nas 168h de avaliação, 7 dos quais oriundos dos três machos de MAIOR sensibilidade. Desta forma, os machos selecionados como sendo os mais sensíveis ao resfriamento, em termos de MOT, foram também os responsáveis por boa parte dos valores baixos de MI e NAR.

Não houve correlação significativa entre MOT, NAR e MI, na avaliação efetuada nas 24h (Tabela 7). Correlações significativas ( $P < 0,01$ ) foram verificadas, a partir das 72h (NAR e MI; NAR e MOT) ou 120h (MOT e MI).

A correlação entre parâmetros de avaliação seminal parece controversa pois Baltes (1993), analisando sêmen suíno durante cinco dias de armazenamento a 17°C, não verificou correlação significativa entre MI, NAR e MOT, enquanto Zou e Yang (2000) observaram alta correlação. Segundo Jeyendran e Zaneveld (1993), a existência ou não de correlação entre parâmetros de viabilidade espermática não invalida a utilização de um dos testes, pois vários aspectos estão envolvidos na função espermática, os quais podem ser avaliados por um teste, mas não por outro. Para Holt (2000), a integridade da membrana acrossômica não reflete necessariamente a integridade da membrana plasmática, a qual parece ser mais lábil

(HARRISON e VICKERS, 1990; ORTMAN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994), o que poderia explicar a ocorrência de espermatozóides com o acrossoma morfologicamente normal, mas com a integridade da membrana plasmática e a motilidade alteradas. À medida que as doses de sêmen permaneceram mais tempo armazenadas, a MOT, MI e NAR foram comprometidos, embora em diferente intensidade, o que poderia explicar o aumento dos valores de correlação, observado no presente estudo, para alguns destes parâmetros, acompanhando o envelhecimento *in vitro* do sêmen.

Os bons resultados de fertilidade verificados, em alguns casos, após inseminações realizadas com 24 ou mais horas antes da ovulação (SOEDE, WETZELS e ZONDAG, 1995; UEMOTO, 1999) levantam a possibilidade de que estes aspectos poderiam estar relacionados, ao menos em parte, com a maior duração da viabilidade dos espermatozóides de determinados machos no trato reprodutivo feminino. Sob o ponto de vista prático, seria importante realizar estudos para verificar se há ou não correlação entre a duração da viabilidade da célula espermática *in vitro* e *in vivo*. Se essa correlação existir, a utilização de machos com maior sobrevivência espermática *in vitro* traria garantia de bons índices de fertilidade, em casos de intervalos inseminação-ovulação superiores a 24h ou para inseminações intrauterinas, com menor número de espermatozóides por dose.

## CONCLUSÕES

Machos selecionados como tendo menor sensibilidade espermática ao resfriamento apresentaram menor variação nas características dos ejaculados do período pré- para o pós-seleção. A motilidade é o parâmetro mais afetado no sêmen resfriado e o que mais variou entre machos e entre ejaculados de um mesmo macho. As diferenças observadas entre machos em termos de motilidade nem sempre são acompanhadas por diferenças na integridade de membrana e de acrossomas normais.

## REFERÊNCIAS

BALTES, T.J. **Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of *in vitro* aging of boar spermatozoa.** Hannover, Alemanha, 1993. 102p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Escola Superior de Hannover, Alemanha, 1993.

BENSON, R.W.; PICKETT, B.W.; KOMAREK, R.J.; LUCAS, J.J. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. **Journal Animal Science**, v.26, n.5, p.1078-1081, 1967.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, Ivo. Sucesso de um programa de IA em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p.15-21, 1997.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.

COLENBRANDER, B.; KEMP, B. Factors influencing semen quality in pigs. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 40, p.105-115, 1990.

DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.95-104, 1991.

FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p. 67-78, 1997.

HARRISON, R.A.P. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p.195-211, 1997.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescence probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343-352, 1990.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.47-58, 2000.

JEYENDRAN, R.S.; ZANEVELD, L.J.D. Controversies in the development and validation of new sperm assays. **Fertility and Sterility**, v.59, n.4, p.726-728, 1993.

JOHNSON, L.A.; MAXWELL, W.M.C.; DOBRINSKY, J.R.; et al. Staining sperm for viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 31, p.37-47, 1996.

JONES, R.; MANN, T. Damage of ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal Reproduction and Fertility**, v.50, p.261-268, 1977.

KENNEDY, B.W.; WILKINS, J.N. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, p.833-843. 1984.

MARIANO, M.S. **Características biológicas e bioquímicas do sêmen suíno com diferentes resistências à conservação no estado líquido e ao congelamento**. Santa Maria, 1988. 72p.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 1988.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47, 1994.

PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.83-87, 2000.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrossome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal Animal Science**, v.34, n.2, p.278-283, 1972.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B.R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.25, p.108-126, 1997.

SAS INSTITUTE (Cary, N.C.) **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12, 1998.

SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W.; et al. Effects of time of insemination-relative ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **J. Reprod. Fert.**, v.104, p.99-106, 1995.

UEMOTO, D. **Comportamento estral e desempenho reprodutivo de leitoas submetidas à inseminação artificial em diferentes intervalos pré-ovulatórios**. Porto Alegre, 1999. 100p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 1999.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; et al. The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.267-270, 1998.

WABERSKI, D.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F. Effect of semen quality on fertility results of stored liquid boar semen – a field trial. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.375-378, 1991.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.231-253, 1991.

WOELDERS, H. Overview of methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.145-164, 1991.

ZOU, C.X.; YANG, Z.M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.1477-1488, 2000.

Tabela 1 - Distribuição dos 30 machos avaliados na pré-seleção de acordo com o número de ejaculados de cada tipo.

Tipo de ejaculado	Número de machos conforme o número de ejaculados de cada tipo					
	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
EI	17	6	2	0	2	3
EII	5	6	3	5	6	5
EIII	13	8	4	0	3	2

EI= motilidade <60% nas 72h

EII= motilidade  $\geq$ 60% nas 72h e <60% nas 144h

EIII= motilidade  $\geq$ 60% nas 144h

Tabela 2 - Número de ejaculados de cada tipo observados nos 12 machos selecionados.

Grupos	Machos	Pré-seleção			Pós-seleção		
		EI	EII	EIII	EI	EII	EIII
MENOR	1	0	1	4	0	1	4
MENOR	2	0	1	4	0	0	5
MENOR	3	0	1	4	0	2	3
MENOR	4	0	0	5	0	0	5
MENOR	5	0	0	5	0	0	4
MÉDIA	6	0	4	1	0	0	4
MÉDIA	7	1	4	0	0	1	4
MÉDIA	8	0	5	0	1	1	3
MÉDIA	9	0	5	0	0	4	0
MAIOR	10	4	1	0	3	2	0
MAIOR	11	5	0	0	2	2	1
MAIOR	12	5	0	0	3	2	0

EI= motilidade <60% nas 72h (mínimo 4/5 ejaculados para grupo MAIOR na pré-seleção)

EII= motilidade  $\geq$ 60% nas 72h e <60% nas 144h (mínimo 4/5 ejaculados para grupo MÉDIA na pré-seleção)

EIII= motilidade  $\geq$ 60% nas 144h (mínimo 4/5 ejaculados para grupo MENOR na pré-seleção)

Tabela 3 - Coeficientes de variação da motilidade (MOT), membranas íntegras (MI) e acrossomas normais (NAR) no terceiro e sétimo dia de armazenamento do sêmen de machos suínos selecionados de acordo com a manutenção da motilidade *in vitro*.

Grupos	Machos	MOT		MI		NAR	
		3º dia	7º dia	3º dia	7º dia	3º dia	7º dia
MENOR	1	12%	57%	15%	16%	1%	6%
MENOR	2	6%	13%	8%	10%	1%	11%
MENOR	3	10%	57%	7%	16%	1%	3%
MENOR	4	7%	11%	5%	17%	3%	7%
MENOR	5	10%	16%	6%	9%	2%	7%
MÉDIA	6	12%	67%	5%	44%	1%	7%
MÉDIA	7	17%	77%	9%	9%	3%	4%
MÉDIA	8	15%	61%	9%	21%	2%	8%
MÉDIA	9	13%	212%	4%	30%	2%	8%
MAIOR	10	77%	316%	3%	19%	2%	11%
MAIOR	11	70%	197%	19%	53%	3%	19%
MAIOR	12	116%	316%	16%	44%	7%	13%

MENOR = mínimo 4/5 ejaculados MOT  $\geq 60\%$  nas 144h na pré-seleção

MÉDIA = mínimo 4/5 ejaculados MOT  $\geq 60\%$  nas 72h e  $< 60\%$  nas 144h na pré-seleção

MAIOR = mínimo 4/5 ejaculados MOT  $< 60\%$  nas 72h na pré-seleção

Tabela 4 - Percentuais de motilidade do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média ± desvio-padrão).

Grupos	Machos	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia
MENOR	1	87 ± 4,5ab	79 ± 8,9a	73 ± 6,7a	57 ± 29,7a
MENOR	2	89 ± 2,2a	77 ± 4,5a	71 ± 4,2a	65 ± 3,5a
MENOR	3	81 ± 4,2abc	73 ± 5,7ab	57 ± 27,3ab	50 ± 29,4ab
MENOR	4	86 ± 4,2ab	76 ± 6,5a	73 ± 5,7a	63 ± 8,4a
MENOR	5	86 ± 2,5ab	80 ± 6,5a	75 ± 7,1a	67 ± 10,4a
MÉDIA	6	81 ± 4,8abc	75 ± 6,5ab	70 ± 7,1a	66 ± 6,3a
MÉDIA	7	81 ± 8,9abc	76 ± 7,4a	64 ± 7,4ab	58 ± 19,2a
MÉDIA	8	72 ± 13,0bcd	68 ± 14,0abc	62 ± 12,0ab	50 ± 13,2ab
MÉDIA	9	85 ± 5,0ab	75 ± 10,4ab	39 ± 29,5abc	0,0 ± 0,0c
MAIOR	10	63 ± 20,5d	42 ± 34,7bc	8,0 ± 17,9c	2,0 ± 4,5c
MAIOR	11	72 ± 7,6bcd	54 ± 22,5abc	34 ± 31,5bc	18 ± 22,5bc
MAIOR	12	66 ± 10,8cd	37 ± 28,4c	2,0 ± 4,5c	0,0 ± 0,0c

MENOR = mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 144h na pré-seleção

MÉDIA= mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h na pré-seleção

MAIOR= mínimo 4/5 ejaculados MOT <60% nas 72h na pré-seleção

a, b, c, d na coluna (P<0,05)

Tabela 5 - Percentuais de membranas espermáticas íntegras do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média ± desvio-padrão).

Grupos	Machos	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia
MENOR	1	78 ± 1,2	80 ± 11,7	77 ± 6,4ab	67 ± 10,6a
MENOR	2	76 ± 8,6	78 ± 6,3	77 ± 7,6ab	74 ± 7,7a
MENOR	3	75 ± 1,7	72 ± 4,8	72 ± 6,0ab	64 ± 10,3a
MENOR	4	77 ± 8,6	77 ± 3,5	78 ± 6,7ab	75 ± 12,9a
MENOR	5	80 ± 5,4	78 ± 4,8	77 ± 13,0ab	72 ± 6,5a
MÉDIA	6	82 ± 5,0	79 ± 3,9	81 ± 3,7a	64 ± 28,5a
MÉDIA	7	71 ± 8,7	78 ± 6,7	74 ± 8,5ab	75 ± 6,5a
MÉDIA	8	74 ± 9,7	76 ± 7,1	73 ± 11,6ab	60 ± 12,8ab
MÉDIA	9	75 ± 8,4	78 ± 3,4	55 ± 10,5bc	24 ± 7,2c
MAIOR	10	77 ± 7,4	79 ± 2,5	70 ± 9,9ab	49 ± 9,7abc
MAIOR	11	76 ± 5,9	66 ± 12,6	47 ± 21,9c	50 ± 26,6abc
MAIOR	12	77 ± 6,4	67 ± 10,4	46 ± 5,1c	29 ± 13,0bc

MENOR = mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 144h na pré-seleção

MÉDIA= mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h na pré-seleção

MAIOR= mínimo 4/5 ejaculados MOT <60% nas 72h na pré-seleção

a, b, c na coluna (P<0,05)

Tabela 6 - Percentuais de acrossomas normais do sêmen dos 12 machos selecionados, ao longo do armazenamento a 17°C em BTS (média ± desvio-padrão).

Grupos	Machos	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia
MENOR	1	97 ± 1,4	96 ± 0,6a	92 ± 3,3	92 ± 5,2ab
MENOR	2	97 ± 1,5	96 ± 1,1a	94 ± 2,2	88 ± 9,7abc
MENOR	3	96 ± 2,0	94 ± 2,9ab	92 ± 2,8	93 ± 3,0ab
MENOR	4	97 ± 1,2	97 ± 1,7a	94 ± 3,6	93 ± 6,4ab
MENOR	5	98 ± 1,0	96 ± 1,6a	94 ± 3,1	92 ± 6,0abc
MÉDIA	6	97 ± 1,4	95 ± 1,1ab	93 ± 3,1	90 ± 6,6abc
MÉDIA	7	97 ± 1,9	95 ± 2,6ab	94 ± 4,3	94 ± 4,1a
MÉDIA	8	96 ± 1,1	96 ± 2,1a	90 ± 7,8	89 ± 7,1abc
MÉDIA	9	95 ± 3,7	94 ± 1,7ab	91 ± 2,7	82 ± 6,9abc
MAIOR	10	98 ± 1,6	95 ± 1,6ab	93 ± 3,3	85 ± 9,1abc
MAIOR	11	96 ± 2,2	94 ± 2,6ab	88 ± 11,5	79 ± 14,7c
MAIOR	12	97 ± 1,6	90 ± 6,0b	84 ± 7,8	80 ± 10,3bc

MENOR = mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 144h na pré-seleção

MÉDIA= mínimo 4/5 ejaculados MOT ≥60% nas 72h e <60% nas 144h na pré-seleção

MAIOR= mínimo 4/5 ejaculados MOT <60% nas 72h na pré-seleção

a, b, c na coluna (P<0,05)

Tabela 7 - Correlação entre motilidade, acrossomas normais (NAR) e integridade de membrana (MI) de sêmen suíno resfriado a 17°C, nos diversos momentos de avaliação.

	Motilidade				NAR			
	24h	72h	120h	168h	24h	72h	120h	168h
MI	0,226	0,257	0,586	0,737	-0,005	0,374	0,429	0,568
P	0,122	0,078	<0,001	<0,001	0,974	0,009	0,002	<0,001
NAR	-0,031	0,451	0,410	0,371	-	-	-	-
P	0,835	0,001	0,004	0,009				

## **4 ESTUDO 2**

### **VIABILIDADE ESPERMÁTICA APÓS A TROCA DE PLASMA SEMINAL ENTRE MACHOS SUÍNOS COM DIFERENTE SENSIBILIDADE AO RESFRIAMENTO**

**VIABILIDADE ESPERMÁTICA APÓS A TROCA DE PLASMA SEMINAL  
ENTRE MACHOS SUÍNOS COM DIFERENTE SENSIBILIDADE AO  
RESFRIAMENTO**

**SPERM VIABILITY AFTER CHANGE OF SEMINAL PLASMA BETWEEN BOARS WITH  
DIFFERENT CHILLING SENSITIVITY**

Goreti Ranincheski dos Reis\*, Patrícia Schwarz\*, Mari Lourdes Bernardi\*\*, Fernando  
Pandolfo Bortolozzo\*, Ivo Wentz\*

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi verificar um possível efeito do plasma seminal (PS) na sensibilidade espermática ao resfriamento, a partir da troca cruzada de PS, entre cachaaos com diferente manutenção da motilidade (MOT) a 17°C. Foram utilizados como doadores de sêmen cinco cachaaos selecionados previamente, de um total de 30 machos, conforme a MOT do sêmen avaliada durante sete dias de armazenamento a 17°C, e classificados como: menor (MES - MOT  $\geq$ 60% após 144 horas) e maior sensibilidade ao resfriamento (MAS - MOT <60% nas 72 horas). Ejaculados dos machos MAS e MES foram distribuídos em seis tratamentos, com cinco repetiçoes cada. Nos tratamentos T1 e T3, o sêmen dos machos MES e MAS, respectivamente, foram processados de acordo com o protocolo convencional. Foi efetuada centrifugaçao (800g por 10 min) e adiçao do PS (10mL) homólogo para os espermatozoides MES e MAS, respectivamente, nos T2 e T4. Após a centrifugaçao, foi realizada a troca do PS, sendo que espermatozoides dos machos MES foram expostos ao PS dos machos MAS (T5) e o PS dos machos MES foi adicionado aos espermatozoides dos machos MAS (T6). As doses de sêmen, diluídas em BTS, contendo três bilhões de espermatozoides e distribuídas de acordo com os tratamentos descritos foram avaliadas durante sete dias de conservaçao. A MOT foi avaliada a cada 24 horas. Os percentuais de acrossomas normais (NAR) e de membranas íntegras (IM) foram avaliados nas 24, 72, 120 e 168 horas. Diferençaa significativas ( $P= 0,038$ ) na MOT, entre os machos MES (T1) e MAS (T3), foram observadas após armazenamento de 48 horas. Em termos de

---

\* Setor de suínos, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000. Porto Alegre/RS. E-mail: greis@hotmail.com – Autor para correspondência.

\*\* Deptº de Zootecnia, Faculdade de Agronomia da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP: 91540-000. Porto Alegre/RS.

IM, foi verificado um maior percentual ( $P= 0,027$ ), para os machos MES, na avaliação efetuada nas 120 horas. Diferenças significativas ( $P<0,01$ ) no NAR, foram também verificadas, para os machos MAS, embora somente nas 72 horas, quando o ejaculado desses machos foi submetido à centrifugação e adição de PS homólogo ou heterólogo. Não foram observadas alterações na MOT e na IM, quando foi efetuada a troca de PS entre os machos MES e MAS. Os espermatozóides oriundos dos machos MAS apresentaram diminuição de 11% na MOT nas 24 horas, quando submetidos à centrifugação, ao passo que espermatozóides oriundos dos machos MES apresentaram diminuição de 16% na MOT ( $P= 0,054$ ), porém somente nas 168 horas. Uma diminuição da IM, embora somente nas 168 horas, foi também observada, tanto para os machos MES como para os MAS ( $P<0,01$ ), quando o sêmen destes machos foi centrifugado e adicionado de PS homólogo ou heterólogo. A centrifugação, utilizada durante o processamento de troca do PS, entre machos com diferente sensibilidade ao resfriamento, tem efeitos deletérios sobre a motilidade e a integridade de membrana da célula espermática, sobretudo para os machos MAS. Não foi possível reverter a maior sensibilidade ao resfriamento de espermatozóides suínos, após a ejaculação, com a adição de 10% do PS de machos com sêmen de menor sensibilidade.

**Palavras-chave:** espermatozóide, motilidade, plasma seminal, resfriamento, suíno

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate a possible effect of seminal plasma (PS) on sperm chilling sensitivity, through changing of PS, between boars with different maintenance of motility (MOT), at 17°C. Five boars were selected in advance, from 30 boars, according to the maintenance of MOT evaluated during seven days of conservation at 17°C, and the boars were classified in: low (MES - MOT  $\geq 60\%$  at 144 hours) and high (MAS – MOT  $< 60\%$  at 72 hours) chilling sensitivity. Ejaculates of MAS and MES were distributed in six treatments, with five replications each one. In T1 and T3, semen from boars MES and MAS, respectively, were processed according to the conventional protocol. Centrifugation (800g for 10 min) was performed and homologous PS (10mL) was added to sperm MES and MAS, respectively, in T2 and T4. After centrifugation, sperm from boars

MES was exposed to PS from boars MAS (T5) and the PS of boars MES was added to sperm of boars MAS (T6). Doses of semen, diluted in BTS, with three billions of sperm and distributed according to the treatments described above were evaluated during seven days of conservation. Sperm motility was evaluated each 24 hours. The percentages of normal acrosomes (NAR) and intact membranes (IM) were evaluated at 24, 72, 120 and 168 hours. Significant differences ( $P= 0.038$ ) in MOT, between boars MES (T1) and MAS (T3), were observed after 48 hours of storage. Boars MES had a higher percentual of IM ( $P= 0.027$ ) at 120 hours. Significant decrease ( $P<0.01$ ) in NAR was also verified for boars MAS, although only at 72 hours, when their semen was submitted to centrifugation and addition of PS homologous or heterologous. No alterations in MOT and in IM were observed when PS was changed between MES and MAS boars. Sperm from boars MAS had a reduction of 11% in MOT ( $P<0.005$ ) already at 24 hours, when it was submitted to centrifugation, while sperm from boars MES had a reduction of 16% in MOT ( $P= 0.054$ ), only at 168 hours. Reduction of IM, although only at 168 hours, was also observed, for MES and MAS boars ( $P<0.001$ ), when semen was centrifuged and added of PS homologous or heterologous. Centrifugation used during the processing for changing of PS, between boars with different chilling sensitivity, has deleterious effects on motility and membrane integrity of sperm, mainly to MAS boars. It was not possible to reverse the higher chilling sensitivity of ejaculated swine sperm, with the addition of seminal plasma of more resistant boars.

**Key words:** chilling, motility, seminal plasma, spermatozoa, swine

## INTRODUÇÃO

Embora os efeitos do plasma seminal (PS) sobre a função da célula espermática suína tenham sido amplamente estudados, os resultados ainda são contraditórios. Estudos têm mostrado que há um fator inibidor da motilidade no PS de suínos (IWAMOTO et al., 1992; KORDAN et al., 1998). Entretanto, uma melhora na motilidade tem sido observada com a adição de PS no diluente de espermatozoides descongelados (GUTHRIE, MAXWELL e JOHNSON, 2000) ou sexados (MAXWELL, WELCH e JOHNSON, 1997). Também tem sido reportado como um efeito benéfico do PS o aumento na resistência do

espermatozóide aos danos do choque térmico (PURSEL, JOHNSON e SCHULMAN, 1973; BERGER e CLEGG, 1985), embora a remoção ou não do PS, durante o processo do congelamento, não afete a viabilidade espermática pós-descongelamento (SALAMON, 1973; FAZANO, 1986). Embora espermatozoides ejaculados sejam mais sensíveis ao congelamento do que os epididimários (BERGER e CLEGG, 1985), ainda não foi comprovado se essa maior sensibilidade depende, exclusivamente, do contato com o PS (RATH e NIEMANN, 1997). Apesar de não se saber, exatamente, quais os fatores que sensibilizam ou promovem a resistência espermática, deve-se considerar a presença de proteínas seminais, que interajam com a membrana plasmática (MOORE, HALL e HIBBITT, 1976), assim como a variação na composição do PS entre machos (PÉREZ-PÉ et al., 2001).

Mesmo sabendo-se que em suínos existe uma relação entre as proteínas do PS e a fertilidade dos machos (ASH et al., 1994; FLOWERS, 1997/1998), ainda não é conhecido se esses componentes seminais estão envolvidos na sensibilidade dos espermatozoides ao resfriamento. Assim, este estudo se propõe a verificar um possível efeito do PS na sensibilidade espermática ao resfriamento, a partir da troca cruzada de PS, entre doadores de sêmen com diferente manutenção da motilidade durante a conservação a 17°C. Como a centrifugação do sêmen é um dos passos necessários para efetuar a troca cruzada de PS, seu efeito sobre a viabilidade espermática também foi avaliado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados como doadores de sêmen cinco machos selecionados a partir da avaliação de 30 machos de uma central de IA. A escolha foi baseada na motilidade (MOT) de cinco ejaculados de cada macho, coletados a cada duas semanas, e avaliada durante sete dias de armazenamento em diluente BTS (Beltsville Thawing Solution) a 17°C.

Os machos utilizados apresentaram MOT  $\geq 60\%$  após 144 horas (menor sensibilidade ao resfriamento - MES) e MOT  $< 60\%$  nas 72 horas (maior sensibilidade ao resfriamento - MAS). Ejaculados dos machos MAS e MES foram distribuídos em seis tratamentos, com cinco repetições cada.

T1: sêmen de machos MES, procedimento convencional

T2: sêmen de machos MES, centrifugação, adição de PS de machos MES

T3: sêmen de machos MAS, procedimento convencional

T4: sêmen de machos MAS, centrifugação, adição de PS de machos MAS

T5: sêmen de machos MES, centrifugação, adição de PS de machos MAS

T6: sêmen de machos MAS, centrifugação, adição de PS de machos MES

Nos tratamentos T1 e T3, o sêmen dos machos MES e MAS, respectivamente, foram processados de acordo com o protocolo convencional, isto é, foi imediatamente diluído em BTS, em doses de 100mL, sem ser submetido à centrifugação. Para os outros tratamentos, o PS foi obtido por centrifugação (800g por 10 min) dos ejaculados dos machos MES e MAS. O PS obtido após a primeira centrifugação foi novamente centrifugado (1500g por 10 min) para remoção dos espermatozoides remanescentes. Imediatamente após a centrifugação, os espermatozoides foram diluídos com BTS, num volume similar ao do PS retirado, processando quatro soluções pré-diluídas (SPDs). Após a determinação da concentração espermática, de cada SPD, foram preparadas as doses de sêmen (DSs) homólogas e heterólogas, com a adição de 10mL de PS correspondente, e o volume final de 100mL foi completado com diluente.

As DSs, contendo três bilhões de espermatozoides, foram avaliadas durante um período de 168 horas de armazenamento *in vitro*. A avaliação da MOT foi efetuada a cada 24 horas. Os percentuais de acrossomas normais (PURSEL, JOHNSON e RAMPACEK, 1972) e de membranas íntegras (IM) foram avaliados nas 24, 72, 120 e 168 horas. A MOT foi avaliada entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico (100x), a partir de uma alíquota de 1mL de sêmen incubada em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Para a avaliação dos acrossomas com borda apical normal (NAR), uma alíquota de 20µL foi retirada das DSs e diluída em 0,5mL de formol citrato a 2,94%. Posteriormente, uma gota do preparado foi avaliada entre lâmina e lamínula em microscópio óptico de contraste de fase (1000x). Foram examinadas 200 células de cada preparado. A integridade da membrana espermática foi avaliada por coloração com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), conforme Harrison e Vickers (1990). Uma solução contendo 950µL de sêmen da DI, 20µL de CFDA (20µM - Calbiochem, Lajolla, CA), 10µL de PI (7,3µM - Sigma Chemical Co., Deisenhofen) e 20µL de paraformaldeído (1,7

$\mu\text{M}$ ) foi incubada a  $30^{\circ}\text{C}$  durante oito minutos. Após a incubação, uma alíquota de  $4\mu\text{L}$  foi avaliada, entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência (filtro EX/DM/BF= 450-490/510/520nm). Foram analisadas 200 células espermáticas por amostra, sendo utilizados os critérios de Ortman e Rodriguez-Martinez (1994) para a contagem das células com membranas íntegras.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM (SAS, 1998), sendo considerados os contrastes de interesse.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação da MOT e IM são apresentados na Tabela 1. Nela pode-se constatar diferenças significativas ( $P= 0,038$ ) na MOT e na IM ( $P= 0,027$ ), entre os machos MES (T1) e MAS (T3), respectivamente, após um armazenamento de 48 e 120 horas, confirmando a diferença desses machos na sensibilidade ao resfriamento.

Apesar de, no presente estudo, terem sido verificados altos valores de NAR, com percentuais acima de 85%, e que as diferenças observadas entre T3 e T4 e entre T4 e T6 foram muito baixas, respectivamente 5,7 e 5,4%, foram verificadas reduções significativas para machos MAS, embora somente nas 72 horas, quando o sêmen desses machos foi submetido à centrifugação e adição de PS homólogo ou heterólogo.

Espermatozóides oriundos dos machos MAS apresentaram diminuição de 11% ( $P=0,031$ ) na MOT nas 24 horas (Tabela 1), após terem sido submetidos à centrifugação (T3 vs T4), sugerindo que eles sejam mais sensíveis que os espermatozóides oriundos dos machos MES, os quais apresentaram diminuição de 16% na MOT ( $P= 0,054$ ), somente nas 168 horas (T1 vs T2). O efeito prejudicial da centrifugação sobre a MOT é reforçado quando os ejaculados submetidos à centrifugação foram agrupados e comparados aos que não foram submetidos, dentro de cada grupo de machos. O efeito da centrifugação, para os machos MAS, aparece apenas nas 24 horas, provavelmente porque, após este momento, a MOT desses machos já está baixa, devido a sua maior sensibilidade ao resfriamento, não sendo possível detectar efeitos adicionais da centrifugação.

Com relação à sensibilidade do espermatozóide suíno à centrifugação, os estudos são escassos e contraditórios. Fazano (1986), comparando a realização de duas

centrifugações (800g por 10 min) com a realização de uma única, durante o processo de congelamento, não observou diferenças na MOT pós-descongelamento. Contudo, Salamon (1973), utilizando velocidade superior (1.000g por 10 min) à do presente estudo, verificou um efeito deletério da centrifugação sobre a MOT. No presente estudo observou-se que, tanto para os machos MES (T2 + T5 vs T1) como para os MAS (T4 + T6 vs T1), a centrifugação do sêmen homólogo ou heterólogo provocava uma diminuição da IM ( $P < 0,01$ ), embora somente após 168 horas de armazenamento (Tabela 1).

Não foram observadas alterações na MOT e na IM (Tabela 1), quando foi efetuada a troca de PS entre os machos MES e MAS, sugerindo que a exposição de espermatozóides ejaculados, ao PS heterólogo, não consegue modificar a sensibilidade ao resfriamento. Sandoval et al. (1991) também não conseguiram reverter a sensibilidade ao choque térmico e ao congelamento de espermatozóides suínos, quando foi efetuada a troca de PS entre o sêmen de machos previamente selecionados como de boa e de má congelabilidade. Thérien, Moreau e Manjunath (1998) sugerem que, logo após a ejaculação, proteínas do PS bovino aderem-se aos espermatozóides alterando a estabilidade da membrana. Desta forma, a utilização de procedimentos simples, como a lavagem dos espermatozóides, podem não ser eficientes para a remoção dos componentes seminais, aderidos à membrana plasmática, comprometendo tentativas posteriores de ligação de componentes de outro PS adicionado (STRZEZEK et al., 1995; HENAULT e KILLIAN, 1996). Além disto, Henault e Killian (1996) observaram que o PS de machos de baixa fertilidade contém fatores inibidores da fertilidade, aparentemente mais difíceis de serem removidos do que os fatores presentes nos touros de alta fertilidade. No presente estudo, o efeito do PS sobre a MOT e IM foi mais evidente, embora não significativo, quando os espermatozóides dos machos menos sensíveis ao resfriamento foram expostos ao PS dos machos mais sensíveis (Tabela 1). Metz, Berger e Clegg (1990) verificaram que espermatozóides oriundos de ejaculados de baixa MOT (30 a 50%) apresentaram uma menor capacidade de adsorção de proteínas do PS (3 pg) quando comparados aos espermatozóides de ejaculados com 50 a 70% de MOT (14 pg). O conjunto dessas observações sugere que a maior ou menor sensibilidade dos espermatozóides ao resfriamento possa estar relacionada com a sua capacidade de adsorção ou de remoção de fatores associados à viabilidade espermática, presentes no PS.

A constatação da ausência de reversão da sensibilidade da célula espermática ao resfriamento também pode estar relacionada com a concentração de PS empregada. No presente estudo, foi utilizada uma concentração de 10% de PS. Apesar de Maxwell, Welch e Johnson (1997), empregando a mesma concentração, verificarem melhora na motilidade de espermatozóides submetidos a grandes taxas de diluição, se considerarmos a dificuldade de reversão da ligação dos componentes do PS à membrana espermática, é possível que uma concentração de PS superior aos 10% seja necessária para alterar a sensibilidade ao resfriamento, como em Knüppel (2000) que, com a adição de 20% de PS, verificou melhora na motilidade após teste de termoresistência de sêmen suíno resfriado e armazenado por 24 horas. Melhora na motilidade e na integridade de membrana também foi obtida na espécie eqüina, quando em ejaculados de garanhões com baixa motilidade pós-descongelamento, foi efetuada a adição de 30% de PS de garanhões com alta motilidade pós-descongelamento (AURICH et al., 1996).

A dominância de determinados machos suínos, em relação a outros, na paternidade dos leitões, após fecundações heterospérmicas, pode estar relacionada com o maior período de sobrevivência *in vivo* dos seus espermatozóides (FLOWERS, SIGGENS e McLAREN, 1996) e deve-se, ao menos em parte, a um efeito do PS, uma vez que o número de leitões oriundos de um macho não-dominante foi maior quando os seus espermatozóides foram misturados com o PS de um macho dominante (FLOWERS, 1997). Em estudos posteriores, correlações foram verificadas, entre a concentração de duas proteínas específicas do PS e as taxas de penetração *in vitro* e a paternidade das leitegadas, após inseminações heterospérmicas (FLOWERS, 1998). Embora essas observações evidenciem o efeito do PS sobre a fertilidade, ainda não foi comprovado, na espécie suína, que os componentes do PS possam estar envolvidos com a sensibilidade da célula espermática ao resfriamento. Na espécie ovina, foi demonstrado que a adsorção de proteínas do PS revertem (BARRIOS et al., 2000) ou evitam (PÉREZ-PÉ, CÉBRIÁN-PÉREZ e MUIÑO-BLANCO, 2001) os danos na integridade da membrana espermática, causados pelo choque térmico. Assim, é provável que a variabilidade dos machos, em termos de sensibilidade espermática ao resfriamento, possa estar relacionada com a presença, ausência ou variação na concentração de determinadas proteínas protetoras presentes no PS. Mais estudos são necessários para

verificar se proteínas semelhantes às detectadas na espécie ovina estão também presentes nos suínos. Além disso, seria importante determinar qual a concentração do PS, ou de substâncias protetoras presentes no mesmo, necessárias para a ocorrência de efeito benéfico.

## CONCLUSÕES

Não foi possível reverter a maior sensibilidade ao resfriamento de espermatozóides suínos, após a ejaculação, com a adição de 10% do PS de machos com menor sensibilidade. A centrifugação utilizada durante o processamento para a troca do PS, entre machos com diferente sensibilidade ao resfriamento, teve efeitos deletérios sobre a motilidade e a integridade de membrana da célula espermática, sobretudo para os machos com maior sensibilidade ao resfriamento.

## REFERÊNCIAS

ASH, K.L.; BERGER, T.; HORNER, C.M.; FAMULA, T.R. Boar sperm plasma membrane protein profile: correlation with the zona-free hamster ova assay. **Theriogenology**, v.42, p.1217-1226, 1994.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.1531-1537, 2000.

BERGER, T.; CLEGG, E.D. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1295-1302, 1985.

FAZANO, F.A. T. **Zur Kryokonservierung von Ebersperma; verschiedene Verfahren zur Samenbehandlung und unterschiedliche Konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der Einfriergeschwindigkeit**. 1986. 89p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Hannover - Alemanha, 1986.

FLOWERS, W.L.; SIGGENS, K.; McLAREN, D.G. Paternity of pigs from sows bred with combinations of natural service (NS) and AI. **Journal of Animal Science**, v.74, p.223, 1996.

FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p.67-78, 1997.

FLOWERS, W.L. Boar fertility and artificial insemination. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998, Birmingham-England. **Proceedings.**, 1998. p.45-52.

GUTHRIE, H.D.; MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. The effect of seminal plasma and dilution rate on the motility and viability of frozen-thawed boar sperm. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Estolcomo-Suécia. **Abstracts.**, 2000. 310p. p.143.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescence probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.343-352, 1990.

HENAULT, M.A.; KILIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.199-204, 1996.

IWAMOTO, T.; TSANG, A.; LUTERMAN, M.; DICKSON, J.; LAMIRANDE, E.; OKUNO, M.; MOHRI, H.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.55-62, 1992.

KNÜPPEL, M. **Einfluß von Seminalplasma- und BSA-Zusatz in konserviertem Ebersperma auf die Spermienmotilität und Befruchtungsleistung.** 2000. 95p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Hannover - Alemanha, 2000.

KORDAN, W.; HOLODY, D.; ERIKSSON, B.; FRASER, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; STRZEZEK, J. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p. 347-354, 1998.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.34, n.4, p.691-700, 1990.

MOORE, H.D.M.; HALL, G.A.; HIBBITT, K.G.; Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.39-45, 1976.

ORTMAN, K; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. **Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.37-47, 1994.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.760, p.113-121, 2001.

PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425-434, 2001.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, n.2, p.278-283, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, p.528-531, 1973.

RATH, D.; NIEMANN, H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. **Theriogenology**, v.47, p.785-793, 1997.

SALAMON, S. Deep freezing of boar semen. III Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Science**, v.26, p.239-247, 1973.

SANDOVAL, J.L.; SCHEID, I.R.; BARIONI JR., W; MIES FILHO, A.; MARIANO, M.S. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on boar sperm following cold shock or deep freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p. 393, 1991.

SAS Institute (Cary NC) **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12, 1998.

STRZEZEK, J., TORSKA, J., BORKOWSKI, K., GLOGOWSKI, J., WYSOCKI, P., HOLODY, D. The biochemical characteristics of boar seminal plasma during high ejaculation frequency. **Reproduction in Domestic Animals**, v.30, p.77-84, 1995.

THÉRIEN, I; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.59, p.768-776, 1998.

Tabela 1 – Motilidade (MOT) e integridade de membrana (IM) de espermatozoides (sptz) de machos suínos menos (MES) ou mais (MAS) sensíveis ao resfriamento a 17°C, na presença de plasma seminal (PS) homólogo ou heterólogo (média ± desvio-padrão).

Tratamentos	Momento de avaliação da MOT (h)							Momento de avaliação da IM (h)			
	24	48	72	96	120	144	168	24	72	120	168
T1 (sptz MES + PS MES)	89 ± 4	87 ± 4	85 ± 5	81 ± 6	73 ± 9	63 ± 18	50 ± 20	79 ± 6	73 ± 12	69 ± 11	60 ± 14
T2 (sptz MES + PS MES)	88 ± 3	87 ± 3	84 ± 4	74 ± 16	59 ± 32	52 ± 32	34 ± 29	80 ± 8	69 ± 8	64 ± 17	40 ± 22
T3 (sptz MAS + PS MAS)	87 ± 7	68 ± 31	58 ± 34	36 ± 40	27 ± 41	24 ± 37	18 ± 29	85 ± 9	71 ± 9	51 ± 9	49 ± 17
T4 (sptz MAS + PS MAS)	76 ± 11	48 ± 34	41 ± 35	26 ± 29	7 ± 16	1 ± 2	0 ± 0	83 ± 4	63 ± 12	39 ± 21	31 ± 6
T5 (sptz MES + PS MAS)	89 ± 4	83 ± 14	75 ± 21	65 ± 29	40 ± 38	35 ± 37	28 ± 33	78 ± 10	67 ± 14	54 ± 16	43 ± 20
T6 (sptz MAS + PS MES)	78 ± 16	58 ± 32	44 ± 32	25 ± 32	12 ± 27	6 ± 18	1 ± 2	78 ± 6	58 ± 20	42 ± 20	25 ± 17
T2 + T5	88 ± 3	84 ± 11	79 ± 16	69 ± 24	50 ± 36	44 ± 3	31 ± 30	79 ± 9	68 ± 11	59 ± 17	42 ± 21
T4 + T6	78 ± 14	54 ± 32	43 ± 32	25 ± 31	11 ± 24	5 ± 16	0 ± 1	79 ± 6	59 ± 18	43 ± 20	27 ± 15
Contrastes	Nível de significância										
T1 vs T2	0,757	0,963	0,966	0,467	0,183	0,272	0,054	0,687	0,322	0,355	0,001
T1 vs T3	0,602	0,038	0,007	0,0003	0,001	0,004	0,005	0,104	0,656	0,027	0,178
T2 vs T5	0,757	0,493	0,216	0,276	0,071	0,073	0,423	0,414	0,632	0,122	0,673
T3 vs T4	0,031	0,076	0,164	0,476	0,235	0,141	0,172	0,601	0,283	0,251	0,056
T4 vs T6	0,517	0,276	0,721	0,966	0,700	0,674	0,931	0,214	0,396	0,710	0,453
(T2 + T5) vs (T1)	0,858	0,731	0,443	0,144	0,011	0,023	0,008	0,994	0,157	0,052	0,0004
(T4 + T6) vs (T3)	0,021	0,106	0,130	0,373	0,209	0,114	0,106	0,207	0,084	0,225	0,008

MES: machos com MOT  $\geq$ 60% nas 144h.

MAS: machos com MOT  $<$ 60% nas 72h.

T1 e T3 sem centrifugação; T2 e T4 com centrifugação e adição de PS homólogo; T5 e T6 com centrifugação e adição de PS heterólogo

### **5 ESTUDO 3**

## **FERTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO AVALIADA PELO TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES A UM SUBSTRATO SINTÉTICO**

# FERTILIDADE DE SÊMEN SUÍNO AVALIADA PELO TESTE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES A UM SUBSTRATO SINTÉTICO<sup>(1)</sup>

## BOAR SEMEN FERTILITY EVALUATED BY A SPERM-BINDING ASSAY TO A SYNTHETIC SUBSTRATE

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 percentual de espermatozóides ligados (PEL) foram avaliados nas 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 leitões foram inseminados, uma única 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 ( $P<0,05$ ). Nas 72 horas, o macho 3 apresentou PEL inferior ao dos outros três ( $P<0,05$ ). Os machos não diferiram quanto às taxas de clivagem (TC) e de embriões morfológicamente normais, 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:** Ligação espermatozóide-ovócito, Prosaposina, SBA

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em

Parte da tese de doutorado do primeiro autor

<sup>(2)</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, 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> Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, Instituto para Medicina da Reprodução, 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

## 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 at 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 ( $P<0.05$ ). At 72 hours, boar 3 showed a lower PSB ( $P<0.05$ ) than the other three 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 spermatoc concentration.

**Index terms:** Sperm-egg binding, Prosaposin, SBA

## INTRODUÇÃO

A estimativa visual da motilidade (COLENBRANDER e 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 e MOLLOVA, 1993; FAZELLI et al., 1995; FERREIRA, 1998), de penetração no ovócito (GADEA, MATÁS e LUCAS, 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, Cramer e Hammerstedt (1998), baseado na capacidade de ligação de espermatozóides 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, Cramer e Hammerstedt (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 espermatozóides ligados.

A grande variação que ocorre entre os ovócitos, quanto à capacidade de aderência da célula espermática (XU e 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 espermatozóides.

O teste SBA tem sido usado para identificar galos (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998) e perus (GILL et al., 1999) subférteis, bem como registrar diferenças nas populações de espermatozóides humanos e avaliar os danos espermáticos decorrentes do congelamento (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999). 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 espermatozóides à membrana perivitelina de aves, aumentaria a ligação e a fertilidade dos espermatozóides de touros (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999;

AMANN, SEIDEL JUNIOR e BRINK, 1999), cachaços (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999), perus (GILL, DONOGHUE e AMANN, 1999) e homens (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999; AMANN et al., 1999b).

O emprego do teste SBA ainda está restrito ao campo experimental, por causa do elevado custo do equipamento necessário para determinar o percentual de espermatozóides ligados ao substrato. No entanto, a sua praticidade de execução, quando comparado a outros testes que avaliam aspectos da interação espermatozóide-ovócito, justifica a obtenção de maiores informações em relação à 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 espermatozóides 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 espermatozóides 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 espermatozóides ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay), nas 5, 24, 48 e 72 horas de armazenamento. A MOT foi avaliada entre lâmina e lamínula, em microscópio óptico (160 x), 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 espermatozóides/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  $\mu$ L de cada uma das quatro STs, 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 STs 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 espermatozóides ligados (PEL) ao substrato do teste SBA foi determinado, em microscopia de fluorescência, e expresso por massa de proteína ligada, segundo Barbato, Cramer e Hammerstedt (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 delas 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, a qual 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 desenvolvimento das estruturas recuperadas foram avaliados sob estereomicroscópio (SUGIE, SEIDEL JUNIOR e HAFEZ, 1982) e pela coloração de núcleos, a qual foi efetuada usando uma solução de Hoechst na concentração de 50  $\mu$ g/mL de água bidestilada. A visualização dos núcleos foi efetuada em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365nm) 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 morfologicamente 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 freqüência de distribuição dos resultados do teste SBA, nos

quatro machos suínos, dentro dos quatro percentis, conforme Gill et al. (1999).

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

Logit (PEL=  $[\text{Ln}(P/1-P)]$ ), em que P é o percentual de espermatozóides ligados.

Após transformação, os dados referentes às taxas de recuperação, de clivagem e de embriões normais foram analisados pelo procedimento GLM (SAS, 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 espermatozóides e a MOT foram analisados como medidas repetidas pelo procedimento MIXED (SAS, 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 espermatozóides ligados (PEL) variaram de 0,05% a 8,97% ( $2,57\% \pm 0,18$ ) na concentração de 6,25 milhões de espermatozóides/mL, tendo sido inferiores ( $P < 0,01$ ) aos da concentração de 12,5 milhões de espermatozóides/mL, que variaram de 0,43% a 8,83% ( $2,74\% \pm 0,16$ ). Em perus, com o uso de sêmen in natura, maiores PELs ( $P < 0,05$ ) foram observados, utilizando 2 ou 4 milhões de espermatozóides/mL, em comparação às concentrações de 1, 6 ou 8 (GILL et al., 1999). Analisando o sêmen humano in natura, Amann, Hammerstedt e Shabanowitz (1999) observaram que diferenças no PEL, entre amostras, foram mínimas com o uso de concentrações maiores que 2 milhões de espermatozóides/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 espermatozóides, 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., 1999).

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, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999), a BSA aumentou o percentual de ligação espermática, no presente estudo. 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, no presente estudo, maiores percentuais ( $P < 0,05$ ) de espermatozóides 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 conseqüente alteração na permeabilidade desta, facilitando a capacitação espermática in vitro (YANAGIMASHI, 1989; VISCONTI et al., 2002). Assim, a facilitação da capacitação também poderia explicar a maior capacidade de ligação dos espermatozóides 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. (1999a) observaram, no sêmen in natura, CV de 31,0%, similar ao apresentado pelos machos 1 e 4 do presente trabalho. 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., 1999). 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 espermatozóides que pode ser satisfatória para a aplicação do teste SBA, nessa espécie.

Houve efeito ( $P = 0,027$ ) da interação entre o momento de avaliação 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., 1999).

Gill et al. (1999) descrevem a importância de utilizar um teste capaz de diferenciar os machos logo após a coleta do ejaculado. No presente trabalho, 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 de efetuar esse teste logo após a coleta do ejaculado.

Em relação à motilidade espermática, não foi verificada interação entre o momento de avaliação 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., 1999a).

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. (1999). 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.

No presente trabalho, 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 espermatozóides humanos (AMANN et al., 1999a), bovinos (AMANN, HAMMERSTEDT e SHABANOWITZ, 1999) ou de perus (GILL et al., 1999). Contudo, considerando a possibilidade de maior variabilidade em suínos, entre ejaculados de um mesmo macho, é provável que seja 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 ( $81,5 \pm 6,8$ ), 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 seria 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 pertencentes 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, 1999.

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, 1999.

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. 1999a.

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. 1999b.

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles 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, v.40, 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**. Hannover, Alemanha, 1998. 77f. 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 AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27., 1996, Nashville. **Anais**. Nashville: American 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.; 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, 1999.

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, 1999.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v.40, p.397-410, 1993.

MARTÍNEZ, 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. **SAS/STAT User's Guide**, Version 8, Cary, 1999. 1464p.

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.; 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.

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.

YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v 38, p.27-33, 1989. Supplement.

Tabela 1 - Percentuais de espermatozóides suínos (média  $\pm$  erro-padrão) ligados ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay) em diferentes momentos de avaliação das doses de sêmen resfriado<sup>(1)</sup>.

Macho	Momento de avaliação (horas)			
	5	24	48	72
1	3,99 $\pm$ 0,6Aa	3,57 $\pm$ 0,4Aab	1,92 $\pm$ 0,2Aab	3,75 $\pm$ 0,6Aa
2	2,70 $\pm$ 0,5Aa	2,63 $\pm$ 0,4Aab	1,88 $\pm$ 0,3Aa	2,80 $\pm$ 0,5Aa
3	1,86 $\pm$ 0,3Aa	2,01 $\pm$ 0,3Aa	1,60 $\pm$ 0,3Aa	0,84 $\pm$ 0,2Bb
4	4,17 $\pm$ 0,4Aa	4,84 $\pm$ 0,5Ab	4,71 $\pm$ 0,6Ab	3,68 $\pm$ 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.

Tabela 2 - Distribuição dos ejaculados de machos suínos conforme os percentuais de espermatozóides ligados ao substrato do teste SBA (Sperm-Binding Assay) situados nos quartis inferior (QI), intermediários (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
1	91,0 ± 4,9a (37–100)	3/14 21,4	11/14 78,6	79,0 ± 8,5a (0–100)	2/14 14,3	8/14 57,1	76,8 ± 8,8a (0–100)	2/14 14,3	7/14 50,0
2	88,3 ± 5,8a (11–100)	3/16 18,8	13/16 81,2	80,8 ± 8,2a (20–100)	4/16 25,0	11/16 68,8	71,3 ± 9,1a (11–100)	5/16 31,2	7/16 43,7
3	79,6 ± 8,3a (23–100)	5/15 33,3	10/15 66,7	59,3 ± 11,9a (0–100)	6/15 40,0	7/15 46,7	54,4 ± 11,7a (0–100)	8/15 53,3	6/15 40,0
4	86,8 ± 7,2a (20–100)	3/13 23,1	10/13 76,9	71,9 ± 9,1a (0–100)	4/13 30,8	6/13 46,1	64,0 ± 10,2a (0–100)	4/13 30,8	4/13 30,8

<sup>(1)</sup> QI = ≤25%; QS = ≥75%. <sup>(2)</sup> Valores expressos em percentual ± 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.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos aspectos a serem salientados é a diferença observada nas respostas dos ejaculados de um mesmo macho, tanto na manutenção da motilidade espermática (Estudo 1; Tabela 2) como na resposta ao teste SBA (Estudo 3; Tabela 2). Esta variação entre ejaculados, na manutenção da motilidade, foi também observada em outra avaliação envolvendo 22 machos (11 a 16 ejaculados/macho) escolhidos do plantel de uma CIA, de forma aleatória, para as características seminais, e analisados durante 10 meses (REIS et al., 2001). Considerando a variabilidade também observada com o teste de hemizona (FERREIRA, 1998) e com o teste SBA (Amman - comunicação pessoal), esta parece ser uma característica comum, na espécie suína. Benson et al. (1967) reportaram uma maior variação entre os machos do que entre os ejaculados do mesmo macho. No entanto, em seu estudo, o sêmen foi avaliado apenas durante 5h de manutenção a 38°C, talvez não podendo ser comparado diretamente às avaliações efetuadas durante um tempo maior de armazenamento, como foi o caso do Estudo 1, do presente trabalho. De fato, foi observado que o coeficiente de variação para os ejaculados do mesmo macho foi aumentando à medida que aumentou o tempo de armazenamento, coincidindo com os momentos em que os machos eram classificados (Estudo 1; Tabela 3).

As razões pelas quais os diferentes ejaculados de um mesmo macho apresentam variação na manutenção da motilidade, durante o resfriamento, ainda não são conhecidas. Considerando que espermatozoides ejaculados adquirem maior sensibilidade ao choque térmico ao percorrerem os túbulos epididimários, segundo Watson (1995), a diferença na frequência de coletas e a duração do trânsito espermático no epidídimo poderiam contribuir para a variação dos ejaculados de um mesmo macho. A variação entre ejaculados de um mesmo macho também foi observada na capacidade dos espermatozoides em se ligar à zona pelúcida, levando Harrison (1997) a apresentar a hipótese de que a presença de espermadesinas esteja envolvida, o que denotaria, diferenças na composição do plasma seminal de um ejaculado para outro. Embora não se saiba se as espermadesinas estão ou não envolvidas com a sensibilidade ao resfriamento, Centurion et al. (2002) constataram que a adição de 7,5mg/mL de espermadesina PSP I-II, derivada do plasma seminal de suínos, aumentou a motilidade, a viabilidade e a atividade mitocondrial de espermatozoides submetidos a altas diluições para processamento em citometria de fluxo.

A diferença de resposta entre ejaculados de um mesmo macho revela a dificuldade em efetuar uma classificação dos machos conforme a sensibilidade ao resfriamento, um dos objetivos do primeiro estudo do presente trabalho. No entanto, se esta parece ser uma característica inevitável, mesmo que a classificação possa não ser aquela em que 100% dos ejaculados apresentam o nível desejado de resposta à avaliação em questão, sugere-se que o bom senso norteie a decisão de descartar ou não um macho, bem como de utilizá-lo ou não em situações de inseminação estratégica.

Reduções na qualidade espermática podem ser transitórias e, além de relacionadas a algum problema do macho, também podem ocorrer devido a alterações resultantes da ação deletéria de fatores internos nas CIAs e não do macho. Por isto, os possíveis fatores associados a falhas na coleta e processamento do ejaculado até o armazenamento da dose de sêmen não devem ser desconsiderados por ocasião da classificação dos machos.

Uma estratégia que pode ser utilizada, para tornar a avaliação dos machos menos trabalhosa, nas CIAs, seria a de avaliar a motilidade, durante o armazenamento a 17°C, somente em alguns momentos e não diariamente. Avaliações em momentos estratégicos, como no terceiro e sexto dia, por exemplo, facilitariam a separação entre machos de longa e curta manutenção da motilidade espermática *in vitro*, os dois grupos que mostraram diferenças mais marcantes, ao longo do armazenamento. Mesmo que haja uma variação entre os ejaculados, machos que apresentam três ou mais de seus ejaculados, dentro de um total de cinco ejaculados avaliados, com menor manutenção da motilidade espermática poderiam ser descartados, implicando numa garantia da qualidade do sêmen processado. Além disto, a utilização preferencial de machos com longa manutenção da motilidade espermática *in vitro* poderia ser benéfica pelo fato de pesquisadores terem observado correlação entre a motilidade avaliada aos sete dias de armazenamento e a fertilidade (XU et al., 1996b; JUONALA et al., 1998).

Apesar de não ter sido observada reversão da capacidade de manutenção da viabilidade espermática durante o resfriamento, pela troca do plasma seminal entre machos de diferentes sensibilidades ao resfriamento (Estudo 2; Tabela 1), seria precipitado afirmar que o PS não tem nenhuma participação nesse evento. As descobertas efetuadas recentemente, em ovinos, de que há uma fração do PS capaz de proteger espermatozóides expostos a baixas temperaturas (BARRIOS et al., 2000; PÉREZ-PÉ, CEBRIÁN-PÉREZ e

MUIÑO-BLANCO, 2001), abre a possibilidade de que investigações semelhantes sejam efetuadas na espécie suína. Caso se confirme a existência desta fração protetora, a sua identificação e purificação poderiam significar um passo importante na otimização dos protocolos de resfriamento e congelamento de sêmen suíno. Também poderia ser investigado se há diferenças entre machos, na presença ou produção desta fração, e se a mesma seria ou não a responsável pelas diferenças de sensibilidade ao resfriamento.

As diferenças entre machos foram constatadas, no presente trabalho, tanto no que diz respeito à sensibilidade ao resfriamento (Estudo 1), bem como na capacidade de ligação do espermatozóide ao substrato sintético do teste SBA (Estudo 3). Estas observações confirmam a de outros autores, em relação ao resfriamento (MARIANO, 1988; WABERSKI et al., 1991; PAULENZ, KOMMISRUUD e HOFMO, 2000). Se forem considerados testes que avaliam a interação espermatozóide-ZP, as diferenças observadas entre os machos, para o teste SBA (Estudo 3), também foram detectadas em testes como o da hemizona (FAZELLI et al., 1995a; FERREIRA, 1998) e de fecundação *in vitro* (MARTINEZ et al, 1993; XU et al., 1996ab/98). De um modo geral, isto comprova que machos que são, aparentemente, semelhantes para alguns parâmetros como motilidade ou morfologia espermática podem apresentar diferenças em outros parâmetros de avaliação de seus espermatozoides.

Quando estas diferenças entre machos aparecem nos testes efetuados *in vitro*, um dos principais objetivos é verificar se há uma correlação entre os mesmos e a fertilidade *in vivo*. No entanto, apesar dos esforços em encontrar um teste ou avaliação que permita prever a fertilidade dos machos, os resultados obtidos ainda não são consistentes. Uma predição exata da fertilidade seria de grande valor prático e econômico (WOELDERS, 1991; GADEA, MATÁS e LUCAS, 1998) pois, alguns machos, embora subfêrteis, podem ser aprovados nas avaliações rotineiras da qualidade seminal, e acabam sendo usados na IA (JUONALA et al., 1998). Para que um teste seja aprovado como preditor da fertilidade, a sua correlação com os dados *in vivo* deve ser elevada e, segundo Rodriguez-Martinez e Eriksson (2000), ser derivada da IA de centenas de fêmeas, método seguro, mas de custo elevado. Por isto, a investigação nesta área tenta descobrir métodos alternativos, ou pelo menos complementares, de avaliação seminal *in vitro*. Além do grande número de fêmeas necessário, a quase inexistência de dados retrospectivos da fertilidade dos machos, esta

devido ao amplo uso de inseminações heterospérmicas, dificultam a interpretação das respostas verificadas *in vitro*. A subfertilidade de alguns machos, talvez revelada por uma avaliação *in vitro*, poderia também estar sendo mascarada, *in vivo*, pelo emprego de doses inseminantes com elevado número de espermatozóides (FERREIRA, 1998). A criação de condições mais limitantes aos espermatozóides como, por exemplo, a redução do número de espermatozóides por dose, possa, talvez, aumentar a correlação entre os resultados obtidos *in vitro* e os *in vivo*.

Para evitar a realização de um número elevado de avaliações seminais, é comum investigar se os parâmetros avaliados se correlacionam ou não, na tentativa de utilizar os testes de execução mais simples, mas, mesmo assim, reveladores da qualidade espermática. No entanto, a correlação entre parâmetros seminais pode ser inexistente, baixa (Estudo 3) ou ser significativa somente após um período de armazenamento *in vitro* (Estudo 1; Tabela 7). Pelo fato do espermatozóide ser uma célula complexa, com múltiplas funções, alguns aspectos podem ser avaliados por um determinado teste, mas não por outro (JEYENDRAN e ZANEVELD, 1993), o que implica em não descartar um teste apenas por não ter apresentado correlação significativa com outro.

Quando a correlação dos resultados *in vitro* e *in vivo* é esperada, de modo a escolher um teste para prever a fertilidade, o problema é mais complexo ainda. Quando uma boa correlação não é observada, o teste em questão é descartado, mesmo que ele possa ser um indicador válido da atividade de uma das organelas espermáticas (JEYENDRAM e ZANEVELD, 1993). Segundo Graham (2001), diversos aspectos do espermatozóide devem estar em perfeita ordem para ser capaz de fecundar um oócito, podendo o mesmo ser infértil por uma alteração em qualquer um deles. Quando somente um atributo da célula é avaliado, o percentual de espermatozóides “férteis” é superestimado (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993), o que resulta em baixa correlação com a fertilidade (GRAHAM, 2001). Contudo, ao utilizar os resultados obtidos de múltiplos testes espermáticos, altas correlações com o potencial fecundante da amostra seminal podem ser esperadas (JEYENDRAM e ZANEVELD, 1993; GRAHAM, 2001; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ e ERIKSSON, 2000). Assim, a eliminação de machos subférteis, antes que seu sêmen seja utilizado em programas de IA, não é impossível, mas deve basear-se na avaliação combinada de testes

laboratoriais e medidas apropriadas de fertilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ e ERIKSSON, 2000).

Por ser a fecundação um processo multifatorial fica lógico que a combinação dos resultados de diversos testes, os quais avaliam diferentes parâmetros ou atributos da célula espermática necessários para a fecundação, resultaria em uma maior correlação, entre os resultados de todos os testes e a fertilidade *in vivo* (AMANN, 1989). Entretanto, as dificuldades nas avaliações múltiplas dos vários aspectos funcionais do espermatozóide têm sido o tempo e o custo requeridos para a sua realização (GRAHAM, 2001). Dessa forma, tem sido comentada a necessidade de encontrar testes *in vitro* correlacionados com a fertilidade, e que possam avaliar simultaneamente diversos atributos da célula espermática (GRAHAM, 2001).

Um dos principais problemas com o desenvolvimento e a validação de novos testes de avaliação espermática reside no fato de que não há uma metodologia bem definida de avaliação, sendo comum a utilização de vários protocolos e técnicas, muitos dos quais não apropriados ou mal interpretados (JEYENDRAM e ZANEVELD, 1993). No que se refere ao teste SBA (Estudo 3), foi demonstrado que o percentual de ligação ao substrato sintético foi influenciado pela concentração espermática e pela presença de BSA. Isto indica que o efeito destes fatores, além de outros possíveis, deve ser considerado para determinar as condições adequadas de realização do teste, de modo que o mesmo revele as possíveis diferenças existentes na fertilidade dos machos suínos.

A possibilidade de haver condições mais uniformes quanto ao substrato de ligação e a ausência da seleção de espermatozoides, quando comparado a outros testes como os de penetração ou fecundação *in vitro*, tornam o teste SBA um bom candidato para a continuidade dos estudos, como preditor da fertilidade, na espécie suína.

## 7 REFERÊNCIAS

ALMOND, G.W.; BRITT, J.H.; CARR, J.; FLOWERS, W.; GLOSSOP, C.; MORROW, M.; SEE, T. The AI Book. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine. 1994. 108p.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, p.89-98, 1989.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, n.6, p.397-406, nov. 1993.

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**, v.20, n.1, p.34-41, jan. 1999.

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

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**, v.20, n.5, p.648-654, sept. 1999a.

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**, v.20, n.5, p.655-660, sept 1999b.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791-797, 1996.

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

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.3, p.1531-1537, 2000.

BENSON, R.W.; PICKETT, B.W.; KOMAREK, R.J.; LUCAS, J.J. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. **Journal Animal Science**, v.26, n.5, p.1078-1081, 1967.

BERGER, T.; CLEGG, E.D. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1295-1302, 1985.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, Ivo. Viabilidade técnica e econômica da inseminação artificial (IA) em suínos: pontos críticos da IA. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA. 3., 1998, São Paulo. **Anais**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1998. p.101-111.

BUTLER, W.J.; ROBERTS, T.K. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43, p.183-187, 1975.

CALVETE, J.C.; ENSSLIN, M.; MBURU, J.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P.; ADERMANN, K.; WABERSKI, D.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WEITZE, K.F.; EINARSSON, S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 735-742, 1997.

CENTURION, F.; VAZQUEZ, J.M.; PARILLA, I.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ROCA, J.; LUCAS, X.; MARTINEZ, E. Effect of seminal plasma spermadhesins PSP I-II on motility, viability and mitochondrial activity of highly diluted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.689, 2002.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T.; PIZZI, F.; SURAI, P.; NOBLE, R. Relationship between lipid composition and viability of boar spermatozoa after freezing/thawing. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000a. p.240.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal of Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000b.

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

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.; FEITSMA, H.; WOELDERS, H. Semen quality assessment, present and future. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.35-41.

DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.95-104. 1991.

FAZANO, F.A. T. Zur Kryokonservierung von Ebesperma; verschiedene Verfahren zur Samenbehandlung und unterschiedliche Konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der Einfriergeschwindigkeit. 1986. 89p. Tese (Doutorado em Reprodução) – Tierärztliche Hochschule, Hannover, Alemanha.

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**, v.44, p.17-27, 1995a.

FAZELLI, A.R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.M.; VAN DEN BROEK, J.; BRACHER, V.; PARLEVLIT, J.; COLENBRANDER, B. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. **Theriogenology**, v.44, p.751-760, 1995b.

FAZELLI, A.R.; ZHANG, B.R.; STEENWEG, W.; LARSSON, B.; BEVERS, M.M.; VAN DEN BROEK, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; COLENBRANDER, B. Relation between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.48, p.853-863; 1997.

FERREIRA, F.M. Functional aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. 1998. 77p. Tese (Doutorado em Reprodução) – Tierärztliche Hochschule, Hannover, Alemanha.

FLOWERS, W.L. Management of boars for efficient semen production. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p.67-78, 1997.

FLOWERS, W.L. Boar fertility and artificial insemination. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham-England. **Proceedings...** Birmingham: [s.n.], 1998. p.45-52.

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

GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.M.G.; LOPES-CARDOZO, M. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. **Biology of Reproduction**, v.48, p.483-489, 1993.

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**, v.78, p.1208-1218, 1999.

GILL, S.P.S.; DONOGHUE, A.M.; AMANN, R.P. Exposure of turkey sperm to a synthetic peptide before insemination increases fertility. **Poultry Science**, v.79, p.426-429, 2000.

GLOSSOP, C. Semen collection, evaluation and handling. In: SWINE REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1996. **Proceedings**. [S.l.]: American College of Theriogenologists and Society for Theriogenology and American Association of Swine Practitioners, 1996. p.7-14.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v.41, p.1151-1162, 1994.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

GÜTHRIE, H.D.; MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. The effect of seminal plasma and dilution rate on the motility and viability of frozen-thawed boar sperm. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Estolcomo-Suécia. **Abstracts**. Estolcomo: [s.n.], 2000. p.143.

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

HAMMERSTEDT, R.H.; CRAMER, P.G.; BARBATO, G.F.; AMANN, R.P.; O'BRIEN, J.S.; GRISWOLD, M.D. A fragment of prosaposin (SGP-1) from rooster sperm promotes sperm-egg binding and improves fertility in chickens. **Journal of Andrology**, v.22, n.3, p.361-375, 2001.

HARRISON, R.A.P. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 52, p.195-211, 1997.

HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L. Behavior responses affecting gilt and sow reproduction. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 40, p.343-354, 1990.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J.F.; GRIEL JR., L.C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.52, p.390-397, 1995.

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.199-204, 1996.

HUGHES, P.E. Factors affecting the natural attainment of puberty in the gilt. In: COLE, D.J.A.; FOXCROFT, G.R. **Control of Pig Reproduction I**. Butterworth Scientific, 1982, p.117-138.

IVANOVA, M.; MOLLOVA, M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. **Theriogenology**, v.40, p.397-410, 1993.

IWAMOTO, T.; TSANG, A.; LUTERMAN, M.; DICKSON, J.; LAMIRANDE, E.; OKUNO, M.; MOHRI, H.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.55-62, 1992.

JEYENDRAN, R.S.; ZANEVELD, L.J.D. Controversies in the development and validation of new sperm assays. **Fertility and Sterility**, v.59, n.4, p.726-728, 1993.

JOHNSON, L.A.; MAXWELL, W.M.C.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R. Staining sperm for viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.37-47, 1996.

JUONALA, T.; LINTUKANGAS, S.; NURTTILA, T.; ANDERSSON, M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. **Reproduction Domestic in Animals**, v.33, p.155-158, 1998.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KORDAN, W.; HOLODY, D.; ERIKSSON, B.; FRASER, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; STRZEZEK, J. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p. 347-354, 1998.

LARSSON, K.; EINARSSON, S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa: influence of thawing diluents and of boars. **Acta Veterinaria Scandinava**, v.17, p.43-62, 1976.

MARIANO, M.S. Características biológicas e bioquímicas do sêmen suíno com diferentes resistências à conservação no estado líquido e ao congelamento. 1988. 72f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

MARTÍNEZ, 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**, v.40, p.547-557, 1993.

MARTÍNEZ, E.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; BLANCO, O.; LUCAS, X.; MATAS, C.; GILL, M.A. Relationship between homologous *in vitro* penetration assay and boar semen fertility. **Theriogenology**, v.49, p.371, 1998.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v.10, p.433-440, 1998.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

MOORE, H.D.M.; HIBBITT, K.G. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p.349-352, 1977.

OHATA, P.M. A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno. 2001. 81f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

PAULENZ, H.; KOMMISRUUD, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.35, p.83-87, 2000.

PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T; Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425-434, 2001.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACEK, G.B. Acrossome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, n.2, p.278-283, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.35, p.580, 1972.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, n.2, p.528-531, 1973.

RATH, D.; NIEMANN, H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. **Theriogenology**, v.47, p.785-793, 1997.

REIS, G.R.; WOLLMANN, E.B.; OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, Ivo; BORCHARDT NETTO, G.; MENDONÇA, F. Seleção de machos suínos de acordo com a motilidade espermática após conservação a 17°C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Comissão Científica do X Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.233-234.

ROCA, J.; LUCAS X.; GIL, M.A.; VÁZQUEZ, J.M.; CARVAJAL, G.; MARTÍNEZ, E.A. Motility and *in vitro* penetrating ability of cooled and frozen-thawed spermatozoa from identical boars. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.260.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P.; CALVETE, J.J. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound *in vivo* to the zona pellucida. **Reproduction Fertility and Development**, v.10, p.491-497, 1998.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ERIKSSON, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB "INSEMINAÇÃO

ARTIFICIAL EM SUÍNOS”, 3., 2000, Flores da Cunha. **Anais**. Porto Alegre: Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.13-33.

SALAMON, S. Deep freezing of boar semen. III Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Australian Journal of Biological Science**, v.26, p.239-247, 1973.

SANDOVAL, J.L.; SCHEID, I.R.; BARIONI JR., W; MIES FILHO, A.; MARIANO, M.S. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on boar sperm following cold shock or deep freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p. 393, 1991.

SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; GABIUS, H.J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadgesins in fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.35, p.37-43, 1993.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.35-52, 1992.

TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Effect of time, temperature and seminal plasma on the development of resistance to cold shock in boar spermatozoa. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, [S.l.]. **Proceedings**. [S.l.: s.n.], 1992. p.430.

TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: struture-function correlations of boar spermadhesins. **Journal Reproduction and Fertility**, Supplement 50, p. 55-61, 1996.

TÖPFER-PETERSEN, E.; SINOWATZ, F.; HEIN, S.; DOSTOLAVA, Z.; SCHWARTZ, P.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; HETTEL, C. The state of art and new concepts in gamete recognition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.3-11.

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**, v.33, p.267-270, 1998.

WABERSKI, D.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; WILLMEN, T. Effect of semen quality on fertility results of stored liquid boar semen – a field trial. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.375-378, 1991.

WATSON, P.F. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F.; GREEN, C.E. Cooling and capacitation of boar sperm: what do they have in common? In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 1999, Beltsville. **Proceedings**. Lawrence: Allen Press, 2000. p.53-60.

WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; WENTZ, Ivo; SESTI, L.A.C.; SOBESTIANSKY, J. Aspectos sanitários relacionados com o reprodutor. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, Ivo; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. **Suinocultura Intensiva - Produção, Manejo e Saúde do Rebanho**. Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, 1998. cap. 9, p.199-208.

WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement 1, p.145-164, 1991.

XU, X.; DING, J.; SETH, P.C.; HARBISON, D.S.; FOXCROFT, G.R. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. **Theriogenology**, v.45, p.745-755, 1996a.

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**, v.46, p.1325-1337, 1996b.

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 Animal Science**, v.76, p.3079-3089, 1998.