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

"USO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA DETERMINAR A ASSOCIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS SUÍNOS COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS"

ALINE BEATRIZ HEINEN PRATES KUMMER

PORTO ALEGRE
2012

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

"**USO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA DETERMINAR A ASSOCIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS SUÍNOS COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS**"

Autor: Aline Beatriz Heinen Prates Kummer

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução Animal

Orientador: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo

PORTO ALEGRE
2012

Aline Beatriz Heinen Prates Kummer

USO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA DETERMINAR A ASSOCIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS SUÍNOS COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS.

Aprovado em 09 de Março de 2012.

APROVADO POR:

_____

Fernando Pandolfo Bortolozzo
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Carine Dahl Corcini
Membro da Comissão

_____

Paulo Eduardo Bennemann
Membro da Comissão

_____

Eneder Oberst
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Alan Paulo e Ilse, pelo exemplo de dedicação fraternal, pelas orações e pelo amor incondicional a mim dispensado, não agora, mas durante toda minha vida, e aos meus irmãos: - Lilian Lucilowa e Marcos Vinícius, simplesmente por fazerem parte da minha vida. Não tenho como dizer obrigado por tudo, então digo que os amo muito.

Ao meu esposo Rafael, que tem sido meu suporte, meu companheiro, minha luz nos dias escuros, minha certeza nos momentos de dúvidas. Minha inspiração e exemplo de vida que tem dado a minha um sentido especial. Com todo meu amor dedico esta conquista. Embora a distância geográfica existisse, saiba que nunca me senti sozinha.

À minha cunhada Pâmela pelo convívio e amizade nestes quase dois anos, por abrir a porta da casa dela e me receber tão carinhosamente.

Ao meu orientador, Prof. Fernando P. Bortolozzo, pela confiança em mim depositada, pela ajuda, pela amizade e pelo exemplo de ética, profissionalismo e competência. Aos meus co-orientadores, Prof. Ivo Wentz e Prof. David Barcellos, pelos ensinamentos e amizade, e em especial a minha co-orientadora incansável trabalhadora Prof[a]. Mari Lourdes Bernardi, pelo exemplo de dedicação, inteligência e boa vontade, pela amizade, paciência, pelo grande auxílio na redação desta dissertação e pelos dedicados ensinamentos estatísticos quase impossíveis de serem compreendidos, meu MUITO OBRIGADO!

Ao Dr. George Foxcroft pela inspiração e motivação deste projeto e por todas as orientações, sugestões e também pela amizade fortalecida neste percurso.

A Prof[a]. Connie pelos ensinamentos e apoio estatístico neste trabalho.

Aos amigos e colegas **THAÍS**, **EDUARDO**, Maria Clara e Carolina, pela amizade e pelo comprometimento e auxílio durante os experimentos.

Aos amigos e colegas da pós-graduação: em especial a Natalha, João e Paulo pelo exemplo pessoal e profissional, pela amizade, confiança e conhecimentos compartilhados, meu muito obrigado! Também ao Thomas, Diogo M, Renato, Regislaine, Thaís, Mellagi, Rafael, Pedro, Cristina, Diogo F, Maria Clara, Mariana, Sato, Karine e a todos os bolsistas e estagiários do Setor de Suínos que participaram da minha formação profissional e pessoal durante esses dois anos de convívio. Já sinto saudades!

A Master Agroindustrial, por todo apoio, suporte e credibilidade. Principalmente aos amigos da Unidade Master V, pela amizade, auxílio, comprometimento e pelo exemplo de um

trabalho em equipe. As amigas que fiz Marinês e Dionara, pela amizade, companheirismo e compreensão nas horas de aperto no CPS, assim como os trabalhos de fins de semana. A todos, meu muito obrigado pela ajuda e acima de tudo pela maneira carinhosa que sempre me receberam.

A Minitub do Brasil, Agroceres PIC e Danbred pelo apoio técnico, financeiro e crescimento profissional que me propuseram.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta aspiração.

"*Busquei o conhecimento e encontrei exemplos. Aprendi com estes Mestres, valores que agregaram muito enquanto profissional e enquanto ser humano*".

RESUMO

USO DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA DETERMINAR A ASSOCIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO DE MACHOS SUÍNOS COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS.

Autor: Aline Beatriz Heinen Prates Kummer
Orientador: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Co-orientadores: Prof. Ivo Wentz
Prof[a]. Mari Lourdes Bernardi

A aplicação de novos sistemas para medir as características de deslocamento espermático e sua associação com a fertilidade vem apresentando um crescimento recente. *Computer-assisted semen analysis* (CASA) permite uma avaliação padronizada das características da motilidade espermática e é plausível que a combinação destes parâmetros com as características morfológicas seminais possam estimar a fertilidade do ejaculado. O desempenho reprodutivo (taxa de parto - TP e número de leitões nascidos totais - NT) de 14 reprodutores suínos foi obtido a partir de um experimento conduzido em uma granja comercial com fêmeas multíparas utilizando inseminação homospérmica com deposição intra-cervical e dois bilhões de espermatozoides móveis por dose inseminante. Durante 10 semanas, as fêmeas (n=948) foram inseminadas e igualmente distribuídas entre os machos testados de acordo com a ordem de parto, média do histórico de leitões nascidos, escore de condição corporal, intervalo desmame-estro (IDE), duração da lactação e número de leitões desmamados. Características da motilidade espermática, avaliadas pelo sistema CASA *in natura* e durante armazenamento a 17°C por 240h, e os defeitos morfológicos avaliados no sêmen *in natura*, foram incluídas na análise para determinar quais parâmetros espermáticos foram importantes para discriminar o potencial reprodutivo dos ejaculados desses machos. Os dados foram submetidos à análise multivariada que incluiu procedimentos estatísticos tais como: análises de cluster, canônica e discriminante. Dentre os 14 machos avaliados, 4 clusters foram formados com base nos resultados reprodutivos. Um macho, com menor resultado de TP e NT (89,7% e 11,98) e dois machos, com os maiores valores de TP e NT (97,8% e 14,16) foram alocados em diferentes grupos. Os demais machos foram separados em outros dois grupos distintos (4 e 7 machos), incluindo machos com valores semelhantes de NT (12,64 e 13,22) mas divergentes na TP (95,9% vs. 91,8%). A análise canônica permitiu separar os grupos, sendo a melhor separação observada entre o grupo menos fértil e os demais. As características seminais que demonstraram melhor capacidade de discriminação dos grupos incluíram motilidade espermática total, motilidade progressiva, amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática, além das características morfológicas tal como a presença de gota citoplasmática. A análise multivariada discriminante permitiu classificar corretamente mais de 80% dos 140 ejaculados avaliados em seus respectivos grupos. A análise multivariada pode ser uma eficiente ferramenta estatística na discriminação do potencial reprodutivo de cachaços.

Palavras-chave: cachaço, CASA, defeitos espermáticos, fertilidade, motilidade.

ABSTRACT

USE OF MULTIVARIATE ANALYSES TO DETERMINE THE ASSOCIATION OF BOAR FERTILITY WITH SEMEN TRAITS.

Author: Aline Beatriz Heinen Prates Kummer
Advisor: Prof. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Co-advisors: Prof. Ivo Wentz
Prof. Mari Lourdes Bernardi

The application of new approaches that measure certain sperm motion characteristics and their association with boar fertility has shown a recent increase. Computer-assisted semen analysis (CASA) offers standardized assessment of multiple sperm motion parameters and it is plausible that the combination of these parameters with morphological sperm defects may indicate the fertility potential of boars. The fertility outcome (farrowing rate - FR and number of total piglets born - TB) of 14 boars was obtained from a field trial conducted in a commercial farm using multiparous sows through single sire mating with two billion motile sperm cells per AI dose. Sows (n=948) bred were equally distributed among boars according to parity, mean lifetime number of piglets born, body condition score, weaning-to-estrus interval, lactation length and number of weaned piglets during 10 weeks of breeding period. Sperm motion parameters evaluated with CASA system in natura and in semen stored at 17°C for 240h in addition to morphological sperm defects, measured at the collection day, were included in the analysis to determine which semen traits were important to discriminate the fertility potential of ejaculates from these boars. The data underwent multivariate statistical analysis, including cluster, canonical and discriminant analyses. Among the 14 evaluated boars four clusters were formed based on fertility outcome. One boar, with the lowest FR and TB values (89.7% and 11.98), and two boars, with the highest FR and TB values (97.8% and 14.16), were placed in different clusters. The others boars were separated in two new distinct clusters (4 and 7 boars), including boars with intermediate TB (12.64 and 13.22) but divergent values of FR (95.9% vs. 91.8%). Canonical analysis was able to separate the individual ejaculates into the previously clustered boars and a better separation was shown between the lowest fertility group and the others. Semen traits which had higher discriminatory power included total motility, progressive motility, amplitude of lateral head displacement, analyzed during semen storage, and sperm morphological defects such as cytoplasmatic droplets. The multivariate discriminant analysis showed that more than 80% of the 140 ejaculates were correctly classified into their own group. The multivariate analysis can be an efficient statistical tool to improve the discrimination of potential fertility of boars.

Keywords: *boar, CASA, fertility, sperm defects, sperm motility.*

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas na Revisão Bibliográfica		Página
Tabela 1	Resultados de testes *in vitro* para a estimativa da fertilidade *in vivo*	23

Tabelas inseridas no Artigo Científico		
Table 1	Farrowing rate and number of total piglets per boar	42
Table 2	Farrowing rate and number of total piglets born per group of boars	44
Table 3	Semen traits used to separate boar groups using discriminant analysis	47
Table 4	Percentage of ejaculates classified in each group of boars	48
Table 5	Morphological and motility seminal traits of the groups of boars (LSmeans ± SEM)	49

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas no Artigo Científico		Página
Figura 1	Tree diagram of distances between boars	43
Figura 2	Graphical representation of variables used in the separation of boar groups from gradual discriminant analysis	45
Figura 3	Standardized canonical means for groups of boars and canonical representation of individual ejaculates of each group	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 Doador de sêmen 12
2.2 Fatores relacionados ao desempenho reprodutivo do cachaço 14
2.2.1 Fatores espermáticos associados ao reprodutor 14
2.2.2 Fatores espermáticos associado ao processamento do ejaculado 16
2.2.3 Fatores genéticos 19
2.2.4 Fatores relacionados à qualidade da matriz e do processo de inseminação 20
2.3 Métodos *in vitro* para avaliação da fertilidade do reprodutor 22
2.4 Métodos *in vivo* para avaliação da fertilidade do reprodutor 25
2.5 Aplicações do sistema CASA para avaliação da fertilidade do reprodutor 27
3 ARTIGO 30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 53
REFERÊNCIAS 55

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da inseminação artificial (IA) a eficiência reprodutiva em rebanhos suínos é altamente dependente da capacidade fecundante dos espermatozoides dos doadores de sêmen em centrais de inseminação artificial (CIA). Estima-se que 15-20% dos reprodutores apresentam fertilidade sub-otimizada, os quais atendem os padrões pré-estabelecidos de qualidade do ejaculado (>70% motilidade total e <30% defeitos morfológicos) (Flowers, 1997; Alm et al., 2006), entretanto resultam em desempenho reprodutivo insatisfatório (FOXCROFT, informação pessoal). A avaliação rotineira dos ejaculados utilizados para a preparação das doses inseminantes (DI), como motilidade e morfologia espermática, têm possibilitado o descarte de ejaculados de baixa qualidade e reduzida capacidade fecundante. No entanto, estas avaliações não tem sido capazes de identificar os reprodutores cuja fertilidade está sub-otimizada (POPWELL & FLOWERS, 2004). A dificuldade em identificar este grupo de reprodutores é devido à grande similaridade dos resultados de testes *in vitro* entre os reprodutores férteis e aqueles considerados sub-férteis, não havendo ainda métodos simples e rápidos que sejam adequados para o uso rotineiro (POPWELL & FLOWERS, 2004; BORTOLOZZO et al., 2008; WABERSKI et al., 2011b). Associado a isso, o alto número de células espermáticas utilizadas por fêmea coberta (9 bilhões de espermatozoides/estro) e o uso de *pool* de sêmen (mistura de 2 ou mais ejaculados) de machos que apresentam diferentes graus de fertilidade tem mascarado o real problema devido ao efeito compensatório do número excessivo de células espermáticas na DI (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001) e o desconhecimento da paternidade da leitegada (STAHLBERG et al., 2000). Porém, a redução do número de espermatozoides por dose ou por fêmea inseminada associado ao uso de IA homospérmica pode evidenciar tanto machos com baixa fertilidade, como aqueles com fertilidade superior, que passariam despercebidos empregando IA heterospérmica e doses com o número tradicional de espermatozoides (FOXCROFT et al., 2008; DYCK et al., 2011).

Ao se avaliar a taxa de parto e o tamanho da leitegada proveniente de IA homospérmica é possível analisar retrospectivamente o desempenho reprodutivo do cachaço (FOXCROFT et al., 2010; DYCK et al., 2011). Porém, o alto custo para testar a fertilidade *in vivo* e a demora em obter a informação a respeito da fertilidade dos machos tem impulsionado estudos que buscam métodos de avaliação *in vitro*. Entretanto, os

resultados encontrados tem sido controversos e poucos trabalhos têm detectado valores altos de correlação entre características seminais e a fertilidade *in vivo* (FLOWERS, 2002; GADEA et al., 2004; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006; BROEKHUIJSE et al., 2011a). A identificação do grau de fertilidade dos reprodutores por meio de uma metodologia *in vivo* torna-se essencial quando o objetivo é conhecer o potencial reprodutivo do cachaço, uma vez que esta metodologia comporta todos os atributos fisiológicos e funcionais, além da completa interação entre o espermatozoide, o trato reprodutivo feminino e o oócito (FLOWERS, 2002). A associação da fertilidade *in vivo* com parâmetros espermáticos, utilizando um modelo estatístico multivariado, que admite a inclusão de diversas características espermáticas, tem sido a metodologia mais apropriada (GADEA, 2005). Variáveis espermáticas analisadas pelo sistema CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*), as quais fornecem diferentes informações a respeito das características do deslocamento espermático, associadas aos dados de fertilidade têm impulsionado estudos que visam uma estimativa mais segura do potencial reprodutivo do macho (BROEKHUIJSE et al., 2011a).

De acordo com Foxcroft et al. (2010), uma vez comprovada a fertilidade e conhecido o valor genético de um reprodutor a disseminação de genes de grande interesse econômico no plantel, através do uso intensificado e direcionado desses reprodutores, é o ponto-chave para a eficiência do sistema de produção.

O objetivo do presente estudo é avaliar o desempenho reprodutivo de machos suínos através da técnica de inseminação artificial homospérmica múltipla com deposição intra-cervical e reduzido número de espermatozoides na dose inseminante (dois bilhões de espermatozoides móveis) e verificar a sua relação com as características morfológicas e de deslocamento espermático analisadas durante armazenamento *in vitro* pelo sistema CASA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doador de sêmen

Com o avanço da utilização da técnica de IA, o impacto da fertilidade de um doador de sêmen sobre o desempenho reprodutivo do plantel é relevante e a seleção ou descarte de um reprodutor exige a combinação de exames clínicos e laboratoriais (FOXCROFT et al., 2008). A análise seminal *in vitro* (motilidade e morfologia espermática) tem grande importância na avaliação da saúde reprodutiva do cachaço, permitindo eliminar machos que apresentem infertilidade (GIBSON, 1989). Porém, nem sempre é possível identificar os doadores sub-férteis da população, quando estes atendem os padrões de qualidade pré-estabelecidos (>70% motilidade e <30% defeitos morfológicos) (POPWELL & FLOWERS, 2004; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006). De acordo com Foxcroft et al. (2008), o alto número de células espermáticas utilizadas por fêmea coberta (9 bilhões de espermatozoides/estro) e o uso de *pool* sêmen de machos que podem ter diferentes graus de fertilidade mascaram o problema nas CIAs. Em um experimento realizado pelos autores, foi observado que dois reprodutores, quando utilizados em *pool* de sêmen, apresentavam bom desempenho reprodutivo, embora quando separados, pode ser observado que um dos reprodutores apresentou melhora em 2,5 embriões aos 30 dias de gestação. Concordando com esses resultados, Ferreira et al. (2011) relataram que a taxa de parto e o número de leitões nascidos totais não diferiram entre o uso de inseminação homospérmica ou heterospérmica. Entretanto, a utilização da inseminação homospérmica permitiu identificar variações individuais dos cachaços testados. Além disso, o uso de um macho de fertilidade inferior em um *pool* de sêmen resultaria em nenhum ou poucos leitões produzidos a partir desse ejaculado (FOXCROFT et al., 2010), inviabilizando a permanência desse reprodutor na CIA. Em outro estudo realizado pelos autores, foram avaliados dois machos de fertilidade conhecida (boa e ruim) em um *pool* com cinco ejaculados de mesmo número de espermatozoides cada. Ao realizar o teste de paternidade na progênie, o macho de fertilidade superior foi responsável por 29,8% (31/104) dos leitões nascidos, enquanto o macho de fertilidade inferior de apenas um leitão. A identificação de reprodutores tanto de baixa, como aqueles de fertilidade superior, que passariam despercebidos empregando doses com o número tradicional de espermatozoides (MARCHETTI et al., 2001;

FLOWERS, 2002), é evidenciada com o uso reduzido do número de espermatozoides por dose associado a homospermia (MEZALIRA et al., 2005). Ruiz-Sánchez et al. (2006) avaliaram nove machos cuja qualidade seminal foi considerada alta (>80% de motilidade progressiva e >85% de espermatozoides normais) e usaram DI com menor número de espermatozoides por dose (1,5 bilhão). Nesses machos, a taxa de parto variou de 71 a 98% e o tamanho da leitegada de 9 a 12 leitões. Embora a motilidade do sêmen *in natura* ou logo após a diluição não tenha sido correlacionada com a fertilidade *in vivo*, a correlação existiu com a motilidade após sete e dez dias de armazenamento da dose inseminante.

Sabendo-se que o tamanho da leitegada pode variar entre cachaços quando o mesmo número de espermatozoides é empregado na dose, para alguns cachaços, o aumento no número de células espermáticas na dose resulta em um aumento no tamanho da leitegada (MARCHETTI et al., 2001; FLOWERS, 2002; FOXCROFT et al., 2010). Alguns autores consideram que o grande número de espermatozoides na DI pode compensar qualquer fator de redução de fertilidade (TARDIF et al., 1999; BRAUNDMEIER & MILLER, 2001). Entretanto, a magnitude da resposta não é a mesma para todos os machos (FLOWERS, 2002) e esse procedimento impossibilitaria a otimização na produção de DI a partir de um ejaculado (BORTOLOZZO et al., 2008).

De acordo com Foxcroft et al. (2010), a principal vantagem na determinação da fertilidade dos cachaços é a maximização do uso de reprodutores de alto potencial genético e de fertilidade comprovada com o uso de DI com menor número de células espermáticas possível. Desta maneira, a crescente disseminação de genes superiores no sistema de produção, através do maior número de DI produzidas a partir de um ejaculado, e o descarte de reprodutores de fertilidade inferior impulsionaria a eficiência produtiva aumentando a rentabilidade.

2.2 Fatores relacionados ao desempenho reprodutivo do cachaço

A fertilidade do reprodutor pode ser afetada por diversos fatores, entre estes podem ser citados: os fatores espermáticos associados ao reprodutor e ao processamento do ejaculado, fatores genéticos e fatores relacionados à qualidade da matriz inseminada e do processo de inseminação.

2.2.1 Fatores espermáticos associados ao reprodutor

Para o sucesso da fecundação o espermatozoide precisa cumprir uma série de processos fisiológicos e funcionais. O evento da fecundação inclui interações bioquímicas altamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozoides durante a ejaculação, interação de proteínas de membrana dos espermatozoides com células epiteliais do oviduto, capacitação espermática, reconhecimento e ligação entre os gametas, reação acrossômica, penetração na zona pelúcida, fusão dos gametas (BAILEY, 2008), além da capacidade do espermatozoide em previamente resistir aos diferentes estímulos durante manuseio e processamento do ejaculado (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006). A avaliação rotineira do ejaculado *in natura* corresponde a uma bateria de testes de fácil execução e baixo custo e que garantem a produção de DI de alta qualidade (BERNARDI, 2008). Em geral, estes testes avaliam o volume, a concentração espermática, o número total de células no ejaculado, a motilidade e a morfologia espermática (AMANN et al., 1995). No entanto, os parâmetros de qualidade espermática avaliados na rotina de uma CIA, uma vez alcançados os valores mínimos desejáveis, passam a ter fraca correlação com a fertilidade (FLOWERS, 1997; WABERSKI et al., 2011b).

A motilidade é considerada um indicador da funcionalidade da membrana espermática (GIL et al., 2009), entretanto as correlações com a fertilidade tem sido baixas e contraditórias, atribuídas, principalmente, à subjetividade do teste (GADEA, 2005; BROEKHUIJSE et al., 2011c). Sabe-se que ejaculados *in natura* que apresentam motilidade superior a 60% não produzem variações no tamanho da leitegada (FLOWERS, 1997). De acordo com Popwell & Flowers (2004) a impossibilidade de predizer a fertilidade *in vivo* através das avaliações de motilidade durante armazenamento e/ou morfologia do sêmen, é devida ao fato de que estas avaliações não são capazes de informar

o número mínimo de espermatozoides necessários para atingir o máximo de fertilidade, o tempo que o sêmen mantém a capacidade fecundante ou mesmo a taxa de prenhez e tamanho da leitegada que podem ser alcançados com as amostras avaliadas. De acordo com Juonala et al. (1998), a motilidade avaliada durante o período de armazenamento pode trazer informações mais confiáveis quanto ao potencial fecundante. Ruiz-Sánchez et al. (2006) verificaram correlação significativa entre a motilidade seminal aos 7 e 10 dias de armazenamento e os resultados de fertilidade de 12 machos avaliados. No estudo de Xu et al. (1998), entretanto, foram observadas diferenças na motilidade espermática de seis machos avaliadas durante armazenamento ao longo de oito dias, porém não foram verificadas diferenças na taxa de parto ou no tamanho da leitegada.

Estudos correlacionando a morfologia espermática com a fertilidade tem demonstrado que algumas anomalias têm sido relacionadas com diferentes graus de fertilidade (GADEA et al., 1998; XU et al., 1998; FEISTMA, 2009). Neste sentido, Xu et al. (1998) demonstraram que a proporção de células espermáticas normais no ejaculado pode explicar grande parte da variação no tamanho da leitegada (r^2=0,59). Já Feitsma (2009) coletou dados de 512.000 ejaculados em duas centrais e avaliou os dados de fertilidade em mais de três milhões de inseminações. O percentual médio de células alteradas foi de 15,5% (5,4% de defeitos primários e 10,1% de secundários). Com o aumento de 10 pontos percentuais de alterações morfológicas (acréscimo de 20 para 30%) foi observada redução de 0,08 leitão por leitegada e comprometimento da taxa de parto em 0,5%. Em outro estudo, Hirai et al. (2001) descreveram a significativa relação entre as dimensões da cabeça do espermatozoide e a fertilidade utilizando *automated sperm morphology analysis* (ASMA). Neste estudo, os autores concluíram que reprodutores com maior fertilidade (taxa de não retorno >86%) apresentavam significativamente espermatozoides com cabeça menor e menos alongada.

Foxcroft et al. (2010) salientam que dificilmente um único teste será capaz de predizer o potencial reprodutivo de um cachaço, visto que as avaliações de rotina são realizadas em uma amostra representativa de todo o ejaculado. Além do mais, é conhecido que somente uma seletiva subpopulação de espermatozoides serão responsáveis pela fecundação dos oócitos (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001).

Alguns estudos têm avaliado o papel do plasma seminal no potencial fecundante de diversas espécies. Em algumas, a fertilidade foi aumentada com a adição de componentes do plasma seminal (HENAULT & KILLIAN, 1996; BELIBASAKI et al., 2000), entretanto, em suínos a exposição do espermatozoide ao plasma seminal foi reportada com uma redução na fertilidade (MAXWELL & JOHNSON, 1999). De acordo com Maxwell & Johnson (1999), isso pode ser explicado pelo fato da membrana plasmática do espermatozoide sofrer remodelações quando o espermatozoide interage com proteínas do plasma seminal durante a ejaculação inibindo a capacitação espermática, e desta forma, prevenindo a fecundação. O plasma seminal é um fluído com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fecundação (KRAUS et al., 2005). O plasma seminal contém diferentes componentes, entre eles, proteínas que são os constituintes orgânicos do fluído seminal, encontrados em maior quantidade e na forma de complexos associados (JELÍNKOVÁ et al., 2003).

Entre as principais funções e características dos espermatozoides que podem ser influenciadas por proteínas do plasma seminal, pode-se citar a capacitação e a reação acrossômica, a motilidade e a resistência ao choque térmico (CHEN et al., 2002; CURI et al., 2003). Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal, pela identificação dos polipeptídios, pode fornecer elementos para a certificação da fertilidade de reprodutores (FLOWERS, 2001; NOVAK et al., 2010; DYCK et al., 2011).

2.2.2 Fatores espermáticos associado ao processamento do ejaculado

Durante o processamento do ejaculado, a osmolaridade e a qualidade do diluente estão entre os principais fatores que devem ser controlados para evitar danos à célula espermática. A pressão osmótica do sêmen oscila entre 210 a 290 mOsm (LEVIS, 2000). Esta é mantida no ejaculado diluído, principalmente, por componentes não iônicos, como a glicose (JOHNSON et al., 2000). Íons inorgânicos, como o cloreto de potássio e o cloreto de sódio são acrescentados na composição do diluente para balancear a pressão osmótica (LEVIS, 2000). O espermatozoide suíno tolera uma osmolaridade entre 240 e 380 mOsm, mas parece que um meio isotônico ou levemente hipertônico oferece melhor preservação da capacidade fecundante, do que soluções de tonicidade mais extremas (WEITZE, 1991; DRUART et al., 2009). A baixa qualidade do diluente tem sido apontada como uma das

principais causas de redução de fertilidade do sêmen, principalmente relacionadas às condições de manipulação e armazenamento do mesmo (FLOWERS et al., 1996). Outro aspecto importante é a qualidade da água utilizada para o preparo das DI. De acordo com Bortolozzo et al. (2005), o ideal é que a água esteja dentro dos padrões recomendados para o tipo II, sendo desejável que a água não possua agentes contaminantes, como determinadas bactérias, e possua baixa condutividade elétrica (<1,0µs/cm), o que significa mínima ou nenhuma presença de minerais. A elevada concentração de sais e minerais, leva a um desequilíbrio osmótico entre sêmen e diluente, acarretando lesões espermáticas, principalmente no acrossoma (PURSEL et al., 1972). Para a diluição do sêmen suíno, a temperatura deve ser reduzida gradualmente, para evitar-se o choque térmico e seu armazenamento deve ocorrer à temperatura entre 16-18ºC (ALTHOUSE et al., 1998), tendo como ponto crítico a temperatura inferior a 12ºC. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para determinar o efeito da mudança da temperatura de diluição do sêmen na qualidade espermática (PETRUNKINA et al., 2005; WABERSKI, 2009). Em um recente estudo realizado por Rodriguez et al. (2011) quando respeitada a diluição do ejaculado em duas etapas (pré-diluição 1:1 e diluição final), aquecer o diluente a 33ºC para a diluição final do ejaculado não trouxe nenhum benefício a qualidade espermática, comparado a diluição final realizada com diluente a temperatura ambiente (22ºC).

A taxa de diluição (TD) do sêmen é um fator que pode interferir no período de conservação e viabilidade da célula espermática, reduzindo a sua fertilidade. Considera-se uma TD (sêmen:diluente) ótima a de 1:10 (MARTIN RILLO et al., 1994) ou entre 1:5 e 1:15 (RUVALCABA, 1994). Entretanto, essa vai depender da concentração espermática do ejaculado a ser diluído. DIs cuja TD é pequena, ou seja, menor que 1:5, apresentam baixa viabilidade espermática devido à carência de substratos energéticos e à perda da capacidade tamponante do meio (LEVIS, 1997; FLOWERS, 1996). Alexopoulos et al. (1996) observaram um decréscimo significativo na motilidade espermática em DIs com menor diluição ($5x10^9$ sptz/DI), quando comparadas com as doses inseminantes de maior diluição ($1x10^9$ e $3x10^9$sptz/mL). Os autores atribuíram o fato ao pobre ambiente metabólico gerado nas doses com TD menores. Já a razão pela qual ocorre uma redução da fertilidade e viabilidade espermática das DIs submetidas a uma alta TD (>1:15) não é claramente conhecida (FLOWERS, 1996). Entretanto, acredita-se que o fenômeno chamado choque

osmótico esteja envolvido (FLOWERS, 1996; LEVIS, 1997). Em um estudo conduzido por Martín-Hidalgo et al. (2011) pode-se observar que o número total de células espermáticas (2,5, 1,0 ou 0,5 bilhão) e o volume da DI (80, 30 ou 15 mL) podem influenciar a qualidade espermática durante armazenamento. Os autores observaram que o potencial da membrana mitocondrial e o percentual de células móveis avaliados nos dias 1, 4 e 7 foram menores no grupo de menor volume em comparação as DI contendo 80 mL ou 30 mL. Em contrapartida, tem sido atribuído o aumento do número de espermatozoides numa dose como um efeito compensatório para doses de menor qualidade (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001) em conseqüência de um maior período de armazenamento (FLOWERS, 2002). O armazenamento do sêmen *in vitro* afeta o potencial reprodutivo do mesmo (WEITZE, 1991; JOHNSON et al., 2000; WABERSKI et al., 2011a) em consequência do acúmulo de toxinas e metabólitos, podendo reduzir a taxa de parto em 5-10% e o tamanho da leitegada em um leitão quando utilizado para IA após os três dias (REED, 1991). Além disso, a variação na viabilidade espermática *in vitro* entre reprodutores pode refletir em diferenças no período de viabilidade *in vivo* (WABERSKI et al., 2011a). Experimentos usando reduzido número de espermatozoides por dose geraram uma melhor discriminação da variação na qualidade espermática de diferentes ejaculados e clarearam as relações entre avaliações *in vitro* e fertilidade *in vivo* (SAACKE et al., 2000; ALM et al., 2006; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006). De acordo com Bortolozzo et al. (2005), o sêmen coletado e a dose produzida podem ser de excelente qualidade, mas erros de processamento, armazenamento ou transporte reduzem ou comprometem o potencial fecundante dos espermatozoides.

Entretanto, Pedersen (1991) verificou que um aumento no número de espermatozoides não foi compensado por uma melhora no desempenho reprodutivo quando utilizado sêmen armazenado com até 72 horas e contendo mais de 2,8 bilhões de células espermáticas. É verificado que alguns machos atingem a taxa de fertilidade alvo com 2 bilhões de espermatozoides (ou menos) enquanto outros necessitam de 3 bilhões, sendo que um número maior de espermatozoides por dose não reflete obrigatoriamente em um aumento da fertilidade quando o platô é alcançado (FLOWERS, 2002).

2.2.3 Fatores genéticos

Mesmo com o avanço do melhoramento genético na linhagem materna, segundo Vonnahme et al. (2002), a seleção genética tem sido eficiente para a taxa de ovulação, mas não para a capacidade uterina, sendo esta o segundo fator limitante para número total de leitões nascidos. Contudo, a capacidade uterina deveria considerar além do comprimento do útero, a massa placentária, pois em estudos nos quais foram avaliados os conceptos aos 30 dias (BAZER et al., 1988) e aos 90 dias de gestação (WILSON et al., 1998) foram constatados que placentas menores e mais eficientes ocupam menor espaço no útero, sem comprometer a viabilidade embrionária ou fetal. A herdabilidade para as características reprodutivas como taxa ovulatória, taxa de sobrevivência embrionária e total de leitões nascidos é de 0,24 (alta), 0,14 (baixa) e 0,16 (baixa), respectivamente (JOHNSON et al., 1999). Entretanto, mesmo em rebanhos com altas taxas ovulatórias, Geisert et al. (2007) evidenciaram que fêmeas com baixa produção falharam em pelo menos três aspectos: perda embrionária antes dos 20 dias, perda aos 30 dias e perda fetal tardia.

A seleção e reposição de reprodutores são baseadas no valor genético do animal, de acordo com características desejáveis transmitidas para a progênie (SAFRANSKI, 2008). A capacidade de atender este requisito irá depender também da habilidade do reprodutor em fecundar oócitos (ROBINSON & BUHR, 2005). De acordo Belonsky & Kennedy (1988), a linhagem e o valor genético do reprodutor, ou seja, o índice do EBV (*estimated breeding value*) é determinado pela composição de diferentes características de interesse econômico. Entretanto, características para fertilidade têm sido pouco utilizadas na formação deste índice, principalmente devido a sua baixa herdabilidade, a demora para obter a resposta à seleção e a intensa seleção para características de taxas de crescimento e qualidade de carcaça (ROBINSON & QUINTON, 2002). Os autores questionam a possibilidade da seleção para estas características afetarem a qualidade espermática e a fertilidade dos reprodutores. Em um estudo de Barbato (1999), a intensa seleção para taxas de crescimento em frangos de corte levou a redução da produção espermática e foi negativamente correlacionada à fertilidade em galos selecionados.

De acordo com Robinson & Buhr (2005), a taxa de reposição anual das CIA varia entre 50-145% e os reprodutores são repostos quando não mais atendem os padrões mínimos de desempenho (BELONSKY & KENNEDY, 1988) ou quando um reprodutor

mais jovem e com melhor EBV está disponível. De acordo com os autores, assim como a superioridade genética auxilia a decisão de selecionar ou descartar um reprodutor, os critérios de seleção e descarte precisam também estar relacionados com conformação, saúde física e principalmente à capacidade fecundante (presença de genes indesejáveis, qualidade espermática, entre outros).

Segundo alguns pesquisadores (FEITSMA, 2009; RODRÍGUEZ et al., 2010), a presença de uma anomalia genética conhecida por translocação recíproca pode explicar aproximadamente 50% das causas de subfertilidade em reprodutores suínos que carreiam o defeito nos cromossomos, mesmo que este não afete a qualidade espermática. A anomalia pode estar presente em menos de 1% da população, resultando em morte embrionária precoce, seguida de menor tamanho de leitegada, sem efeito na taxa de parto (DUCOS et al., 2007). Reprodutores carreando esse defeito nos cromossomos produzem dois leitões a menos que a média da população (MAKINEN et al., 1997; RODRÍGUEZ et al., 2010). Além disso, metade dos nascidos desse reprodutor é carreador da translocação recíproca e são sub-férteis. Por isso, Feistma (2009) recomenda que seja feito testes para anormalidades genéticas (cariotipagem) antes de ingressar um reprodutor na CIA.

2.2.4 Fatores relacionados à qualidade da matriz e do processo de inseminação

A habilidade reprodutiva de um cachaço pode ser avaliada retrospectivamente através da taxa de prenhez, da taxa de parto e do número de leitões nascidos totais (FOOTE et al., 2003; FOXCROFT et al., 2010), e essas medidas indicam a capacidade dos oócitos fecundados em manter o desenvolvimento embrionário (WATSON, 1996). Insucessos desses resultados podem estar associados a um comprometimento na taxa ovulatória, na fecundação, na ligação embrio-maternal ou mesmo no desenvolvimento embrionário (KINGSTON, 1981). O número e qualidade de oócitos ovulados são os componentes que determinam o potencial máximo de embriões ou leitões que podem ser produzidos (KNOX, 2005), e podem ser influenciados por diversos fatores, entre eles, a ordem de parto, a genética, a nutrição e o manejo reprodutivo da matriz (FOOTE et al., 2003; GADEA, 2005, LAWLOR & LYNCH, 2007). De uma maneira geral, o número de leitões nascidos aumenta do 1º ao 5º parto, permanece constante e declina por volta do 10º parto (KINGSTON, 1981; LAWLOR & LYNCH, 2007). Koketsu et al. (1999) observaram que

fêmeas de 2 a 5 partos são mais férteis e mais prolíficas. Para os autores, fêmeas com mais de seis partos apresentam queda da taxa de parto e do tamanho da leitegada. Entretanto, não é incomum que haja uma redução no número de leitões nascidos em fêmeas de segundo parto, visto que a redução no tamanho da segunda leitegada tem sido confirmada em mais de 50% das fêmeas (FURTADO et al., 2005; SCHENKEL et al., 2005). Cabe lembrar que mesmo existindo raças e linhagens mais prolíficas do que outras, há diferenças entre fêmeas (GORDON, 1997; FISHER et al., 2011), sobretudo nas respostas individuais aos diversos estímulos a que as mesmas são submetidas (CLARK & LEMAN, 1986). O manejo alimentar das fêmeas lactantes e desmamadas está intimamente relacionado com o desempenho reprodutivo subsequente (COSGROVE & FOXCROFT, 1996; PRUNIER et al., 1996, MELLAGI et al., 2011) e baixos níveis alimentares nestas fases podem afetá-lo negativamente, como resposta a um maior intervalo desmame-estro, baixa taxa de ovulação e uma menor sobrevivência embrionária (VAN DER BRAND et al., 2000; PATTERSON et al., 2011). O mesmo pode ser observado de acordo com a duração da lactação e o manejo durante esta fase (HUGHES & VARLEY, 1980). Dados de Koketsu & Dial (1997), demonstraram que o tamanho da leitegada foi menor para fêmeas com períodos lactacionais inferiores a 17 dias, do que aquelas com mais de 22 dias. Desta forma, intervalos reduzidos entre o parto e a inseminação são caracterizados pelo aumento da mortalidade embrionária, que compromete o tamanho da leitegada (HUGHES & VARLEY, 1980; GAUSTAD-AAS et al., 2004) e reduz a taxa de parto (GAUSTAD-AAS et al., 2004). Há evidências de que o IDE influencia o desempenho reprodutivo subseqüente das matrizes. Wilson & Dewey (1993) observaram que fêmeas com IDE de 7-10 dias possuíam menos leitões nascidos vivos e menor taxa de parto do que aquelas que manifestaram estro entre 3-6 e 11-14 dias após o desmame. Observações semelhantes foram realizadas por Poleze et al. (2006) onde o tamanho da leitegada foi comprometido em fêmeas multíparas para os intervalos de 0-2 dias e 6-8 dias, atribuídos à baixa taxa de ovulação e à baixa taxa de sobrevivência embrionária nesta categoria de fêmeas. O intervalo entre a IA e a ovulação (IAOV) influencia a taxa de fecundação em suínos, pois os espermatozoides permanecem viáveis para fecundar a população de oócitos por um período máximo de 24 horas antes da ovulação e os oócitos, por sua vez, devem ser fecundados logo após a ovulação por espermatozoides já capacitados (KEMP & SOEDE, 1997). Como não é possível predizer o

momento em que ocorre a ovulação, as matrizes acabam sendo inseminadas mais de uma vez por estro (BORTOLOZZO et al., 2008), entretanto uma única inseminação realizada dentro do intervalo ideal é suficiente para um desempenho reprodutivo subsequente satisfatório (KEMP & SOEDE, 1997). Devido à alta variação no intervalo entre o início do estro e a ovulação, algumas das alternativas que têm sido empregadas para reduzir essa variabilidade, é a indução da ovulação pela administração de hormônios e o controle da ovulação com o uso da ultrassonografia (WABERSKI et al., 1994, BENNEMANN et al., 2005). Há especulações de que alguns doadores atingem melhores resultados de acordo com o intervalo IAOV (BORTOLOZZO et al., 2008). Considerando estas informações, avaliações a campo da fertilidade de um reprodutor podem tornar-se imprecisas, devido a essa alta variabilidade associada às matrizes inseminadas e também às condições de aplicação da técnica de IA (FOOTE et al., 2003). Devido aos diversos fatores relacionados ao potencial reprodutivo da fêmea torna-se necessário inseminar um grande número de matrizes para obter níveis significativos na avaliação de um reprodutor. Isso implica em gasto de tempo, alto custo e considerável demora na obtenção dos resultados e durante esse tempo poderá haver mudanças significativas na fertilidade avaliada (GADEA, 2005). Com o objetivo de reduzir o tempo necessário para a avaliação, algumas alternativas têm sido empregadas, como taxa de retorno ao estro, taxa de prenhez, coleta e avaliação de embriões após um número fixo de dias pós-IA (WABERSKI et al., 1994) ou ainda contagem de número de fetos após algumas semanas de gestação (TARDIF et al., 1999).

2.3 Métodos *in vitro* para avaliação da fertilidade do reprodutor

Um dos principais objetivos da espermatologia tem sido desenvolver métodos para detectar correlação entre as características espermáticas com fertilidade reduzida e tentar simplificar o processo de avaliação e seleção dos reprodutores (RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006; BROEKHUIJSE et al., 2011a; DYCK et al., 2011). Entretanto, grande parte das correlações tem sido de baixa repetibilidade e aplicabilidade, atribuído ao fato de que a maioria dos testes não permite a análise simultânea de todas as características espermáticas essenciais para a fecundação.

A seguir (Tabela 1) estão descritas as técnicas e os resultados de estudos nos quais diversas características espermáticas ou respostas da interação espermatozoide-oócito têm

sido investigadas como possíveis estimadores da fertilidade *in vivo*. De acordo com os resultados, também estão considerados os principais fatores que podem interferir na exatidão das avaliações, e conseqüente prejuízo para o valor preditivo da fertilidade.

Tabela 1: Resultados de testes *in vitro* na estimativa da fertilidade *in vivo*

Técnica	Princípio	Resultados	Considerações
Integridade da Membrana	Capacidade da membrana espermática impedir ou não a entrada de determinados corantes	Correlação positiva com TNR ou NT em sêmen armazenado por sete dias (Juonala et al., 1998; Sutkeviciene et al., 2005)	Discrimina ejaculados de menor e maior fertilidade, mas não os de fertilidade subótima (Gadea et al., 1998) Avalia a viabilidade espermática, mas não a funcionalidade (Gadea, 2005).
Resistência (ORT) e Estresse Osmótico (HOS)	Funcionalidade da membrana e percentual de acrossomas intactos em resposta a uma solução hiposmótica	Correlacionado positivamente com NT e TP (Gadea et al., 1998; Perez-Llano et al., 2001). Ejaculados com maior resistência hiposmótica apresentaram melhores resultados de TP, mas sem efeito no NT ou sem diferença entre os machos (Druart et al., 2009)	Testes simples, baratos e de fácil execução (Gadea, 2005). Discrimina os ejaculados de menor e maior fertilidade, mas não os de fertilidade subótima (Gadea et al., 1998)
Integridade da Cromatina	Estrutura anormal de cromatina é mais suscetível à desnaturação in situ induzida pelo pH baixo	Desnaturação acima de 2,1% afeta negativamente NT (Boe-Hansen et al., 2008). Correlação positiva de estabilidade da cromatina com TP, mas não com NT (Tsakmakidis et al., 2010)	Pouco sensitivo e de baixo potencial na identificação de ejaculados sub-férteis (Evenson et al., 1994; Waberski et al., 2011b) Técnica de difícil aplicação rotineira (Tsakmakidis et al., 2010)
Capacitação e Reação Acrossômica (RA)	Identificação de alterações no acrossoma com corantes fluorescentes	Maior NT foi associado com menor ocorrência de RA precoce (Holt et al., 1997) Não houve correlação direta entre o percentual de espermatozoides com RA e TC ou NT (Holt et al., 1997) Machos sub-férteis variaram mais na resposta às condições de capacitação do que os machos férteis (Petrunkina et al., 2005). Número de espermatozoides capacitados correlacionado positivamente com NT. Correlação negativa da TP com percentual de RA. (Oh et al., 2010).	Resultados contraditórios no estabelecimento de limites inferiores ou superiores na resposta ao teste para a determinação da fertilidade dos reprodutores (Petrunkina et al., 2005; Oh et al., 2010). Teste simples, barato e preciso (Oh et al., 2010)

TNR= taxa de não retorno; NT= número total de leitões nascidos; TP= taxa de parto; TC= taxa de concepção; ZP= zona pelúcida

Tabela 1: Resultados de testes *in vitro* na estimativa da fertilidade *in vivo (continuação)*

Técnica	Princípio	Resultados	Considerações
Ligação a ZP, Penetração de Oócitos e Fecundação *in vitro* (FIV)	Mimetiza as interações que ocorrem entre os gametas femininos e masculinos *in vivo*.	Resultados da FIV não foram relacionados com NT (, Xu et al., 1998; Popwell & Flowers, 2004). Correlação positiva entre percentual de espermatozoides com alta capacidade de ligação a proteínas da ZP e percentual de oócitos fecundados *in vivo* (Harkema et al., 2004) A taxa de formação do pró-núcleo masculino foi a variável que mais contribuiu na variação da TP (Ruiz-Sánchez et al., 2006). Não houve correlação entre a capacidade de ligação competitiva à ZP e NT resultantes de IA heterospérmica (Collins et al., 2008)	Custo elevado e demora na execução. Comparações entre estudos e o controle da variação de difícil execução. Apresentam correlação com fertilidade *in vivo*, sobretudo quando machos com grande variação de fertilidade são avaliados (Bernardi, 2008; Corcini et al., 2011).
Número de Espermatozoides Acessórios (NEA)	Reflete capacidade de deslocamento no trato reprodutivo feminino, reconhecimento, ligação e penetração parcial da ZP	NEA permitiu identificar reprodutor com maior participação no número de leitões nascidos a partir de IA heterospérmica (Stahlberg et al., 2000) NEA não diferiu entre machos com maior e menor capacidade de ligação à ZP e não foi correlacionado com o percentual de oócitos fecundados (Harkema et al., 2004).	
Marcadores Moleculares	Proteínas do plasma seminal identificadas como potenciais marcadores da fertilidade	NT tiveram correlação negativa com a proteína PSP-1. Tendência de correlação positiva da TP com a proteína GPX5 (Novak et al., 2010).	Mais estudos são necessários para estimar a fertilidade através de marcadores moleculares de proteínas plasmáticas (Novak et al., 2010; Dyck et al., 2011).

TNR= taxa de não retorno; NT= número total de leitões nascidos; TP= taxa de parto; TC= taxa de concepção; ZP= zona pelúcida

Outro estudo com teste *in vitro* na tentativa de avaliar a fertilidade *in vivo* foi realizado através do teste de ligação dos espermatozoides a explantes ou células do oviduto (PETRUNKINA et al., 2007). Espermatozoides com acrossoma intacto e não capacitado são capazes de aderir à suspensão de células de oviduto livre ou explante de tecido tubárico, enquanto que os espermatozoides já capacitados apresentam adesão reduzida. Menor capacidade de adesão foi observada nos espermatozoides de quatro dos cinco machos de subfertilidade conhecida, o que abre a possibilidade de utilização de ensaios de ligação espermatozoide-oviduto como ferramenta para a avaliação da fertilidade de machos (WABERSKI et al., 2006).

Uma das razões na dificuldade de encontrar um único teste para a predição exata da fertilidade reside no fato de que a maioria dos testes ou avaliações não permite a análise simultânea de todas as características espermáticas essenciais para a fecundação, estando

mais relacionados com um dos eventos responsáveis pelo potencial fecundante dos espermatozoides (BERNARDI et al., 2008; CORCINI et al., 2011). Além disto, as relações entre as características seminais e a fertilidade podem variar entre os machos, mostrando que um determinado aspecto seminal que é um bom preditor da fertilidade para um determinado macho, pode não ser para os outros. Por isso, a inclusão de diversas variáveis espermáticas tem sido considerada mais adequada para a discriminação do potencial de fertilidade dos machos (CORCINI et al., 2011). Análises multivariadas ajudam a melhor discriminar o potencial de fertilidade porque combinam informações de diversos atributos espermáticos (GADEA, 2005).

2.4 Métodos *in vivo* para avaliação da fertilidade do reprodutor

Sabe-se que o tamanho da leitegada pode variar entre cachaços quando o mesmo número de espermatozoides é empregado na dose (FLOWERS, 2002). De acordo com Foxcroft et al. (2008), esta informação permite comparar o potencial reprodutivo de cachaços submetidos a uma avaliação *in vivo*. Nesta metodologia comparam-se os resultados referentes à taxa de parto e ao número de nascidos totais entre diferentes cachaços submetidos ao mesmo protocolo de inseminação artificial e critério de avaliação laboratorial do ejaculado. Dados de Foxcroft et al. (2010) demonstraram que a média de nascidos totais de 31 reprodutores foi de 12,26 leitões, entretanto quando foi removido da análise todos os reprodutores com resultados abaixo da média da população (= 9 reprodutores), a média de nascidos totais foi para 13,29 leitões. Em um experimento realizado pelos mesmos autores, foi observado que dois reprodutores quando utilizados em *pool* de sêmen apresentavam bons resultados na sobrevivência embrionária e no número de embriões viáveis aos 30 dias de gestação. Entretanto, em IA homospérmica com dois bilhões de espermatozoides, pode ser observado que um deles apresentou uma melhora de 2,5 no número de embriões viáveis aos 30 dias de gestação e de 15% na sobrevivência embrionária. Avaliações *in vivo*, utilizando doses inseminantes com 2 e 3 x 10^9 espermatozoides verificaram que a redução no número de espermatozoides não afetou a taxa de parto, porém ocorreu redução no tamanho da leitegada, indicando que essa é mais sensível a mudanças na população espermática (XU et al., 1998; ALM et al., 2006). Ruiz-Sánchez et al. (2006) realizaram um estudo comparativo entre a motilidade espermática nos

dias 3, 7 e 10 e a fertilidade dos machos. Uma correlação positiva foi encontrada entre a motilidade do dia 7, com a taxa de parto e o tamanho da leitegada, e entre a motilidade do dia 10 com a taxa de prenhez.

Para minimizar o efeito da variabilidade individual (FOOTE et al., 2003; GADEA, 2005), a criação e manutenção de um amplo banco de dados que contenha informações do ejaculado e resultados de fertilidade *in vivo,* foi sugerido por Broekhuijse et al. (2011b). Este banco de dados permitiria a relação das características espermáticas com o desempenho reprodutivo dos cachaços, e a variabilidade seria minimizada pelo grande número de fêmeas inseminadas e de ejaculados avaliados. Além disso, um teste heterospérmico foi sugerido por Gadea (2005) e se baseia na inseminação com o mesmo número de espermatozoides provenientes de dois machos. Segundo o autor, é gerada uma competição natural e os espermatozoides mais capazes irão fertilizar os oócitos e produzir maior número de leitões. Resultados provenientes do uso de procedimentos heterospérmicos (EVENSON et al., 1994; STAHLBERG et al., 2000; FOXCROFT et al., 2008; FERREIRA et al., 2011) indicam que a variação na fertilidade de cachaços é grande e esta prática elimina fatores conflitantes, como fertilidade da fêmea, estação do ano, nutrição e práticas de manejo (FOOTE et al., 2003). De acordo com Gadea (2005), esse procedimento reduziria o número de fêmeas inseminadas, entretanto os resultados de índices de fertilidade individuais dos cachaços, como o tamanho da leitegada, ficariam limitados (FLOWERS, 2002). Além disso, a identificação da paternidade e o uso de um método confiável para isso, através de características fenotípicas (cor do pêlo, grupo sanguíneo, isoenzimas, etc) ou marcadores de polimorfismo nuclear é imprescindível tornando essa técnica limitada para uso rotineiro (STAHLBERG et al., 2000).

Em relação à metodologia de avaliação *in vitro*, não há ainda métodos simples e rápidos que sejam adequados para uso rotineiro na CIA para a identificação dos machos ou ejaculados subférteis (BERNARDI, 2008, FOXCROFT et al., 2010). A dificuldade tem sido atribuída às diferenças no procedimento aplicado, como o pequeno número de fêmeas inseminadas por macho ou de ejaculados avaliados, o método de avaliação da motilidade espermática, protocolos de IA, entre outros. Além disso, também são atribuídas as diferenças relacionadas às subpopulações espermáticas que compõem o ejaculado (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001), no que se referem aos atributos tais como

motilidade e morfologia, bem como a capacidade dos espermatozoides em manter a fertilidade ao longo do tempo, frente ao manuseio do processamento e exposição a diferentes estímulos, durante o transporte no trato genital feminino, ou durante a fecundação (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2006).

Independente do tipo de análise realizada, a avaliação *in vivo*, associada ou não a técnicas de avaliação *in vitro*, embora com demora na execução e custo alto, melhor prediz a real capacidade fecundante dos machos (BERNARDI, 2008). O real desempenho reprodutivo de um cachaço pode ser facilmente identificado quando fêmeas são inseminadas com doses homospérmicas e menor número total de células espermáticas inseminadas por estro (FOXCROFT et al., 2010). A adoção de protocolos de inseminação a cada 24 horas ou a redução do número de espermatozoides na dose são medidas que não permitem mascarar os reprodutores de fertilidade subótima devido à redução no número de células espermáticas disponíveis para fecundação, não havendo o efeito compensatório (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001; FOXCROFT et al., 2010).

2.5 Aplicações do sistema CASA para avaliação da fertilidade do reprodutor

Considerando que a motilidade espermática é um dos mais importantes aspectos relacionados à qualidade do ejaculado, torna-se crucial a acurácia e a precisão desta avaliação (TARDIF et al., 1999; GIL et al., 2009; BROEKHUIJSE et al., 2011c). Tradicionalmente em CIA, a avaliação da motilidade é realizada microscopicamente por um técnico que estima, pela avaliação visual, o percentual de células móveis de um ejaculado (BROEKHUIJSE et al., 2011c). No entanto, essa prática torna-se subjetiva e não padronizada, pois depende do grau de instrução e treinamento do avaliador (GADEA et al., 2004, FOXCROFT et al., 2008). Devido à grande variação individual, correlações significativas entre a motilidade espermática avaliada de forma subjetiva e os resultados de fertilidade in vivo são infrequentes (GADEA et al., 1998, JUONALA et al., 1998; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2006). O sistema CASA tem sido uma ferramenta disponível para aplicação comercial, devido a sua capacidade de realizar uma avaliação espermática objetiva e automatizada, incluindo diversas características de deslocamento, morfologia e concentração espermática, por captação de imagens digitalizadas (HANSEN et al., 2006; BROEKHUIJSE et al., 2011c), entretanto está intimamente relacionada com a capacitação

e habilidade técnica do operador (FEITSMA et al., 2011). Retrospectivamente essas características poderão ser correlacionadas com a fertilidade individual de um reprodutor (DIDION, 2008), embora existam poucos estudos realizados (VYT et al., 2008; DIDION, 2008; BROEKHUIJSE et al., 2011a). O sistema CASA avalia diversas características de deslocamento espermático, entre estas, a motilidade progressiva, a velocidade média da trajetória (VAP), a velocidade linear progressiva (VSL) que é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozóide, a velocidade curvilínea (VCL) que é a velocidade da trajetória real do espermatozóide, a frequência do batimento flagelar cruzado (BCF) que é o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento e a amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH) que é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real, entre outros. Entretanto, pouco é conhecido se alguns destes parâmetros estão envolvidos com o processo de fecundação (DIDION, 2008). Sabe-se que BCF, juntamente com ALH e VCL são parâmetros indicativos do vigor espermático (GIL et al., 2009) e são mais proeminentes em espermatozoides já capacitados e hiperativos. Entretanto, as correlações entre ALH e VCL e os espermatozoides capacitados não foram significativas em um estudo conduzido por Oh et al. (2010). De acordo com um recente estudo realizado por Broekhuijse et al. (2011a), foi possível identificar parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA relacionados com a fertilidade do reprodutor. Este estudo revelou um efeito positivo significativo do percentual de motilidade progressiva e um efeito negativo do VCL e BCF com a taxa de parto. Por outro lado, o número de leitões nascidos totais foi afetado positivamente pelo percentual da motilidade total e VAP e negativamente pelo VSL e o ALH. Entretanto, outros estudos não têm encontrado associação entre parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA e a fertilidade de machos suínos (DIDION, 2008). De acordo com Vyt et al. (2008) o percentual de motilidade espermática total avaliado pelo sistema CASA teve um efeito positivo no tamanho da leitegada e no número de leitões nascidos vivos, entretanto nenhum outro parâmetro avaliado foi relacionado. No entanto, mudanças na velocidade espermática durante o período de incubação in vitro explicaram 20% da variação no tamanho da leitegada (HOLT et al., 1997). Conforme discutido, recentes estudos têm buscado associação entre os parâmetros avaliados pelo sistema CASA e a fertilidade in

vivo. Cabe ressaltar que as configurações (ponto de corte) das variáveis analisadas irão divergir entre os diferentes sistemas CASA disponíveis no mercado, sendo necessário avaliar com cautela os resultados apresentados (BROEKHUIJSE et al., 2011a; ECHEGARAY et al., 2011). Entretanto, alguns procedimentos adotados nas CIAs como o uso de pool de sêmen, alto número de espermatozoides na DI ou uma alta taxa de reposição de machos, tornam os estudos nesta área de baixa aplicabilidade e repetibilidade e pouco da variabilidade poderá ser explicada pelos testes in vitro ou parâmetros espermáticos avaliados pelo sistema CASA (RODRIGUEZ et al., 2011).

3 ARTIGO

ARTIGO SUBMETIDO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA "THERIOGENOLOGY"

A formatação do artigo segue as normas da revista "Theriogenology"

Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm traits analyzed by computer-assisted semen analysis

A.B.H.P. Kummer[a], E.M. Gonçales[a], T.S Gaggini[a], C. McManus[b], M.L. Bernardi[b], I. Wentz[a], F.P. Bortolozzo[a]

[a]*Setor de Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, Brazil.*

[b]*Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000 , Porto Alegre, Brazil.*

Abstract

The application of new methods for measuring certain sperm motion characteristics and their association with boar fertility has recently increased. Computer-assisted semen analysis (CASA) offers standardized assessment of multiple sperm motion parameters and it is plausible that the combination of these parameters with morphological sperm defects may indicate the fertility potential of boars. The fertility outcome (farrowing rate - FR and number of total piglets born - TB) of 14 boars was obtained from a field trial conducted on a commercial farm using multiparous sows through single sire mating with two billion motile sperm cells per AI dose. Sows (n= 948) were equally distributed among boars according to parity, mean lifetime number of piglets born, body condition score, weaning-to-estrus interval, lactation length and number of weaned piglets during 10 weeks of breeding period. Sperm motion parameters, which evaluated with CASA system *in natura* and on semen stored at 17°C for 240h, in addition to morphological sperm defects, measured on the collection day, were included in the analysis to determine which semen traits were important to discriminate the fertility potential of ejaculates from these boars. The data underwent multivariate cluster, canonical and discriminant analyses. Four clusters of boars were formed based on fertility outcome. One boar, with the lowest FR and TB values (89.7% and 11.98), and two boars, with the highest FR and TB values (97.8% and 14.16), were placed in different clusters. The other boars were separated in two distinct clusters (4 and 7 boars), including boars with intermediate TB (12.64 and 13.22) but divergent values for FR (95.9% vs. 91.8%). Canonical analysis was able to separate the individual ejaculates into the previously clustered boars. A better separation was shown between the

lowest fertility group and the others. Semen traits with higher discriminatory power included total motility, progressive motility, amplitude of lateral head displacement, analyzed during semen storage, and sperm morphological defects such as cytoplasmatic droplets. The multivariate discriminant analysis showed that more than 80% of the 140 ejaculates were correctly classified into their own group. Multivariate analysis may be an efficient statistical tool to improve the discrimination of potential fertility of boars.

Keywords: boar, computer-assisted semen analysis, fertility, sperm defects, sperm motility.

1. Introduction

Understanding the association of specific sperm motion characteristics with boar fertility has the potential to improve AI center efficiency by identification of less fertile ejaculates. However, a relationship between sperm attributes and *in vivo* fertility in boars whose semen quality meets the normal criteria for extension and use for AI (>70% motility and <30% abnormal sperm cells) is controversial and remains the subject of considerable debate [1-3].

Motility and morphology in semen evaluations are crucial to guarantee the production of high quality insemination doses and, in some studies, they have showed significant correlations with farrowing rate or litter size [2, 4-7]. Nevertheless, the use of a high number of sperm cells and the subjective motility evaluation are among the factors limiting the ability of establishing when a boar has an intermediate or high fertility potential based on compensatory sperm attributes. To partially address this problem, the application of computer-assisted semen analysis (CASA) enhances the accuracy and standardization of semen motility assessment as well as the estimation of ejaculate concentration which allows the use of a lower number of sperm cells per AI dose [8-10].

Keeping high fertility sires to be used with lower amount of sperm cells per dose without any loss in sow productivity can have a significant economic benefit for the swine industry [11]. The use of multivariate analysis to discriminate potential fertility has been suggested by some authors [12,13] because it allows combining different characteristics of spermatozoa in a single analysis. In addition, canonical statistical analysis can be used to transform several sperm variables into a reduced set of new variables, which are characterized by being uncorrelated and retaining as much of the information in the original variables as possible [14]. The CASA system has applications at the commercial level due to its ability to objectively identify sperm motions patterns and morphology [8,10,15], which may be included in multivariate analysis and associated with individual male fertility.

The aim of the present study was to associate sperm anomalies and sperm motion traits, analyzed by computer-assisted system (CASA) during liquid semen storage, with fertility outcome through multivariate analysis.

2. Material and methods

2.1. Local, animals, housing and feeding

The experiment was carried out on a commercial swine farm of 5500 sows and on its own boar stud located in southern Brazil, state of Santa Catarina, from April through to October 2011.

Fourteen working terminal sires (Pietran x Duroc x Large White x Landrace) PIC® genotypes (PIC, Hendersonville, TN, USA) from the same boar stud were used. They were 11.3 ± 1.0 months of age at start of the experiment and were housed in individual crates in an environmentally controlled building. The average temperature was 18.6°C (15.8°C and 22.1°C for average minimum and maximum temperatures, respectively). They were given *ad libitum* access to water and fed a corn-soybean diet (15% crude protein, 0.55% digestible lysine and 3300 kcal metabolizable energy).

A total of 948 crossbred sows (Landrace x White Duroc) PIC® genotypes (PIC, Hendersonville, TN, USA) were bred and maintained in individual crates during breeding, gestation and farrowing. Environmental temperature control was based on curtain management. Sows were provided *ad libitum* access to water and fed corn-soybean diets (16.8% crude protein, 0.75% digestible lysine and 3300 kcal metabolizable energy) formulated to meet their specific nutritional needs [16] during breeding, gestation and lactation.

2.2. Semen collection and processing

Semen collection and breeding period began in April and ended in June, over a ten week period. The entire ejaculate from each boar was collected by the same experienced operator using the glove-hand technique [17] once per week (on average 6.0 ± 1.2 days of interval). A total of ten ejaculates from each boar was collected and processed. Each ejaculate was collected in a pre-warmed (38ºC) plastic bag (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and filtered to remove the gel fraction. The weight of the entire ejaculate was recorded to calculate the total number of AI doses produced. The motility score of ejaculate and concentration were obtained using CASA system (Sperm Vision® 3.7 Minitüb GmbH, Tiefenbach,

Germany) at room temperature (± 22ºC). After semen assessment, the ejaculate was diluted 1:1 with Beltsville Thawing Solution (BTS® Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) extender at 34ºC within 10 min of collection. Semen doses were prepared to contain 2.0 billion of viable spermatozoa (based on the percentage of motile cells) in a total volume of 80 mL BTS, placed in sealed airtight plastic tubes. Within 120 min after final dilution the AI doses were stored in an acclimatized area (17ºC ± 1.2ºC) and used within two days of collection. One AI dose was kept on the boar stud and stored at 17ºC for further sperm motility traits examination.

2.3. CASA and sperm morphology assessment

Semen motility traits were analyzed in a computer-assisted semen analyzer (Sperm Vision® 3.7 Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) on the day of collection (*in natura* – 0 h) and at 24, 48, 72, 168 and 240 h of semen storage at 17ºC.

The following motility traits, evaluated on a total of 140 ejaculates, were included in the study: ALH - amplitude of lateral head displacement (µm), defined as the maximum of the measured width of the head oscillation as the sperm cells swam; BCF - beat cross frequency (Hz), defined as the frequency with which the actual track crossed the smoothed track in either direction; MOT - motility percentage of sperm >2.5 µm; DSL - distance sperm travels in a straight line (µm); PROG - progressive forward motility (% sperm >4.5 µm DSL); VAP - velocity average path (µm/s), defined as the average velocity over the smoothed cell path; VCL - velocity curved line (µm/s), defined as the average velocity measured over the actual point-to-point track followed by the cell, and VSL - velocity straight line (µm/s), defined as the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track.

The semen sample preparation was performed in an eppendorf® tube using an electronic mixing pipette for dilution rate of 1:9 (90 µL of raw semen plus 810 µL of pre-warmed extender) after mixing the ejaculate thoroughly by rotating it at least five times in the collection bag. CASA assessment was performed with Leja-4 standardized counting chambers depth of 20 µm (Leja, 4 chamber counting slides, Leja Products B.V.), according to the method described in the accompanying manual (Sperm Vision 3.7 Manual). Both Sperm Vision® 3.7 and Leja-4 slides were pre-warmed at 38ºC and samples were single analyzed (one chamber filled, one sample analyzed). The Leja counting slides were filled in a single step with a pipette set at 3 µL, no pressure was used (capillary flow of chamber) and filling stopped when the chamber was completely filled. Immediately after, eight fields along the center line per slide were analyzed at 200x magnification and number of cells counted ranged from 80 to 160 cells per field. The

analyses were accepted when the coefficient of variation between field concentrations (total number of counted cells per field) was lower than 15%.

From 24 to 240 h of semen storage, CASA motion parameters described above were evaluated by using a 3 µL drop from a 1 mL doses sample, pre-warmed at 38ºC during at least 5 min and a maximum of 10 min. The 3 µL drop was placed on a pre-warmed glass slide and completely covered and spread with a pre-warmed cover slip (18 x 18 mm). The evaluation started immediately and eight fields per slide were analyzed at 200x magnification. All particles (droplets, spots, dirt, etc) identified as sperm heads by CASA were deleted as these could lead to incorrect parameter estimation. The mean of the eight microscopical fields was used for statistical analysis.

Software settings recommended by Minitüb GmbH for progressive motile cells were adjusted for the cut-off values of DSL. The settings were: image capture by 60 frames per second, cell detection with minimum cell size of 20µm and maximum of 120µm, the cut-off for progressive cells was DSL >4.5µm; for local cells was DSL<4.5 µm and slow cells were recorded as static when average orientation change was <2.5 µm.

On each day of collection, two hundred sperm cells were classified according to sperm morphology: normal, attached proximal cytoplasmic droplets (PCD), distal cytoplasmic droplets (DCD), folded tail, coiled tail and others defects (abnormal head, acrosome or midpiece) under phase contrast microscopy at 1000x magnification [18]. Ten sperm morphology evaluations (one ejaculate per boar per week) were performed during the experimental period.

2.4. Fertility data

The fertility study was conducted on a commercial farm using sows with two to five previous parities and wean to estrus interval (WEI) from 3 to 6 days. After weaning, estrus was checked daily in the morning with the presence of a mature teaser boar. Occurrence of estrus was defined by the standing reflex in front of a boar (back pressure test). Sows bred were equally distributed among boars according to parity, mean lifetime number of piglets born, body condition score (BCS), WEI, lactation length and weaned piglets. Sows were bred by single sire mating through intra-cervical semen deposition with disposable AI catheters. Insemination took place immediately after estrus onset and was repeated at intervals of 24 h with each sow receiving two or three inseminations (an average of 2.6 ± 0.4 doses per estrus). All first inseminations used fresh diluted semen and the following inseminations were performed with semen stored at 17ºC for 24h or 48h depending on the number of semen doses used on each sow bred.

The average number of sows bred per boar was 67.7 ± 0.99. The farrowing period began in July and ended in October. At farrowing, numbers of total born (TB) piglets, including piglets born alive, dead piglets and mummified fetuses were recorded. Data concerning farrowing rate (FR) and TB were captured from production records.

2.5. Statistical analysis

All the statistical analyses were carried out using the Statistical Analysis System software, version 9.2 (SAS®, 2005).

Seminal motility traits evaluated by CASA were analyzed as repeated measures with the MIXED procedure and ejaculates from each individual boar were considered as experimental units. Groups of boars, ejaculate (week of study), moment of *in vitro* evaluation and the interaction between these factors were included in the statistical model as fixed effects. Differences among groups of boars for morphological semen traits, FR and TB were analyzed with GLM procedure in a model including fixed effects of boar groups and week of semen collection. Number of semen doses per estrus, lactation length, number of weaned piglets and parity order were not significant as covariates whereas WEI and mean lifetime number of piglets born were maintained as covariates in the model used to analyze TB. The groups (LSmeans) were compared using the Tukey-Kramer test with a 5% probability level for statistical significance.

A cluster analysis (CLUSTER procedure) was performed to determine which boars could be clustered into groups based on their fertility outcome (FR and TB). Multivariate analysis was used to verify the discriminatory capacity of semen traits for the separation of these groups. A canonical analysis (PROC CANDISC) was used to find linear combinations of the quantitative variables that best summarized the differences among the groups of boars. The variables MOT, PROG and ALH for all the *in vitro* storage moments were included in the canonical analysis. Average values for BCF, VAP, VCL and VSL were used, considering all the moments of semen storage, as these characteristics did not differentiate over the storage period nor were they influenced by the interaction of storage time with the groups of boars. For the morphological traits, TAIL variable was considered the sum of folded and coiled tail defects. Defects with a percentage lower than 1% (acrosome, head and midpiece defects) were not included in the analysis. The DISCRIM procedure was used to predict the cluster to which a given ejaculate belongs and STEPDISC was used to select subsets of variables which best discriminate the groups of boars in group-by-group comparisons.

3. Results

Sows used were similar among boars for the following characteristics (mean ± SD): 4.4 ± 1.1 parities; 3.0 ± 0.2 points of BCS; 12.4 ± 1.7 lifetime piglets born; 10.3 ± 1.7 weaned piglets, 22.3 ± 1.3 days of lactation length and 4.1 ± 0.6 days of WEI. Overall, mean values of TB and FR were 13.1 ± 1.4 and 93.4% ± 10.8, respectively (Table 1).

A tree diagram (Figure 1) was obtained from the cluster analysis of the distances between boars which was based on the fertility outcome (FR and TB). Four distinct clusters were formed: Group 1 (boar B); Group 2 (boars F, G, I and N); Group 3 (boars A, D, E, H, J, K and M) and Group 4 (boars C and L). The separation into these four groups is better illustrated in Table 2, where Group 1 has low values for both FR and TB and group 4 has both high FR and TB. Group 2 has a higher FR than Group 3 but a lower TB number ($P < 0.05$).

The first canonical variable identifies ejaculates with higher MOT24-240, PROG24-240 and TAIL but also with lower ALH0-168, MEANVCL and MEANVAP (Figure 2). On the other hand the second canonical variable allows the identification of groups based on high MOT0, PROG0, ALH168, PCD, MEANBCF, MEANVAP, MEANVCL and MEANVSL, but low DCD and TAIL.

The first two canonical variables explained 85% of the total variation, with the first explaining 49%. A very well defined separation of Group 1 can be seen in the graphical representation of canonical means for groups of boars and canonical function for ejaculates (Figure 3). Group 2 also appears well separated from the others, although some ejaculates of this group are overlapping with those of Groups 3 or 4. Ejaculates from Groups 3 and 4 are poorly separated showing a higher degree of overlapping.

The results of the discriminant analysis between all groups showed that 8 traits (MOT0, MOT24, MOT240, ALH24, MEANVCL, PCD, DCD and TAIL) explained more than 10% of group variation each. A group by group discriminant comparison with semen traits explaining the separation of groups is shown in Table 3. Those with R^2 greater than 10% were considered as having a higher discriminatory power. From a total of 6 comparisons, the higher contribution of seminal motility traits to the discrimination of boar groups was observed with MOT (13) followed by ALH (9) and PROG (4). Taking into account the moments of semen evaluation, the traits with a higher occurrence were MOT24 (5), followed by MOT0 (3), MOT240 (3) and ALH24 (3). MEANBCF, MEANVCL AND MEANVSL appeared twice each. PCD, DCD and TAIL appeared as discriminatory variables in 4, 3 and 1 comparisons, respectively.

Morphological and motility semen traits were used to classify the ejaculates into groups. In general, more than 80% of the ejaculates were correctly classified in their own group with the best definition for group 1 (Table 4).

There was effect neither of the week of semen collection nor interaction between groups of boars and week of semen collection for BCF, VAP, VCL and VSL. The variables MOT, PROG and ALH were influenced by the Interaction between groups of boars and week of semen collection (Table 5).

4. Discussion

Several studies have been performed to identify the relative fertility of boars relating it to semen attributes using different statistical models. In some, boars or ejaculates are grouped based on mean value of TB or FR to better associate fertility with semen traits [1,15,19,20]. In the present study, boars were initially clustered according to their fertility outcome and, subsequently, sperm traits, which were analyzed on both fresh and stored semen, were included in canonical and discriminant analyses to determine if boars belonged to previously defined groups and which semen traits were the most appropriate to differentiate them. This provides a new approach to associate boar fertility with sperm attributes using multivariate discriminant analysis, which has been used to study subpopulations of boar [12] and ram [21] sperm cells and also to investigate the association of several motility traits analyzed by CASA system with sperm morphometry [14].

Approximately 15-20% of boars tested for fertility can be identified as less fertile compared to mean values of a particular boar population [Foxcroft, personal communication]. Four clusters were formed for the 14 evaluated boars. One boar, with the lowest FR and TB values, and two boars, with the highest FR and TB values, were placed in different clusters. The other boars were separated in two distinct clusters (4 and 7 boars), including boars with intermediate TB but divergent values for FR (high or low). This finding shows that not always high FR will be associated to high number of TB [1,22] being thus important include both parameters in fertility evaluation.

One problem when assessing male fertility is that too few males possessing a sufficiently wide range of fertility are simultaneously studied [23] and ejaculates are previously selected to meet normal industry standards so decreasing their variability. Although boars evaluated in this study showed a relatively narrow fertility range, the statistical approach used separated well the boar with the lowest FR and TB (boar B). Differences of 8.1% in FR (89.7% to 97.8%) and of 2.2 born piglets (11.98 to 14.16) between the least and most fertile boars was revealed, showing that an ability to predict and exclude boars such as boar B could have an economic impact on production efficiency.

Although low correlation coefficients have been reported for the association between sperm motility and fertility [1,15,24], this trait has been considered an important contributor to farrowing rate and number of piglets born in some studies [6,7,25]. Furthermore, Hirai et al [20] observed higher motility

(93.2% vs. 80.9%) in boars with a litter size >10 compared with boars with a smaller litter size. In the present study, motility was the most important contributor for the discrimination of boar fertility. Although MOT0 or MOT24 contributed to the discrimination of boars, it is important to notice that MOT240 appeared as a discriminant variable in all comparisons between the less fertile group and the other groups. In a recent study conducted by Broekhuijse et al [24], the variation in FR and TNB was only minimally (4%) explained by fresh sperm motility assessed subjectively. Conversely, sperm motility evaluated at days 7 or 10 of storage seems to be a practical approach for identifying relative boar fertility [6]. Indeed, sperm motility analyzed at seven days of storage has been significantly correlated to non return rate, farrowing rate or total piglets born when objective [15,26] or subjective [6] measurements were performed.

Progressive motility appeared as an important semen trait to separate some of the groups, corroborating with the observation that progressive motility analyzed in extended fresh semen was positively correlated to the farrowing rate [7]. However, it did not correlate with fertility or with any other motility parameters in other studies [8,15]. Although progressive motility is associated with membrane integrity and metabolic status [27], controversial results regarding the association of this parameter with fertility can be explained by the fact that boar spermatozoa are ineffective "anaerobes" and under anaerobic conditions they show only vibratory or oscillatory movements instead of progressive motility [26]. In addition, when ordinary glass slides are used, boar spermatozoa tend to adhere to glass reducing their forward motility [15].

Changes observed for BCF, ALH and VCL under *in vitro* capaciting conditions could be related to sperm hyperactivation that occurs *in vivo* and favors the penetration of oocyte [28,29]. Higher ALH is required during sperm capacitation to penetrate the oocytes [13] and, apparently, it increases greatly in hyperactive spermatozoa [14]. In this way, low values are expected, since most of the capacitation process should occur *in vivo* and freshly ejaculated semen usually contains only a minor fraction of hyperactive spermatozoa. In our study, ALH, BCF and VCL appeared as variables contributing to the variation between groups of boars. However, controversial results have been reported regarding the association of these characteristics with boar fertility. In the study of Didion [8], ALH, BCF and VCL were not correlated with FR. Farrowing rate has been shown to be negatively associated with BCF [7] and VCL [7,30] but not with ALH [7,30]. Litter size and ALH were negatively correlated in one study [7] but not in another [30]. No correlation was previously observed between VCL and litter size [7,30].

The association of VAP or VSL with fertility has also been controversial. In our study, VAP and VSL appeared once and twice among the variables discriminating the groups of boars. Litter size was positively correlated with VAP and negatively correlated with VSL in one study [7] but no significant

correlation was observed between these variables in another study [30]. Farrowing rate was not associated with VAP or VSL [7,30] whereas sows with higher nonreturn rates showed lower VAP values [20].

Although it is generally accepted that a boar semen ejaculate with >20-30% abnormalities cells may compromise fertility [2,31], little is known about the influence of specific abnormalities on fertility of boars with acceptable levels of sperm defects. In some studies [2,4-6,32] sperm defects were negatively associated with farrowing rate or total piglets born. Furthermore, decreasing the threshold for percentage of abnormal cells from 30% to 20% has resulted in a positive effect on fertility [32]. In our study, although the average of normal sperm cells was greater than 81% for all boars, cytoplasmatic droplets were important in separating most of the groups. Cytoplasmatic droplets have been usually regarded as a defect of spermatogenesis, and sperm cells with attached droplets are sometimes considered immature [33]. Both proximal and distal cytoplasmatic droplets can be associated with an impairment of fertility [34]. Although the mechanism by which they affect fertility is still unknown, it has been speculated that their presence can reduce sperm interaction with the oviductal epithelium and sperm reservoir formation [35]. The assumption that litter size seems to be the most sensitive indicator when acceptable levels of sperm defects are present [36] could be confirmed in boars of Group 2, which had the highest percentage of PCD and the litter size compromised in spite of a high farrowing rate. Taken together, these observations indicate that semen morphology examination should not be neglected and be regularly performed. For this purpose, the application of automated sperm morphology analysis – ASMA [14,20] can be expected to rise significantly.

It is important to emphasize that the present study is not looking for one or two semen traits that will explain the differences in fertility outcome, but a composition of semen characteristics that together can explain the variability existing between boars. Due to the many factors involved in the fertilization process, several sperm attributes are required for successful fertilization and normal embryo development [23,37]. Therefore, by using linear combinations of a higher number of sperm attributes in multivariate analyses should result in a more reliable and accurate discrimination of boar fertility. Furthermore, with a discriminant analysis it would be possible to store data of several studies in a large data set, which could later be used to classify new cases in groups of previously known fertility. The use of large data sets was suggested by Broekhuijse et al [38] to correlate sow fertility with boar semen quality characteristics which allows statistical correction of the high variability in sow side. Furthermore, there are opportunities to include other semen characteristics such as membrane integrity, chromatin integrity and acrosome status that, combined with the studied sperm attributes, could better explain the differences of fertility among boars.

In conclusion, sperm morphology defects and sperm motion traits analyzed by CASA *in natura* and during semen storage are able to discriminate the ejaculates and classify them according to the fertility

outcome through multivariate analysis. Sperm total motility, progressive motility, amplitude of lateral head displacement and cytoplasmatic droplets are the sperm traits that better discriminate the fertility of boars.

Table 1. Farrowing rate and number of total piglets born per boar

Boar	Farrowing Rate (%)	Total Piglets Born (LSmeans ± SEM)
A	94.3 (66/70)	13.21 ± 0.38
B	89.7 (61/68)	11.98 ± 0.40
C	97.0 (65/67)	13.97 ± 0.38
D	92.4 (61/66)	13.00 ± 0.39
E	91.3 (63/69)	13.12 ± 0.39
F	97.0 (65/67)	12.80 ± 0.39
G	94.1 (64/68)	12.58 ± 0.39
H	89.7 (61/68)	13.10 ± 0.40
I	95.5 (64/67)	12.53 ± 0.39
J	89.6 (60/67)	13.29 ± 0.40
K	92.6 (63/68)	13.32 ± 0.39
L	98.5 (66/67)	14.34 ± 0.38
M	92.6 (63/68)	13.48 ± 0.39
N	97.1 (66/68)	12.66 ± 0.38

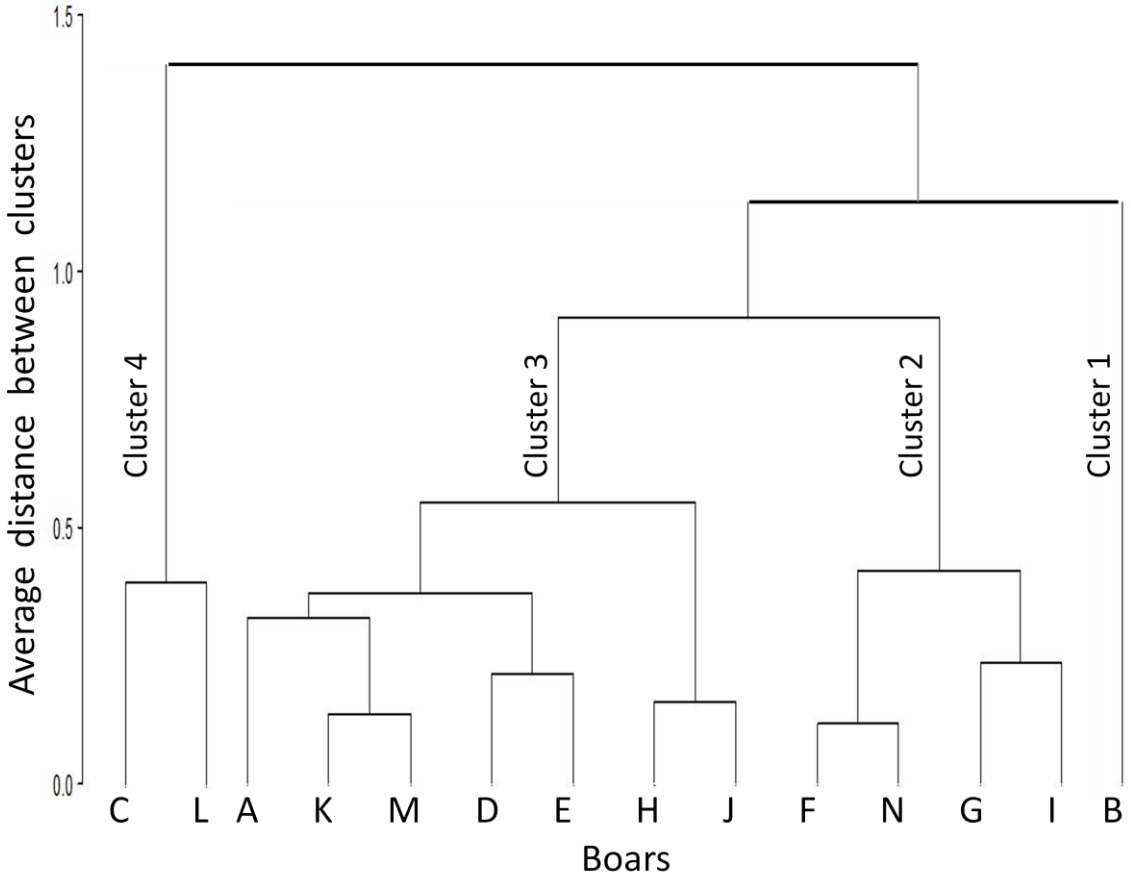

Figure 1. Tree diagram for distances between boars.

Table 2. Farrowing rate and number of total piglets born per group of boars (LSmeans ± SEM)

Group	Farrowing Rate	Total Piglets Born
1 (boar B)	88.3 ± 3.29b	11.9 ± 0.40c
2 (boars F, G, I and N)	96.4 ± 1.65a	12.6 ± 0.20c
3 (boars A, D, E, H, J, K and M)	91.3 ± 1.24b	13.2 ± 0.15b
4 (boars C and L)	97.9 ± 2.33a	14.1 ± 0.28a

Values followed by different letters in the column are different ($P < 0.05$).

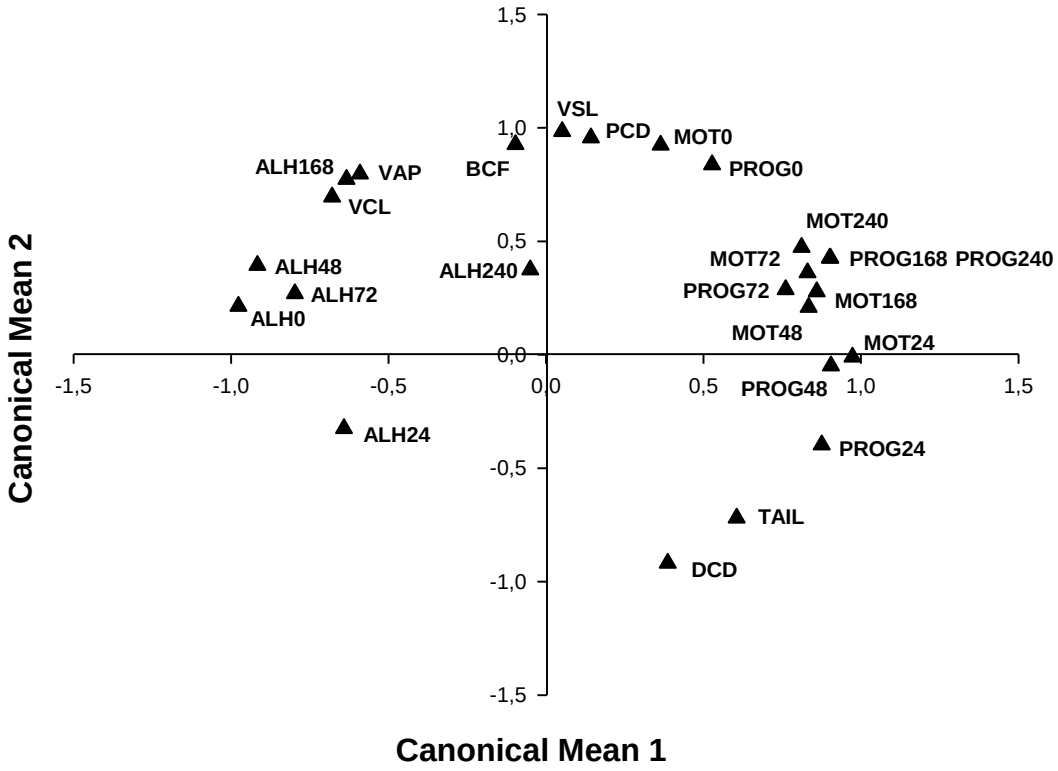

Figure 2. Graphical representation of variables used in the separation of boar groups from gradual discriminant analysis.

ALH: amplitude of lateral head displacement (µm); BCF: beat cross frequency (Hz); MOT: motility percentage of sperm >2.5 µm DSL - distance sperm travels in a straight line (µm); PROG: progressive forward motility (% sperm >4.5 µm DSL); VAP: velocity average path (µm/s); VCL: velocity curved line (µm/s); VSL: velocity straight line (µm/s); DCD: distal cytoplasmatic droplet; PCD: proximal cytoplasmatic droplet; TAIL: tail defects (folded + coiled). Average values considering all the moments of semen storage were used for BCF, VAP, VCL and VSL. Numbers following the name of variables represent the moments of semen evaluation in hours.

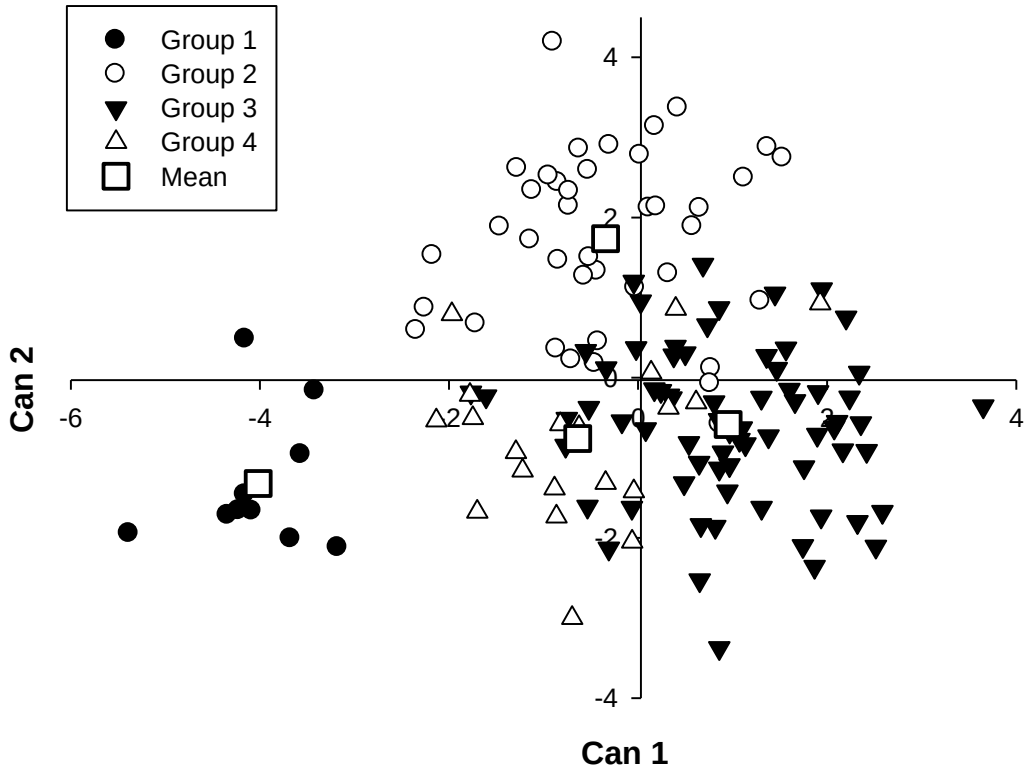

Figure 3. Standardized canonical means for groups of boars and canonical representation of individual ejaculates of each group.

Table 3. Semen traits used to separate boar groups using discriminant analysis

Groups	2	3	4
1	**MOT24, MEANVAP, ALH48, MEANVSL,** MEANBCF, PCD, DCD, MOT240	**MOT24, TAIL, MOT240**, ALH48, PROG0, ALH0	**MOT240, MEANVCL, MOT0, PROG0, MOT24, MOT72**
2		**DCD**, **PCD**, MOT0, MOT24, PROG48, ALH24, MEANVSL, MOT72, ALH240, MEANVCL, MEANBCF	**PCD, ALH24, DCD, MOT0, ALH72,** ALH240, MOT24
3			**ALH24, PCD**, PROG72, ALH72

Variables with R^2 greater than 10% are in bold type.

ALH: amplitude of lateral head displacement (µm); BCF: beat cross frequency (Hz); MOT: motility percentage of sperm >2.5 µm DSL - distance sperm travels in a straight line (µm); PROG: progressive forward motility (% sperm >4.5 µm DSL); VAP: velocity average path (µm/s); VCL: velocity curved line (µm/s); VSL: velocity straight line (µm/s); DCD: distal cytoplasmatic droplet; PCD: proximal cytoplasmatic droplet; TAIL: tail defects (folded + coiled). Numbers following the name of variables represent the moments of semen evaluation in hours.

Table 4. Percentage of ejaculates classified in each group of boars

From groups	1	2	3	4
1	100.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	85.0	10.0	5.0
3	0.0	7.1	81.4	11.4
4	5.0	5.0	10.0	80.0
Error	0.0	15.0	18.6	20.0
Prior	0.25	0.25	0.25	0.25

Table 5. Morphological and motility seminal traits of the groups of boars (LSmeans ± SEM)

	Groups of boars			
Variables	1	2	3	4
MOT0	90.8 ± 0.76C	94.5 ± 0.38A	92.9 ± 0.29B	92.6 ± 0.54B
MOT24	84.5 ± 0.99C	90.4 ± 0.49B	92.1 ± 0.37A	91.0 ± 0.70AB
MOT48	85.4 ± 1.50B	90.3 ± 0.75A	90.5 ± 0.57A	91.0 ± 1.06A
MOT72	86.7 ± 1.37B	90.7 ± 0.68A	90.6 ± 0.52A	90.7 ± 0.97A
MOT168	68.8 ± 3.93B	82.5 ± 1.96A	82.9 ± 1.48A	83.2 ± 2.78A
MOT240	39.6 ± 5.90B	71.1 ± 2.95A	68.6 ± 2.23A	67.7 ± 4.17A
PROG0	67.7 ± 2.51C	82.8 ± 1.26A	78.0 ± 0.95B	76.5 ± 1.78B
PROG24	72.1 ± 2.77B	75.0 ± 1.39AB	77.6 ± 1.05A	77.2 ± 1.96AB
PROG48	71.5 ± 3.23	74.3 ± 1.62	76.0 ± 1.22	72.6 ± 2.29
PROG72	70.5 ± 3.19AB	74.8 ± 1.60AB	75.6 ± 1.21A	70.4 ± 2.26B
PROG168	50.8 ± 5.58B	63.3 ± 2.79A	63.3 ± 2.11A	59.9 ± 3.95AB
PROG240	21.7 ± 6.27B	49.0 ± 3.14A	48.8 ± 2.37A	42.2 ± 4.44A
ALH0	2.57 ± 0.11A	2.39 ± 0.06AB	2.27 ± 0.04B	2.37 ± 0.08AB
ALH24	2.33 ± 0.11AB	2.10 ± 0.06B	2.06 ± 0.04B	2.43 ± 0.08A
ALH48	2.36 ± 0.11A	2.21 ± 0.06A	2.02 ± 0.04B	2.15 ± 0.08AB
ALH72	2.25 ± 0.11AB	2.19 ± 0.06A	2.05 ± 0.04B	2.26 ± 0.08A
ALH168	2.36 ± 0.11AB	2.42 ± 0.06A	2.11± 0.04C	2.21± 0.08BC
ALH240	2.36 ± 0.11	2.35 ± 0.06	2.34 ± 0.04	2.29 ± 0.08
MEANBCF	23.9 ± 0.73B	25.7 ± 0.37A	24.3 ± 0.28B	24.9 ± 0.52AB
MEANVAP	45.2 ± 1.57AB	46.2 ± 0.78A	43.1 ± 0.59B	44.3 ± 1.11AB
MEANVCL	80.7 ± 2.44A	81.7 ± 1.22A	75.4 ± 0.92B	79.2 ± 1.72A
MEANVSL	29.0 ± 1.10B	31.8 ± 0.55A	29.9 ± 0.41B	30.2 ± 0.78AB
DCD	3.60 ± 1.04AB	1.95 ± 0.52B	4.78 ± 0.39A	4.65 ± 0.74A
PCD	2.20 ± 1.22B	7.97 ± 0.61A	4.19 ± 0.46B	1.95 ± 0.86B
TAIL	0.45 ± 0.41AB	0.54 ± 0.21A	1.35 ± 0.16B	1.47 ± 0.29B

Values followed by different letters in the line are different ($P < 0.05$). ALH: amplitude of lateral head displacement µm); BCF: beat cross frequency (Hz); MOT: motility percentage of sperm >2.5 µm DSL - distance sperm travels in a straight line (µm); PROG: progressive forward motility (% sperm >4.5 µm DSL); VAP: velocity average path (µm/s); VCL: velocity curved line (µm/s); VSL: velocity straight line (µm/s); DCD: distal cytoplasmatic droplet; PCD: proximal cytoplasmatic droplet; TAIL: tail defects (folded + coiled). Numbers following the name of variables represent the moments of semen evaluation in hours.

References

[1] GADEA J, MATAS C, LUCAS X. Prediction of porcine semen fertility by homologus *in vitro* penetration hIVP/assay. Anim Reprod Sci 1998;56:95-108.

[2] ALM K, PELTONIEMI OA, KOSKINEN E, ANDERSSON M. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. Reprod Domest Anim 2006;41:210-3.

[3] WABERSKI D, SCHAPMANN E, HENNING H, RIESENBECK A, BRANDT H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. Theriogenology 2011;75: 337-45.

[4] WABERSKI D, MEDING S, DIRKSEN G, WEITZE KF, LEIDING C, HAHN R. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. Anim Reprod Sci 1994;36:145-51.

[5] XU X, POMMIER S, ARBOV T, HUTCHINGS B, SOTTO W, FOXCROFT GR. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. J Anim Sci 1998;76:3079-89.

[6] RUIZ-SÁNCHEZ AL, O´DONOGHUE R, NOVAK S, DYCK MK, COSGROVE JR, DIXON WT, FOXCROFT GR. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. Theriogenology 2006;66:736-48.

[7] BROEKHUIJSE MLWJ, SOSTARIC E, FEITSMA H, GADELLA BM. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. J Anim Sci 2011;90:779-89.

[8] DIDION BA. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. Theriogenology 2008;70:1374-76.

[9] FEITSMA H, BROEKHUIJSE MLWJ, GADELLA BM. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. Reprod Domest Anim 2011;46:49-51.

[10] BROEKHUIJSE MLWJ, FEITSMA H, GADELLA BM. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. Theriogenology 2011;76:1473-86.

[11] FOXCROFT GR, DYCK MK, RUIZ-SÁNCHEZ A, NOVAK S, DIXON WT. Identifying usable semen. Theriogenology 2008;70:1324-36.

[12] ABAIGAR T, HOLT WV, HARRISON RAP, DEL BARRIO G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. Biol Reprod 1999;60:32-41.

[13] GADEA J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. Theriogenology 2005;63:431-44.

[14] GIL MC, GARCÍA-HERREROS M, BARÓN FJ, APARICIO IM, SANTOS AJ, GARCÍA-MARÍN LJ. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. Theriogenology 2009;71:254-63.

[15] SUTKEVICIENE N, ANDERSSON MA, ZILINSKAS H, ANDERSSON M. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. Theriogenology 2005;63:739-47.

[16] NRC. Nutrient Requirements of Swine. 10th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1998.

[17] HANCOCK JL, HOVEL GLR. The collection of boar semen. Vet Rec 1959;71:664-65.

[18] PURSEL VG, JOHNSON LA, RAMPACEK GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J Anim Sci 1972;34:278-83.

[19] HOLT C, HOLT WV, MOORE HDM, REED HCB, CURNOCK RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. J Androl 1997;18:312-23.

[20] HIRAI M, BOERSMA A, HOEFLICH A, WOLF E, FOLL J, AUMÜLLER R, BRAUN J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors. J Androl 2001;22:104-10.

[21] BRAVO JA, MONTANERO J, CALERO R, ROY TJ. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. Anim Reprod Sci 2011;129:22-9.

[22] TSAKMAKIDIS IA, LYMBEROPOULOS AG, KHALIFA TAA. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. J Vet Sci 2010;11:151-4.

[23] MOCÉ E, GRAHAM JK. In vitro evaluation of sperm quality. Anim Reprod Sci 2008;105:104-18.

[24] BROEKHUIJSE MLWJ, SOSTARIC E, FEITSMA H, GADELLA BM. The value of microscopic semen motility assessment at collectio for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. Theriogenology 2012;77:1466-79.

[25] GADEA J, SELLÉS E, MARCO MA. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. Reprod Domest Anim 2004;39:303-08.

[26] JUONALA J, LINTUKANGAS S, NURTTILA T, ANDERSSON M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. Reprod Domest Anim 1998;34:83-7.

[27] JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P, MAXWELL WMC. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci 2000;62:143-72.

[28] SUAREZ SS, KATZ DF, OWEN DH, ANDREW JB, POWELL RL. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. Biol Reprod 1991;44:375-81.

[29] SCHMIDT H, KAMP G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. Reproduction 2004 ; 128 :171-9.

[30] OH SA, PARK YJ, YOU YA, MOHAMED EA, PANG MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. Anim Reprod Sci 2010;121:131-8.

[31] FLOWERS WL. Management of boars for efficient semen production. J Reprod Fertil 1997;52:67-78.

[32] FEITSMA H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. Acta Sci Vet 2009;37:61-71.

[33] SANCHO S, PINART E, BRIZ M, GARCIA-GIL N, BADIA E, BASSOLS J, KADAR E, PRUNEDA A, BUSSALLEU E, YESTE M, COLL MG, BONET S. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. Theriogenology 2004;62:1271-82.

[34] LOVERCAMP K, SUTOVSKY P. Cytoplasmic droplets: the most frequently observed abnormality. In: Proccedings of the MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, Saint Louis, MI, USA. 2008:31-49.

[35] PETRUNKINA AM, GEHLHAAR R, DROMMER W, WABERSKI D, TÖPFER-PETERSEN E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium *in vitro*. Reproduction 2001;121:889-96.

[36] SAACKE RG, DALTON JC, NADIR S, NEBEL RL, BAME JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim Reprod Sci 2000;60:663-77.

[37] RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? Reprod Domest Anim 2003;38:312-18.

[38] BROEKHUIJSE MLWJ, FEITSMA H, GADELLA BM. Field data analysis of boar semen quality. Reprod Domest Anim 2011;46:59-63.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maximização do uso de machos de alto valor genético e a disseminação de genes de maior interesse econômico no plantel dependem do potencial reprodutivo dos machos e do protocolo de inseminação adotado na granja. Comercialmente, existem várias possibilidades de otimizar a disseminação genética a partir de um ejaculado, como o uso da inseminação pós-cervical com reduzido número de espermatozoides na DI, associado ou não ao menor número de DI por fêmea coberta (protocolos de IA a cada 24 h ou em tempo fixo). Porém, a certificação da fertilidade dos reprodutores e o uso de tecnologias na avaliação espermática para a garantia da qualidade da DI são imprescindíveis, para não haver quedas na produtividade quando essas estratégias forem utilizadas.

A redução do volume e número de células espermáticas na DI exige um controle rígido e padronizado da qualidade espermática, desde a coleta até o armazenamento e transporte. Exames espermáticos qualitativos como motilidade e morfologia não poderão ser negligenciados, uma vez que erros na avaliação ou no processamento deixarão de ser compensados pelo número excessivo de células espermáticas na DI tradicionalmente utilizadas.

Ao atenderem os padrões mínimos para processamento do sêmen (>70% de motilidade e <30% de defeitos morfológicos), a motilidade espermática e as características morfológicas são classicamente consideradas como características que não afetam a fertilidade. Entretanto, ainda é desconhecido o efeito destes limiares, quando o número de células espermáticas na DI é reduzido. Embora o limite máximo de defeitos espermáticos não tenha sido ultrapassado, é possível que o uso de um número de espermatozoides abaixo do convencionalmente recomendado tenha permitido detectar diferenças na fertilidade associadas à presença de gota citoplasmática.

O uso de sistema computadorizado de avaliação espermática elimina os efeitos adversos provenientes de uma avaliação subjetiva da motilidade, e imprecisa (superestimada) da concentração espermática do ejaculado. O custo da aquisição de tal tecnologia em situação comercial será justificado pelo significativo benefício econômico devido principalmente à maximização do uso de ejaculados de machos geneticamente superiores e pela identificação e eliminação de ejaculados de menor qualidade ou de reprodutores menos férteis.

Uma das grandes dificuldades da avaliação *in vivo* da fertilidade é minimizar o efeito da fêmea sobre esta variável. O fato das características reprodutivas mais impactantes das fêmeas

como ordem de parto, IDE e histórico de leitões nascidos, entre outras, terem sido controladas por meio de uma distribuição uniforme entre os machos avaliados, fornece maior confiabilidade nos resultados obtidos.

A adoção de inseminação homospérmica em granjas comerciais permite monitorar de forma adequada o desempenho dos machos, porém a avaliação simultânea *in vivo* só é possível em um reduzido número de reprodutores. Pode-se especular que as informações provenientes de estudos consecutivos com pequenos grupos de machos podem ser acumuladas e, caso seja confirmada a associação da fertilidade com características espermáticas, esse banco de dados possa servir para prever a fertilidade de novos machos incorporados ao grupo, sem necessariamente testá-los *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C., BOSCOS, C., SARATSIS, P. H., SALOULIDIS, C., KYRIAKIS, S. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertility capacity of boar semen diluted in Beltsville Thaw Solution (BTS) extender. Animal Science, v. 62, p. 599-604, 1996.

ALM, K., PELTONIEMI, O. A., KOSKINEN, E., ANDERSSON, M. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. Reproduction Domestic Animal, v. 41, p. 210-213, 2006.

ALTHOUSE, G. C., WILSON, M. E., KUSTER, C., PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. Theriogenology, v. 50, p. 535-543, 1998.

AMANN, R. P., KATZ, D. F., WANG, C. The handbook of andrology. Schaumburg, IL, USA : American Society of Andrology, 1995.

BARBATO, G. F. Genetic relationships between selection for growth and reproductive effectiveness. Poultry Science, v. 78, p. 444-452, 1999.

BAILEY, J. Sperm quality tests: What are other species using? In: Proceedings of the MIDWEST BOAR STUD MANAGERS CONFERENCE, Saint Louis, MS, U.S.A. 2008, p. 1-7.

BAZER, F. W., THATCHER, W. W., MARTINAT-BOTTE, F., TERQUIS, M. Sexual maturation and morphological development of the reproductive tract in Large White and prolific Chinese Meishan pigs. Journal Reproduction and Fertility, v. 83, p. 723-728, 1988.

BELIBASAKI, S., AMIRIDIS, G. S., LYMBEROPOULOS, A., VARSAKELI, S., KOUSKOURA, T. Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study. Acta Veterinaria Hungarica, v. 48, p. 335-341, 2000.

BELONSKY, G., KENNEDY, B. Selection on individual phenotype and best linear unbiased predictor of breeding value in a closed swine herd. Journal of Animal Science, v. 66, p. 1124-1131, 1988.

BENNEMANN, P. E., DIEHL, G. N., MILBRADT, E., VIDOR, R. M., FRIES, H. C. C., WENTZ, I., BERNARDI, M. L., BORTOLOZZO, F. P. Artificial insemination of gilts with 1,5 billion sperm stored in different periods associated with different pre-ovulatory intervals. Reproduction Domestic Animals, v. 40, p. 507-510, 2005.

BERNARDI, M. L. Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. Acta Scientiae Veterinariae, v. 36, p. 5-16, 2008.

BOE-HANSEN, G. B., CHRISTENSEN, P., VIBJERG, D., NIELSEN, M. B. F., HEDEBOE, A. M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored semen and its relationships with field fertility. Theriogenology, v. 69, p. 728-736, 2008.

BRAUNDMEIER, A. G. & MILLER, D. J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. Journal Dairy Science, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., SOSTARIC, E., FEITSMA, H., GADELLA, B. M. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. Journal of Animal Science, [Epub ahead of print], 2011a.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H., GADELLA, B. M. Field data analysis of boar semen quality. Reproduction in Domestic Animals, v. 46, p. 59-63, 2011b.

BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H., GADELLA, B. M. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. Theriogenology, v. 76, p. 1473-1486, 2011c.

BORTOLOZZO F. P., WENTZ, I., FERREIRA, F. M., BENNEMANN, P. E. & BERNARDI, M. L. Exame do ejaculado. In: BORTOLOZZO F. P., WENTZ, I. (Eds.). Suinocultura em Ação: Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. Porto Alegre: Palotti. 2005. Cap. 2, pp 69-90.

BORTOLOZZO, F. P., GOLDBERG, A. M. G., WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade? Acta Scientiae Veterinariae, v. 36, p. s17-s26, 2008.

CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. Protection of sperm DNA against oxidative stress *in vivo* by accessory sex gland secretions in male hamsters. Reproduction, v.124, p.491-499, 2002.

CLARK, L. K., LEMAN, A. D. Factors that influence litter size in pigs. Part 2. Pig news and information, v. 7, p. 431-437, 1986.

COLLINS, E. D., FLOWERS, W. L., SHANKS, R. D., MILLER, D. J. Porcine sperm zona binding ability as an indicator of fertility. Animal Reproduction Science, v. 104, p. 69-82, 2008.

CORCINI, C. D., FERREIRA, C. E. R., GOULARTE, K. L., MADEIRA, E. M., BIANCHI, I., LUCIA, T. JR., VARELA JUNIOR, A. S. Inovações tecnológicas na avaliação de sêmen suíno. XV CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. Fortaleza, CE, Brasil, 2011, p. 161-175.

COSGROVE, J. R., FOXCROFT, G. R. Nutrition and reproduction in the pig : Ovarian aetiology. Animal Reproduction Science, v. 42, p. 131-141, 1996.

CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. Asthenozoospermia: analysis of a large population. Archives of Andrology, v.49, p.343-349, 2003.

DIDION, B. A. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. Theriogenology, v. 70, p. 1374-1376, 2008.

DRUART, X., GATTI, J., HUET, S., DACHEUX, J., HUMBLOT, P. Hypotonic resistance of boar spermatozoa : sperm subpopulations and relatioship with epididymal maturation and fertility. Reproduction, v. 137, p. 205-213, 2009.

DUCOS, A., BERLAND, H., BONNET, N., CALGARO, A., BILLOUX, S., MARY, N., GARNIER-BONNET, A., DARRE, R., PINTON, A. Chromossomal control of pig populations in France : 2002-2006 survey. Genetic Selection Evolution, v. 39, p. 583-597, 2007.

DYCK,. M K., FOXCROFT, G. R., NOVAK, S., RUIZ-SÁNCHEZ, A., PATTERSON, J., DIXON, W. T. Biological markers of boar fertility. Reproduction in Domestic Animals, v. 46, p. 55-58, 2011.

ECHEGARAY, A., AKOURKI, A., BERGES, R., GARULO, J. R. Effect of the frame rate and the number of frames per capture on boar sperm CASA analysis. Proceedings of the 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. Bonn, Germany. 2011, p. 100.

EVENSON, D. P., THOMPSON, L., JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. Theriogenology, v. 41, p. 637-651, 1994.

FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. Acta Scientiae Veterinariae, v. 37, p. 61-71, 2009.

FEITSMA, H., BROEKHUIJSE, M. L. W. J., GADELLA, B. M. Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. Reproduction in Domestic Animals, v. 46, p. 49-51, 2011.

FERREIRA, C. E. R.; SAVIO, D. B.; GUARISE, A. C.; FLACH, M. J.; BIANCHI, I.; CORCINI, C. D.; LUCIA, T. J. Desempenho reprodutivo com inseminações artificiais homospérmicas e heterospérmicas. Anais do XV CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. Fortaleza, CE, Brasil. 2011.

FISHER, K., BRÜSSOW, K. P., SCHLEGEL, H., WÄHNER, M. Cluster analysis as a tool to assess litter size in conjuction with the amount of embryonic and fetal losses in pigs. Biotechnology in Animal Husbrandy, v. 27, p. 785-790, 2011.

FLOWERS, W. L. Semen evaluation, extension, packaging and transportation methods. American Association of Swine Practitioners, p. 469-479, 1996.

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

FLOWERS, W. L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. Swine News, USA, p.1-4, 2001.

FLOWERS, W. L. Increasing fertilization rate of boars : Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. Journal of Animal Science, v. 80, p. E47-E53, 2002.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. Animal Reproduction Science, v. 75, p. 119-139, 2003.

FOXCROFT, G. R., DYCK, M. K., RUIZ-SÁNCHEZ, A., NOVAK, S., DIXON, W. T. Identifying usable semen. Theriogenology, v. 70, p. 1324-1336, 2008.

FOXCROFT, G. R., PATTERSON, J., CAMERON, A., DYCK, M. K.Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. In : Proccedings of the 21st IPVS CONGRESS, Vancouver, Canada. 2010, p. 25-29.

FURTADO, C. S. D., KUMMER, R., MELLAGI, A. P. G., KOLLER, F. L., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I., BERNARDI, M. L. Redução do número médio de leitões nascidos no segundo parto de acordo com a idade, peso e a espessura de toucinho na primeira cobertura. In : XII CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Fortaleza, CE, Brasil. 2005, p. 222-223.

GADEA, J., MATAS, C., LUCAS, X. Prediction of porcine semen fertility by homologus *in vitro* penetration hIVP/assay. Animal Reproduction Science, v. 56, p. 95-108, 1998.

GADEA, J., SELLÉS, E., MARCO, M. A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. Reproduction in Domestic Animals, v. 39, p. 303-308, 2004.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. Theriogenology, v. 63, p. 431-444, 2005.

GAUSTAD-AAS, A. H., HOFMO, O. P., KRALBERG, K. The importance of farrowing to service interval in sows served during lactation or after shorter lactation than 28 days. Animal Reproduction Science, v. 81, p. 287-293, 2004.

GEISERT, R. D., SASAKIA, S., CLUTTER, A. C. Embryonic loss in sows with repeated propensity for small litter size. Reproduction in Domestic Animals, v. 42, p. 333-335, 2007.

GIBSON, C. D. Examining for breeding soundness in boars. Veterinary Medicine, v. 84, p. 200, 1989.

GIL, M. C., GARCÍA-HERREROS, M., BARÓN, F. J., APARICIO, I. M., SANTOS, A. J., GARCÍA-MARÍN, L. J. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. Theriogenology, v. 71, p. 254-263, 2009.

GORDON, I. Controlled Reproduction in Pigs. Wallingford : Cab International, 1997, 247 p.

HANSEN, C., VERMEIDEN, T., VERMEIDEN, J. P. W., SIMMET, C., DAY, B. C., FEITSMA, H. Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, Ultimate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. Theriogenology, v. 66, p. 2188-2194, 2006.

HARKEMA, W., VISSER, I., SOEDE, N. M., KEMP, B., WOELDERS, H. Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins *in vitro* in relation to fertilization rates *in vivo*. Theriogenology, v. 61, p. 227-238, 2004.

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.

HIRAI, M., BOERSMA, A., HOEFLICH, A., WOLF, E., FOLL, J., AUMÜLLER, R., BRAUN, J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors. Journal of Andrology, v. 22, p. 104-110, 2001.

HOLT, C., HOLT, W. V., MOORE, H. D. M., REED, H. C. B., CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations : results of two fertility trials. Journal of Andrology, v. 18, p. 312-323, 1997.

HUGHES, P., VARLEY, M. Reproduction in the pig. London : Butterworth&Co., 1980. 241p.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. Proteins and inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. International Journal of Biological Macromolecules, v.32, p. 99-107, 2003.

JOHNSON, R. K., NIELSEN, M. K., CASEY, D. S. Responses in ovulation rate, embryonal survival and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase litter size. Journal of Animal Science, v. 77, p. 541-557, 1999.

JOHNSON, L. A., WEITZE, K. F., FISER, P., MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, v. 62, p. 143-172, 2000.

JUONALA, J., LINTUKANGAS, S., NURTTILA, T., ANDERSSON, M. Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. Reproduction in Domestic Animals, v. 34, p. 83-87, 1998.

KEMP, B., SOEDE, N. M. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. Journal of Reproduction and Fertility, v. 52, p. 79-89, 1997.

KINGSTON, N. G. The problem of low litter size. The Pig Journal, v. 8, p. 54-64, 1981.

KNOX, R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. Domestic Animal Endocrinology, v. 29, p. 385-397, 2005.

KOKETSU, Y., DIAL, G. D. Factors influencing the postweaning reproductive performance of sows on commercial farms. Theriogenology, v. 47, p. 1445-1461, 1997.

KOKETSU, Y., TAKAHASHI, H., AKACHI, K. Longevity, lifetime pig production and productivity and age at first conception in a cohort of gilts observed over six years on commercial farms. The Journal of Veterinary Medical Science, v. 61, p. 1001-1005, 1999.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. Journal of Reproductive Immunology, v.65, p.33-46, 2005.

LAWLOR, P. G., LYNCH, P. B. A review of factors influencing litter size in Irish sows. Irish Veterinary Journal, v. 60, p. 359-366, 2007.

LEVIS, D. G. Hazard analysis of critical control points in an on-farm artificial insemination laboratory. In : Proccedings of the GEORGE A. YOUNG SWINE CONFERENCE AND ANNUAL NEBRASKA SPF SWINE CONFERENCE, v. 38, 1997, p. 58-74.

LEVIS, D. G. Liquid boar semen production: Current extender technology and where do we go from here! In: Proccedings of the 4th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, Beltsville, Maryland, USA. 2000, p. 121-128.

MAKINEN, A., PITKANEN, T., ANDERSSON, M. Two cases of reciprocal translocations in domestic pigs producing small litters. Journal of Animal Breeding Genetics, v. 114, p. 377-384, 1997.

MARCHETTI, A. N., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I., BORCHARDT NETO, G. Efeito da utilização de 2, 3 e 4 bilhões de espermatozoides na dose inseminante sobre a taxa de retorno ao estro, taxa de parto e tamanho das leitegadas de fêmeas suínas. ARS. Veterinária, v. 17, p. 07-112, 2001.

MARTIN-HIDALGO, D., BRAGADO, M. J., GARCIA-MARIN, L. J., GIL, M.C. The effect of volume and sperm number on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. Proceedings of the 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. Bonn, Germany. 2011, p. 98-99.

MARTIN RILLO, S., GRANADOS, L., RUVALCABA, J. A. G., PASCUAL, J. G. IA Porcina : Situacion actual y tecnologia. In : Proccedings of the 3rd CONGRESSO NACIONAL DE REPRODUCION PORCINA, Rosario, Argentina. 1994, p. 65-78.

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.

MELLAGI, A. P. G., PANZARDI, A., BIERHALS, T., GHELLER, N. B., BERNARDI, M. L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F. P. Effect of parity and lactational body weight loss on reproductive performance of a modern sow genotype. Proceedings of the 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. Bonn, Germany. 2011, p. 109.

MEZALIRA, A., DALLANORA, D., BERNARDI, M. L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F. P. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. Reproduction in Domestic Animals, v. 40, p. 1-5, 2005.

NOVAK, S., RUIZ-SÁNCHEZ, A., DIXON, W. T., FOXCROFT, G. R., DYCK, M. K. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. Journal of Andrology, v. 31, p. 188-200, 2010.

OH, S. A., PARK, Y. J., YOU, Y. A., MOHAMED, E. A., PANG, M. G. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. Animal Reproduction Science, v. 121, p. 131-138, 2010.

PATTERSON, J. L., SMIT, M. N., NOVAK, S., WELLEN, A. P., FOXCROFT, G. R. Restricted feed intake in lactating primiparous sows. I. Effects on sow metabolic state and subsequent reproductive performance. Reproduction, Fertility and Development, v. 23, p. 889-898, 2011.

PÉREZ-LLANO, B., LORENZO, J. L., YENES, P., TREJO, A., GARCIA-CASADO, P. A short hypoosmotic swelling test for prediction of boar sperm fertility. Theriogenology, v. 56, p. 387-398, 2001.

PEDERSEN, P. N. Effect of number of sperm cells per insemination dose. In: Supplement 1 of the 2nd INTERNACIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, Beltsville, U.S.A. 1991, p. 398.

PETRUNKINA, A. M., VOLKER, G., WEITZE, K. F., BEYERBACH, M., TÖPFER-PETERSEN, E., WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changed in the response of boar semen to capacitating conditions. Theriogenology, v.63, p. 2278-2299, 2005.

PETRUNKINA, A. M., WABERSKI, D., GUNZEL-APEL, A. R., TOPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction, v. 134, p. 3-17, 2007.

POLEZE, E., BERNARDI, M. L., AMARAL FILHA, W. S., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F. P. Consequences of variation in weaning-to-estrus interval on reproductive performance of swine females. Livestock Science, v. 103, p. 124-130, 2006.

POPWELL, J. M. & FLOWERS, L. W. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. Animal Reproduction Science, v. 81, p. 97-113, 2004.

PRUNIER, A., QUESNEL, H., MESSIAS DE BRAGANÇA, M., KERMABON, A. Y. Environmental and seasonal influences on the return-to-oestrus after weaning in primiparous sows: a review. Livestock Production Science, v. 45, p. 103-110, 1996.

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

REED, H. C. B. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. Reproduction in Domestic Animals, Suppl, p. 225-270, 1991.

ROBINSON, J. A. B., BUHR, M. M. Impact of genetic selection on management of boar replacement. Theriogenology, v. 63, p. 668-678, 2005.

ROBINSON, J. A. B., QUINTON, V. M. Genetic parameters of early neo-natal piglet survival and number of piglets born. In: Proceedings of the 70th WORLD CONGRESS GENETICS APPLIED LIVESTOCK PRODUCTION, 2002.

RODRÍGUEZ, A., SANZ, E., DE MERCADO, E., GÓMEZ, E., MARTÍN, M., CARRASCOSA, C., GÓMEZ-FIDALGO, E., VILLAGÓMEZ, D. A. F., SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R. Reproductive consequences of a reciprocal chromosomal translocation in two Duroc boars used to provide semen for artificial insemination. Theriogenology, v. 74, p. 67-74, 2010.

RODRIGUEZ, A. L., RIJSSELAERE, T., VYT, P., VAN SOOM, A., MAES, D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. Reproduction in Domestic Animals, Short Communication, p. 1-4, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? Reproduction in Domestic Animals, v. 41, suppl 2, p. 2-10, 2006.

RUIZ-SÁNCHEZ, A. L., O´DONOGHUE, R., NOVAK, S., DYCK, M. K., COSGROVE, J. R., DIXON, W.T., FOXCROFT, G. R. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. Theriogenology, v. 66, p. 736-748, 2006.

RUVACALBA, J. A.G. Improvement in reproductive performance in pigs with artifical insemination and MR-A long term preservation diluent. In : Proccedings of the 25th ANNUAL MEETING OF AMMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, Nebraska, USA. 1994, p. 1-5.

SAACKE, R. G., DALTON, J. C., NADIR, S., NEBEL, R. L., BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Animal Reproduction Science, v. 60-61, p. 663-677, 2000.

SAFRANSKI, T. J. Genetic selection of boars. Theriogenology, v. 70, p. 1310-1316, 2008.

SCHENKEL, A. C., KUMMER, R., SCHMIDT, A. C. T., FRIES, H. C. C., BERNARDI, M. L., BORTOLOZZO, F. P., WENTZ, I. Caracterização da síndrome do segundo parto em suínos. In : XII CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Fortaleza, CE, Brasil. 2005, p. 252-253.

STAHLBERG, R., HARLIZIUS, B., WEITZE, K. F., WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilitzing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. Theriogenology, v. 53, p. 1365-1373, 2000.

SUTKEVICIENE, N., ANDERSSON, M. A., ZILINSKAS, H., ANDERSSON, M. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. Theriogenology, v. 63, p. 739-747, 2005.

TARDIF, S., LAFOREST, J. P., CORMIER, N., BAILEY, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. Theriogenology, v. 52, p. 447-459, 1999.

TSAKMAKIDIS, I. A., LYMBEROPOULOS, A. G., KHALIFA, T. A. A. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. Journal of Veterinary Science, v. 11, p. 151-154, 2010.

VAN DER BRAND, H., DIELEMAN, S. J., SOEDE, N. M., KEMP, B. Dietary energy source at two feeding levels during lactation of primiparous sows: Effects on glucose, insulin and luteinizing hormone and on follicle development, weaning-to-oestrus interval and ovulation rate. Journal of Animal Science, v. 78, p. 396-404, 2000.

VONNAHME, K. A., WILSON, M. E., FOXCROFT, G. R., FORD, S. Impacts on conceptus survival in a commercial swine herd. Journal of Animal Science, v.80, p. 553-559, 2002.

VYT, P., MAES, D., QUINTEN, C., RIJSSELAERE, T., DELEY, W., AERTS, M., DE KRUIF, A., VAN SOOM, A. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. Flemic Veterinary, v. 77, p. 291-298, 2008.

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, v. 76, p. 3079-3089, 1998.

WABERSKI, D., WEITZE, K. F., GLEUMES, T., SCHWARZ, M., WILLMEN, T., PETZOLDT, R. Effect of time insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. Theriogenology, v. 42, p. 831-840, 1994.

WABERSKI, D., MAGNUS, F., ARDON, F., PETRUNKINA, A. M., WEITZE, K. F., TÖPFER-PETERSEN, E. Binding of boar spermatozoa to oviductual epithelium *in vitro* in relation to sperm morphology and storage time. Reproduction, v. 131, p. 311-318, 2006.

WABERSKI, D. Critical steps from semen collection to insemination. Proccedings of the ANNUAL MEETING OF THE EU-AI-VETS, Ghent, Belgium. 2009, p. 66-69.

WABERSKI, D., HENNING, H., PETRUNKINA, A. M. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. Reproduction in Domestic Animals, v. 46, p. 45-48, 2011.

WABERSKI, D., SCHAPMANN, E., HENNING, H., RIESENBECK, A., BRANDT, H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. Theriogenology, v. 75, p. 337-345, 2011.

WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reproduction Domestic Animal, v. 36, p. 135-140, 1996.

WEITZE, K. Long-term storage of extended boar semen. In : Supplement 1 of the 2nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, Beltsville, U.S.A. 1991, p. 231-253.

WILSON, M. R., DEWEY, C. E. The associations between weaning-to-estrus interval and sow efficiency. Swine Health and Production, v. 1, p. 1015, 1993.

WILSON, M. E., BIENSEN, N. J., YOUNGS, C. R., RFORD, S. P. Development of Meishan and Yorkshire littermate conceptuses in either a Meishan or Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. Biology of Reproduction, v. 58, p. 905-910, 1998.