



Tecnologias aplicadas no exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade

Technologies used in the assessment of boar ejaculate to produce high quality semen doses

Mari Lourdes Bernardi

INTRODUÇÃO

A avaliação rotineira dos ejaculados suínos para a preparação de doses inseminantes tem resultado em garantia de qualidade principalmente em termos de motilidade e morfologia espermática. No entanto, esta avaliação não traz informações a respeito do número mínimo de espermatozoides necessários para atingir o máximo de fertilidade, do tempo que o sêmen mantém a sua capacidade fecundante ou da taxa de prenhez e tamanho de leitegada que podem ser alcançados com as amostras de sêmen avaliadas [9]. Devido ao crescente aumento na utilização da Inseminação Artificial (IA) na indústria suína, há interesse na identificação de machos com fertilidade subótima [23] para descartá-los ou reduzir seu uso [28]. Além disto, a identificação de machos com alta fertilidade poderia resultar em uso de doses com menor número de espermatozoides, sobretudo em machos de alto valor genético, sem perda de produtividade [45].

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* para prever a fertilidade do sêmen [43,44]. Análises da morfologia e motilidade progressiva são exames rotineiros para avaliar a qualidade do sêmen em centrais de IA. Essas avaliações permitem detectar amostras de baixa qualidade que resultam em diminuição da fertilidade, mas a associação direta de seus valores, com os níveis de fertilidade *in vivo*, tem produzido resultados inconsistentes, o que coloca em dúvida a sua utilização para a diferenciação do potencial de fertilidade de machos, sobretudo quando os ejaculados satisfazem as exigências mínimas de qualidade para uso na IA [45]. Avanços na área de análise de sêmen por sistema computadorizado têm auxiliado na avaliação quantitativa de características da motilidade [23]. Também, o uso de corantes fluorescentes ou compostos conjugados a corantes fluorescentes permite que vários atributos espermáticos (integridade da membrana, *status* do acrossoma, integridade da cromatina e função mitocondrial) possam ser avaliados, com rapidez, em grande número de espermatozoides, por citometria de fluxo.

Como o sucesso da fecundação não pode ser atribuído somente ao número absoluto de espermatozoides morfológicamente normais, móveis e viáveis, mas mais especialmente à sua competência funcional, tem sido proposto que monitorar sua habilidade de adaptação às mudanças nas condições osmóticas, de ligação ao epitélio do oviduto e condições de capacitação podem representar aspectos cruciais da função espermática [38]. A expectativa é de que os testes que avaliam a capacidade funcional dos espermatozoides, isto é, sua habilidade em se capacitar, apresentar a reação acrossômica e fecundar, trariam resultados mais exatos e preditivos, pois estariam simulando mais o que acontece *in vivo*. Exemplos dessas avaliações incluem ligação ou penetração na zona pelúcida (ZP) homóloga ou heteróloga, ligação a proteínas solubilizadas da ZP e a fecundação *in vitro* de oócitos. No entanto, mesmo estes testes têm mostrado resultados controversos quanto à predição da fertilidade.

É quase impossível avaliar a célula espermática na forma como foi ejaculada visto que, para a inseminação artificial propriamente dita ou para a realização dos testes, os espermatozoides são submetidos a uma série de manipulações. Além da diluição e resfriamento, vários procedimentos usados nos testes podem, por si só, modificar a função espermática por possíveis danos às membranas espermáticas, organelas ou DNA [44]. Como algumas características seminais são melhores indicadores qualitativos do que quantitativos da fertilidade do sêmen, desco-

brir machos subférteis pode ser mais fácil do que discriminar os que estão acima de um determinado patamar de fertilidade [16]. Por isto, ainda não há métodos simples e rápidos que sejam adequados para uso rotineiro nas centrais de IA para identificar a maioria dos machos subférteis. Tem sido proposto que esta dificuldade existe porque os ejaculados ou doses de sêmen são compostos por várias subpopulações espermáticas, as quais diferem no que se refere aos atributos tais como motilidade ou morfologia, mas também na capacidade dos espermatozóides em manterem 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 [44].

No presente trabalho são descritos os resultados de estudos nos quais diversas características espermáticas ou respostas da interação espermatozóide-oócito têm sido investigadas como possíveis estimadores da fertilidade *in vivo*. Também são efetuadas considerações a respeito de fatores que podem interferir na exatidão das avaliações, *in vitro* ou *in vivo*, e conseqüente prejuízo para o valor preditivo da fertilidade.

I - MOTILIDADE

A motilidade é um atributo importante para o deslocamento espermático no trato reprodutivo e para a penetração no oócito. Por ser um exame simples, rápido, de baixo custo e bom indicador da integridade e funcionalidade das membranas [16], a avaliação subjetiva da motilidade espermática é o principal parâmetro utilizado para selecionar os ejaculados. Pelo fato da fertilidade ser comprometida, caso a motilidade esteja abaixo de 60% [14], este valor é usualmente utilizado como referência para a seleção das doses de sêmen a serem usadas na IA de suínos. Quando o percentual de espermatozóides móveis está acima de 60% e são utilizadas doses inseminantes com dois bilhões ou mais de espermatozóides, a motilidade espermática parece não ser um bom preditor da fertilidade *in vivo* [14,34,39,56]. De fato, uma baixa correlação foi observada entre a motilidade espermática e a taxa de parto ou tamanho da leitegada, em inseminações efetuadas com três bilhões de espermatozóides, mesmo que a motilidade tenha sido, dentre os vários parâmetros analisados, incluída como componente significativo em todos os modelos de análise multivariada estudados [18].

Quando há maior variação nas características seminais, a associação com os dados de fertilidade parece ser mais facilmente detectada. Gadea et al. [17] separaram os ejaculados de quatro machos de acordo com a taxa de parição, nos seguintes grupos: baixa (0-20%), intermediária (40-60%) e alta (80-100%) fertilidade. Cabe ressaltar que os ejaculados de baixa fertilidade apresentavam, em média, 43% de espermatozóides com defeitos, em contraste com 11% no grupo de alta fertilidade. A motilidade foi menor no grupo baixa fertilidade em comparação aos grupos intermediária e alta fertilidade. Além disto, a motilidade esteve correlacionada com o tamanho da leitegada e taxa de parto, quando foi analisada em modelos de regressão, junto com outras características seminais.

A análise de doze características relativas à motilidade dos espermatozóides, efetuada com sistema computadorizado CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), mostrou que nenhuma delas teve correlação com a fertilidade *in vivo*, após inseminações heterospérmicas [4]. O sistema CASA também foi utilizado para avaliar várias características de motilidade e sua possível relação com a fertilidade de 12 machos [23] cuja taxa média de não retorno ao estro foi 86% (80 a 89%) e leitegada média de 10 leitões (9-12 leitões). O percentual de espermatozóides móveis não diferiu entre o grupo de machos com taxa de concepção acima e abaixo de 86%. No entanto, machos com maior taxa de concepção tiveram maior percentual de espermatozóides com movimento linear, mas com menor velocidade média. Já os machos com maior tamanho da leitegada (>10 leitões) tiveram maior percentual de motilidade.

A avaliação do sêmen, logo após a coleta, parece ser menos discriminatória do que a avaliação efetuada após algum tempo de incubação dos espermatozóides, em solução para indução da capacitação, na tentativa de mimetizar parte do processo fisiológico que ocorre *in vivo*. Foi estudada a associação de medidas da qualidade espermática com a taxa de concepção e tamanho da leitegada, após IA com doses de 1,5 bilhão de espermatozóides [24]. Oito características de motilidade foram avaliadas com sistema CASA, durante diferentes tempos de incubação dos espermatozóides (0, 2, 4 e 6 horas), sendo o período de duas horas considerado o mais adequado. A mudança na velocidade espermática e a magnitude da velocidade nas duas primeiras horas de incubação foram as variáveis mais relacionadas com a fertilidade.

A motilidade, avaliada após um certo período de armazenamento *in vitro*, parece trazer informações mais confiáveis quanto ao potencial fecundante, embora em alguns estudos isto não tenha sido confirmado. Não foi observada correlação entre a motilidade espermática de 12 machos, ao longo de oito dias de armazenamento *in vitro*, com a taxa de parto ou o tamanho da leitegada [56]. No entanto, em estudo de fertilidade de 106 machos, a motilidade inicial não apresentou correlação com a taxa de retorno e tamanho da leitegada, mas a motilidade no

sétimo dia de armazenamento apresentou correlação significativa com o tamanho da leitegada, em fêmeas múltiparas inseminadas com doses de aproximadamente 2,7 bilhões de espermatozoides [28]. No estudo de Sutkeviciene et al. [51] o percentual de motilidade foi avaliado de forma subjetiva e, também, com sistema CASA. As avaliações de motilidade foram efetuadas também após teste de estresse com metanol, que consistiu em expor 200 ml de sêmen a vários volumes de metanol (1, 5, 10, 20 e 40 ml) por 10 minutos, em temperatura ambiente, para avaliar a inibição da motilidade, os danos na integridade da membrana plasmática e a despolarização mitocondrial. Foi verificada correlação positiva entre a taxa de não retorno ao estro, aos 60 dias após IA, e a motilidade, com ou sem estresse com metanol, tanto na avaliação subjetiva como na efetuada por sistema computadorizado, no primeiro e sétimo dias de armazenamento do sêmen. Quando os espermatozoides não foram submetidos a estresse com metanol, os valores de correlação foram maiores na análise do sétimo dia em relação ao primeiro. Além disto, os machos foram separados em grupos de baixa fertilidade e alta fertilidade. As taxas de não retorno ao estro foram diferentes entre os dois grupos (75% vs 85%). Os machos de alta fertilidade apresentaram maiores percentuais de motilidade nas seguintes avaliações: motilidade subjetiva no sétimo dia, motilidade avaliada por CASA no primeiro e sétimo dias de armazenamento e motilidade avaliada por CASA no primeiro dia após estresse com metanol. Ruiz-Sanchez et al. [45] avaliaram nove machos cuja qualidade seminal foi considerada alta (>80% de motilidade progressiva e >85% de espermatozoides normais) e usaram doses inseminantes com menor número de espermatozoides por dose (1,5 bilhão) para melhor diferenciar os machos. 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 [45].

Juonala et al. [28] sugerem que os machos jovens deveriam apresentar no mínimo 45% de espermatozoides móveis, após resfriamento e armazenamento *in vitro* por sete dias, antes de serem aceitos para IA. Além disto, todos os machos usados para IA deveriam ser testados, desta forma, pelo menos uma vez por ano e sempre que a qualidade seminal diminuir. Assim, a avaliação da motilidade sob resfriamento por sete dias seria um teste simples, de execução rápida e de baixo custo, para excluir machos subfêrteis.

Pelo fato de que a baixa motilidade pode ser, pelo menos, parcialmente, compensada por maior número de espermatozoides [46] deve haver melhor discriminação da fertilidade dos machos e sua associação com características seminais, mesmo para machos que preenchem os requisitos mínimos para serem utilizados como doadores de sêmen nas centrais de IA. O percentual de espermatozoides móveis, avaliados de forma subjetiva em microscopia ótica, foi correlacionado positivamente com a fertilidade *in vivo* de nove machos, usados em fêmeas inseminadas com doses de sêmen com concentração subótima (0,3 bilhão de espermatozoides), mas não com o uso de doses com três bilhões de espermatozoides [52].

II - MORFOLOGIA

A análise morfológica do sêmen é um parâmetro importante de qualidade e, de modo geral, permite descartar ejaculados ou machos que ultrapassam um determinado nível de anormalidades. Para machos que estão dentro dos padrões tolerados de anormalidades, a morfologia espermática parece ter valor limitado para predição da fertilidade. De fato, no estudo de Alm et al. [2] a morfologia foi correlacionada com a taxa de não retorno ao estro, quando machos com >30% espermatozoides com defeitos foram mantidos na análise. Quando somente os machos com >70% de espermatozoides normais foram analisados, não houve correlação entre morfologia espermática e taxa de não retorno ao estro. Nesse caso, somente o tamanho da leitegada de fêmeas múltiparas foi negativamente influenciado pelo percentual de espermatozoides anormais [2]. Em ejaculados com média de 15,5% de defeitos, foi calculada uma diminuição de 0,2% na taxa de não retorno ao estro, de 0,5% na taxa de parto e de 0,08 leitão nascido para um aumento de 20% a 30% no percentual de anormalidades [13].

A integridade do acrossoma é essencial para a fecundação e sua avaliação pode ser efetuada logo após a coleta do sêmen ou após teste de resistência osmótica, que consiste em determinar o percentual de acrossomas intactos após incubação em meio hiposmótico. O percentual de acrossomas intactos foi correlacionado com o tamanho da leitegada e maior percentual de acrossomas intactos foi observado no grupo de ejaculados de alta fertilidade em comparação aos de baixa fertilidade [17]. Em outros estudos, no entanto, não houve relação da fertilidade com o percentual de acrossomas intactos [18,34,39]. A integridade do acrossoma após choque hiposmótico foi correlacionada com a fertilidade *in vivo* no estudo de Gadea et al. [17], mas não no de Perez-Llano et al. [34].

Machos com diferenças na taxa de parto e tamanho da leitegada não diferiram em termos de percentuais de espermatozoides com cabeças ou caudas normais [39]. No entanto, em inseminações efetuadas com doses de

dois bilhões de espermatozóides, o percentual de espermatozóides normais foi responsável por 59% na variação do tamanho da leitegada [56]. Além do percentual de defeitos espermáticos estar correlacionado negativamente com o tamanho da leitegada, maior percentual de defeitos foi verificado no grupo de ejaculados de baixa fertilidade em comparação aos de fertilidade intermediária e alta [17].

A fertilidade, sobretudo o tamanho da leitegada, foi negativamente influenciada pelo aumento de gotas citoplasmáticas [57]. No estudo de Gadea et al. [18], o percentual de gota citoplasmática proximal (GCP) foi incluído como componente significativo e associado com a taxa de parto, em modelo multivariado de regressão logística. No modelo de regressão linear, para análise da associação de características seminais com o tamanho da leitegada, o total de anormalidades, o percentual de caudas edemaciadas e o percentual de espermatozóides com GCP tenderam a ser significativos. No entanto, considerando todos os modelos de análise utilizados, os valores de correlação foram baixos, implicando em baixo percentual do total da variância da taxa de parto ou do tamanho da leitegada podendo ser predito a partir dos componentes de qualidade seminal avaliados.

O fato de que a presença de gotas citoplasmáticas esteja associada com a fertilidade pode, talvez, ser explicada pelas observações de que o percentual de espermatozóides com gota citoplasmática ou de espermatozóides com defeitos estão negativamente correlacionados com a capacidade de ligação ao epitélio do oviduto [35]. Foi constatado menor índice de ligação às células do oviduto em machos com maior percentual de alterações morfológicas e com maior percentual de gotas, mostrando que espermatozóides com esta alteração têm menor participação na formação do reservatório espermático *in vivo* [54].

Sutkeviciene et al. [51] classificaram os espermatozóides em quatro grupos: normais, com defeitos principais, com gotas proximais e com defeitos secundários. Não houve correlação entre os percentuais dessas categorias e a fertilidade, mas quando os machos foram separados pelo nível de fertilidade, o grupo de machos mais férteis apresentou menor percentual de defeitos principais.

Com apoio de sistema computadorizado, foi investigada a possível relação entre a morfometria da cabeça espermática e a fertilidade *in vivo* [23]. Os resultados foram opostos para as duas variáveis de fertilidade estudadas, sendo observadas cabeças menores e menos alongadas nos machos com maior taxa de concepção, mas cabeças maiores e mais alongadas nos machos com maior tamanho da leitegada. Além disto, considerando os machos individualmente, a taxa de não retorno ao estro foi correlacionada negativamente e positivamente, respectivamente, com o comprimento da cabeça e com a proporção entre largura e comprimento da cabeça espermática.

III - INTEGRIDADE DA MEMBRANA

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para o metabolismo e função espermática. A integridade da membrana espermática pode ser avaliada com a coloração eosina-nigrosina ou com uso de corantes fluorescentes. A avaliação se baseia na capacidade de membranas intactas impedirem ou não a entrada de determinados corantes nos compartimentos internos dos espermatozóides, permitindo, assim, separar as células com membrana íntegra.

A viabilidade espermática, determinada com eosina-nigrosina [17,18,52], com os corantes fluorescentes Hoechst 33258 [4] ou diacetato de carboxifluoresceína [18], não foi correlacionada com a fertilidade *in vivo*. O percentual de espermatozóides com membrana íntegra, após coloração com diacetato de carboxifluoresceína, permitiu discriminar ejaculados de baixa e alta fertilidade, mas não os de fertilidade intermediária [17]. Com sete dias de armazenamento do sêmen *in vitro*, no entanto, a integridade da membrana plasmática foi correlacionada com a taxa de não retorno ao estro, em fêmeas de várias ordens de parto ou com o tamanho da leitegada de primíparas [28] e múltiparas [51].

IV - FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA FRENTE A ESTRESSE OSMÓTICO

Em resposta a uma solução hiposmótica, ocorre entrada de fluido nos espermatozóides, os quais apresentam edema e dobram ou enrolam a cauda. Esta é a base para testar a funcionalidade da membrana espermática pelo teste Hiposmótico (HOS), o qual se constitui em um teste simples, barato e de fácil execução [16]. Os resultados do teste HOS foram correlacionados com o tamanho da leitegada além de ter sido constatado menor percentual de espermatozóides com membrana osmoticamente ativa no grupo de ejaculados que resultaram em baixa taxa de parto [17]. A resposta ao teste HOS também permitiu a correta predição da taxa de parto em 68,3% dos casos [34] e as respostas espermáticas, tanto ao choque hiposmótico quanto à passagem de meio hiperosmótico para osmótico, estiveram relacionadas com a taxa de concepção, quando incluídas em modelos de regressão logística [40].

Pelo fato da mudança de volume não poder ser acompanhada ou quantificada no teste HOS convencional, foi desenvolvido um teste que permite, com contador eletrônico de células, monitorar a mudança de volume quando espermatozoides são colocados em meio hipotônico. Este teste mede a habilidade reguladora osmótica dos espermatozoides, isto é, o grau de recuperação do volume após a célula ter edemaciado em condições hipotônicas. Com este tipo de avaliação, foi observada maior capacidade de regulação de volume, de espermatozoides expostos à solução hipotônica por 20 minutos, nos machos férteis em comparação aos subférteis [36]. Teoricamente, a capacidade de regulação do volume reflete a manutenção de volume celular adequado durante estresse iônico, não somente por ocasião da ejaculação, mas também durante congelamento e descongelamento [38].

V - INTEGRIDADE DA CROMATINA

A estrutura e funcionalidade do núcleo espermático são de grande importância para a fertilidade [16]. A integridade da cromatina pode ser avaliada pelo grau de susceptibilidade do DNA à desnaturação *in situ* induzida, por exemplo, por pH baixo. O DNA de espermatozoides com estrutura anormal de cromatina são mais suscetíveis à desnaturação ácida e a avaliação da integridade é efetuada após coloração com laranja de acridina. Se o corante se intercala na dupla hélice de DNA (nativo) fluoresce em verde enquanto o DNA associado à hélice simples (desnaturado) fluoresce em vermelho. A integridade da cromatina foi avaliada por citometria de fluxo em seis machos de fertilidade conhecida. Seis combinações de três machos cada foram utilizadas em inseminações heterospérmicas com o uso de igual quantidade de espermatozoides para cada macho. A análise da integridade da cromatina permitiu a correta predição dos três machos de alta e dos três machos de baixa fertilidade, com base na proporção de leitões que estiveram fora do percentual teórico esperado [11]. A avaliação da integridade da cromatina pode ser altamente preditiva de falha na fecundação, mas não necessariamente capaz de prever o nível de fertilidade, quando esta característica está dentro do nível aceito como normal [25]. De fato, machos suínos de fertilidade considerada dentro dos padrões normais apresentaram valores baixos (variação de 0 a 9%) no índice de fragmentação de DNA [47]. Recentemente, em avaliação de três ejaculados, de 145 machos de três raças (Hampshire, Landrace e Large White), foi observada redução de 0,5 a 0,9 leitão no tamanho da leitegada a partir de machos com índice de fragmentação de DNA acima de 2,1%, mas não foi possível estabelecer um nível mínimo de fragmentação que pudesse orientar o descarte de machos subférteis [5].

VI - CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA

A reação acrossômica (RA) pode ser espontânea ou induzida pela presença de ZPs homólogas, ZPs solubilizadas, proteínas da ZP ou cálcio ionóforo. A coloração com corantes fluorescentes como a clortetraciclina ou com lectinas conjugadas a corantes fluorescentes permite determinar o *status* do acrossoma, isto é, se os espermatozoides apresentam alterações semelhantes às que ocorrem durante a capacitação e reação acrossômica.

Holt et al. [24] avaliaram a indução da RA pela incubação dos espermatozoides em solução contendo ZPs solubilizadas ou na presença de cálcio ionóforo. Não houve correlação direta entre o percentual de espermatozoides com RA e a taxa de concepção ou tamanho da leitegada. No entanto, a ocorrência espontânea ou induzida de RA foi significativa quando os ejaculados foram separados em grupos que resultaram em maior ou menor tamanho da leitegada. Grupos com maior tamanho da leitegada foram associados com menor ocorrência de RA, provavelmente indicando que menor número de espermatozoides estarão aptos para a fecundação, em ejaculados nos quais esta reação ocorrer prematuramente. Com o uso de dose inseminante subótima (0,3 bilhão de espermatozoides), a fertilidade *in vivo* foi correlacionada positivamente com o percentual de espermatozoides que mostraram padrão de RA, quando corados com clortetraciclina. No entanto, a importância biológica desta relação é questionável visto que houve uma variação de apenas 0 a 2% nesta variável, nas amostras de sêmen avaliadas [52]. Em análise com citômetro de fluxo, foi constatada variação entre machos (21% a 39,5%) no percentual de espermatozoides com RA induzida e sua correlação significativa com a taxa de parto [50].

Em condições *in vitro* foram observadas, pelo menos duas, subpopulações de espermatozoides, os que apresentam RA rápida e aqueles que respondem mais lentamente, os quais se acredita que poderiam ter maior potencial fecundante *in vivo* [21]. Não só a ocorrência da capacitação importa, mas também a dinâmica deste evento já que há um conflito entre a desestabilização decorrente da capacitação e a subsequente sobrevivência espermática. É provável que a capacidade fecundante deva ser estimada a partir da velocidade de capacitação como uma resposta ótima, dentro de certos limites e de um certo tempo, mais do que como uma resposta máxima

e rápida [38]. Petrunkina et al. [37] monitoraram a dinâmica temporal da resposta de ejaculados de machos férteis e subférteis às condições de capacitação *in vitro* na presença de cálcio ionóforo. Foi observada maior heterogeneidade na resposta dos machos subférteis, dentre os quais foram detectados os com baixa e os com alta resposta, o que pode indicar que a subfertilidade estaria associada com uma resposta subótima às condições de capacitação, a qual pode ser muito rápida ou muito lenta, em comparação à resposta de machos férteis. No futuro, deverão ser estabelecidos tanto limites inferiores quanto superiores para que a resposta adequada possa ser determinada.

VII - LIGAÇÃO À ZONA PELÚCIDA, PENETRAÇÃO DE OÓCITOS E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação é um processo complexo que envolve uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos e vários atributos espermáticos são necessários para seu sucesso. Estes eventos consistem das capacidades de aumentar a motilidade (hiperativação), capacitação, reação acrossômica, penetração na ZP, ligação à membrana plasmática do oócito, penetração no ooplasma e formação do pró-núcleo masculino. Vários testes efetuados *in vitro* são utilizados para avaliar as características espermáticas diretamente relacionadas com o processo de interação com a ZP e fecundação. Os testes de ligação ou penetração na ZP, além da fecundação *in vitro* (FIV) propriamente dita, têm sido estudados como possíveis preditores da fertilidade das amostras de sêmen ou de machos. A FIV é o método que mais mimetiza as interações que ocorrem entre os gametas masculino e feminino *in vivo* e poderia ser considerado como o teste mais informativo para avaliar o potencial fecundante dos espermatozóides *in vivo*. No entanto, ainda é questionável se os testes que medem atributos relacionados com a interação entre os gametas são efetivos na predição da fertilidade de machos cuja qualidade seminal está dentro dos valores aceitos para uso na IA.

A ligação dos espermatozóides a proteínas da ZP é essencial não somente para sua interação com o oócito, mas também para indução da reação acrossômica. Assim, a habilidade dos espermatozóides em responder a condições de capacitação *in vitro*, pelo aumento na capacidade de ligação a proteínas solubilizadas da ZP, pode estar relacionada com o potencial de fecundação *in vivo*. Harkema et al. [22] avaliaram a capacidade de ligação espermática a proteínas solubilizadas da ZP, sob condições de capacitação *in vitro*, em 12 machos. Desses machos, foram selecionados quatro, dois com maior e dois com menor percentual de espermatozóides com capacidade de ligação a proteínas da ZP. Subdoses com 0,5 bilhão de espermatozóides, desses quatro machos, foram usadas para inseminar fêmeas e o percentual de oócitos fecundados foi avaliado cinco dias após a ovulação. Foi verificada correlação entre o percentual de espermatozóides com alta capacidade de ligação a proteínas da ZP e o percentual de fêmeas com 100% dos oócitos fecundados *in vivo*.

O teste de ligação competitiva à ZP consiste em coincubar oócitos com uma mistura de espermatozóides de dois machos, após terem sido corados com corantes fluorescentes diferentes. A vantagem deste teste é que os espermatozóides de ambos os machos têm a chance de se ligar aos mesmos oócitos, o que permite controlar a variação observada entre grupos de oócitos. Este teste foi utilizado para verificar se a capacidade de ligação à ZP de espermatozóides de 11 machos suínos estava relacionada com a fertilidade *in vivo* [6]. Os machos foram comparados de forma pareada e foi constatada variação significativa entre eles na capacidade de ligação à ZP. O número de espermatozóides ligados por oócito foi correlacionado com o tamanho da leitegada, mas não com a taxa de parto, em inseminações com três bilhões de espermatozóides. Em outro estudo, foi avaliada a capacidade de ligação competitiva à ZP, em 15 machos, os quais possuíam registros históricos com variação de 64 a 94% na taxa de parto e de 9,1 a 11,4 leitões, entre eles. No entanto, não houve correlação do número de espermatozóides ligados por oócito com os dados históricos de taxa de parto ou tamanho da leitegada [10]. Inseminações heterospérmicas são consideradas mais exatas que as homospérmicas para reduzir o efeito da variabilidade de fêmeas e aumentar a habilidade de detectar diferenças de fertilidade entre os machos [49]. Mesmo assim, a ligação competitiva à ZP *in vitro* não foi correlacionada com a fertilidade competitiva *in vivo*, isto é, com o número de leitões em cada leitegada com paternidade definida para cada macho, resultantes de inseminações heterospérmicas [10].

A penetração na ZP representa um importante obstáculo a ser enfrentado pelos espermatozóides para conseguirem fecundar o oócito. De modo geral, o teste de penetração *in vitro*, de oócitos homólogos ou heterólogos, tem apresentado correlação com a fertilidade *in vivo*, sobretudo quando machos com grande variação de fertilidade são avaliados. Por exemplo, foi constatada maior taxa de penetração e maior número de espermatozóides ligados a oócitos suínos maturados *in vitro*, em cinco machos subférteis em comparação com cinco machos férteis [27]. A fertilidade *in vivo* de 12 machos, utilizados em pares para inseminações heterospérmicas, foi relacionada com a capacidade de fusão com oócitos de hamster livres de ZP, ligação à ZP de oócitos suínos, indução da reação acrossômica, integridade da membrana mitocondrial, além de características de motilidade [4]. De todas as variá-

veis relativas à qualidade ou capacidade funcional dos espermatozóides, apenas a capacidade de penetração de oócitos de hamster livres da ZP apresentou alta correlação com a fertilidade *in vivo*. Em outro estudo, várias características seminais foram avaliadas (motilidade, morfologia, viabilidade, integridade e funcionalidade da membrana) juntamente com a realização do teste de penetração *in vitro* de oócitos suínos imaturos [17]. A taxa de penetração *in vitro* diferiu entre os grupos de ejaculados de baixa, intermediária e alta taxa de parição, além do maior coeficiente de correlação ter sido observado entre a taxa de penetração *in vitro* e o tamanho da leitegada. Já Martinez et al. [33] não constataram correlação com o tamanho da leitegada, mas houve correlação entre a taxa de penetração de oócitos imaturos *in vitro* com a taxa de parto.

Há controvérsias quanto à possibilidade de utilizar os resultados de variáveis avaliadas na FIV como indicadores da fertilidade *in vivo*. Machos suínos (n=12) com diferenças nas características de FIV (taxa de penetração, número de espermatozóides por oócito, percentual de polispermia, taxa de formação do pró-núcleo masculino, percentual de oócitos com formação dos dois pró-núcleos) não tiveram diferenças na taxa de parto [56]. Também não foi observada associação entre a taxa de penetração monospermica e a taxa de parto [39]. Já em estudo com pequeno número de machos (n= 5) e de fêmeas inseminadas (n= 45) com sêmen congelado, os dois machos com menor taxa de penetração de oócitos foram os com menor taxa de parição (33%), em contraste com os outros três machos que tiveram taxas de parto acima de 80% [48]. Dentre as características avaliadas na FIV de nove machos, a taxa de formação do pró-núcleo masculino foi a variável que contribuiu, respectivamente, para 17% e 12% na variação da taxa de parto e do índice de fertilidade, o qual foi calculado pela divisão do total de leitões nascidos pelo número de fêmeas inseminadas por macho [45].

Embora, em alguns estudos, os resultados de FIV não estejam associados com o tamanho da leitegada [39,56], a taxa de embriões com dois pró-núcleos e o número de espermatozóides por oócito foram positivamente correlacionados com o tamanho da leitegada, quando foram utilizadas doses inseminantes respectivas de três e dois bilhões de espermatozóides [56]. Em outro estudo, a taxa de penetração de oócitos foi correlacionada positivamente com o tamanho da leitegada [48].

Deve ser considerado que os resultados de FIV dependem do protocolo utilizado e da estabilidade de laboratórios, tornando as comparações entre estudos e o controle da variação de difícil execução. Além disto, deve ser lembrado que, como na maioria dos testes de interação entre oócito e espermatozóide, as condições não são as mesmas que ocorrem sob condições fisiológicas *in vivo* [44]. Desta forma, as variáveis de qualidade seminal usadas para estimar a fertilidade *in vivo* não são, necessariamente, as melhores para serem utilizadas na otimização dos resultados *in vitro* e vice-versa [39]. Embora tenha potencial para ser mais precisa que os demais testes, a FIV possui elevado custo e demora na execução, o que ainda a distancia muito das exigências para uso em condições de produção comercial [16].

VIII - NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES ACESSÓRIOS

Outra medida que pode ser utilizada para avaliar o potencial de fertilidade, tanto em fecundação *in vitro* quanto *in vivo*, é a contagem dos espermatozóides acessórios, partindo da premissa que eles preenchem os requisitos estruturais e fisiológicos necessários para o deslocamento no trato reprodutivo feminino bem como para reconhecimento, ligação e penetração parcial da ZP [16]. Quando doses inseminantes com reduzido número de espermatozóides (um bilhão) foram utilizadas em uma única inseminação, um dos dois machos (macho B) deu origem a maior número de leitões que o outro (macho A) que foi usado simultaneamente, em inseminações heterospermicas. Em inseminações homospermicas, a taxa de fecundação foi semelhante entre os dois machos, mas maior número de espermatozóides acessórios foi observado nas inseminações com sêmen do macho B [49], mostrando que esta variável pode ser um indicador sensível do número de espermatozóides com capacidade fecundante, presentes no oviduto [3]. No entanto, Harkema et al. [22] também usaram número reduzido de espermatozóides (0,5 bilhão) em inseminações homospermicas, mas o número de espermatozóides acessórios não diferiu entre machos com maior e menor capacidade de ligação a proteínas solubilizadas da ZP e, também, não foi correlacionado com o percentual de oócitos fecundados.

IX - LIGAÇÃO A EXPLANTES OU CÉLULAS DO OVIDUTO

Em estudos *in vitro*, com explante de tecido tubárico [54] ou suspensão de células de oviduto livres [12,19], somente espermatozóides com acrossoma intacto e não capacitados foram capazes de aderir às células de oviduto, enquanto que os já capacitados apresentaram reduzida capacidade de adesão. Como a ligação ao epitélio do

oviduto resulta em estabilização e aumento da sobrevivência num ambiente hostil, a capacidade de ligação dos espermatozoides às células do oviduto, para formar o reservatório espermático, é considerado um aspecto funcional importante no que diz respeito à capacidade fecundante [38]. Diferenças na fertilidade de machos podem ser causadas por diferenças na capacidade de formar o reservatório espermático no istmo. Menor capacidade de adesão às células epiteliais de explantes de oviduto foi observada nos espermatozoides de quatro dos cinco machos de subfertilidade conhecida [54], o que abre a possibilidade de utilização de ensaios de ligação espermatozoide-oviduto como ferramenta para a avaliação da fertilidade de machos.

X - OUTRAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E A FERTILIDADE DE MACHOS SUÍNOS

O conteúdo de ATP [17,28,52], a produção de lactato [40], a integridade da membrana mitocondrial [4] ou o percentual de espermatozoides com atividade normal da acrosina [39] não foram correlacionados com a fertilidade *in vivo*. Os níveis de IGF-I ou IGF-II, no plasma seminal, não foram relacionados com a qualidade espermática ou com a fertilidade [23]. Níveis de cátions (cálcio, sódio, potássio, zinco e magnésio) no plasma seminal não foram correlacionados com o tamanho da leitegada e não diferiram entre ejaculados de fertilidade baixa, intermediária e alta [17].

XI - EM BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES DE FERTILIDADE

A busca de marcadores moleculares para fertilidade também tem sido objeto de estudos na espécie suína. Parte da dominância de paternidade, em casos de inseminações heterospérmicas, se explica por fatores presentes no plasma seminal visto que a proporção de leitões oriundos de um macho dominante foi menor quando seus espermatozoides foram misturados ao plasma seminal de um macho não dominante. O contrário também ocorreu, isto é, o percentual de paternidade para um macho não dominante aumentou quando seu sêmen foi misturado ao plasma seminal de um macho dominante [14]. Ao estudar o efeito da adição de plasma seminal, autólogo ou homólogo, sobre a viabilidade de sêmen diluído, foi constatada diferença entre machos, quanto ao efeito benéfico ou não do plasma seminal, o que abre perspectivas para o estudo dos fatores presentes no plasma seminal que possam estar associados com a qualidade seminal e/ou fertilidade [7].

Genes que codificam para proteínas de proteção ao choque térmico [26], receptor de GnRH, inibina beta A e inibina beta B [30] têm sido associados com maior qualidade do sêmen, o que poderia influenciar o potencial de fertilidade. Em outros estudos, genes que codificam para fosfogliceratoquinase de origem testicular [8], alfa-actinina 1 [55], beta-actina [29], acrosina e osteopontina [31], ubiquitina e 15-lipoxigenase [32] têm sido investigados como possíveis candidatos para marcadores de fertilidade.

XII - FATORES QUE INTERFEREM NA EXATIDÃO DA AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS *IN VITRO* E DA FERTILIDADE *IN VIVO*

Quando o mesmo número de espermatozoides é usado para a inseminação pode haver diferença no tamanho da leitegada entre machos. Além disto, o número mínimo de espermatozoides para atingir o máximo de leitões difere entre machos [15], o que reforça a idéia de que as características seminais importantes para a eficiência reprodutiva *in vivo* podem ser divididas em compensáveis e não compensáveis, conforme discutido por Saacke et al. [46]. As características compensáveis são as que podem prejudicar a interação entre os gametas e o início da fecundação, podendo ser citados, como exemplos, baixa motilidade, defeitos de cauda, gotas citoplasmáticas e leves distorções do formato da cabeça. O prejuízo na fertilidade, advindo dessas alterações espermáticas, pode ser compensado pelo aumento do número de espermatozoides na inseminação. A presença de vacúolos nucleares ou defeitos na cromatina são exemplos de características que podem impedir a continuidade da fecundação ou a embriogênese normal, não sendo compensáveis pelo aumento do número de espermatozoides. Assim, as possíveis associações entre atributos espermáticos e a fertilidade de machos é mais dificilmente detectada quando elevado número de espermatozoides é utilizado na IA, pois a baixa qualidade referente a algumas características seminais pode estar sendo compensada. Este é um dos pontos fracos das avaliações *in vivo*, pois o uso excessivo de espermatozoides por inseminação pode compensar algum fator de subfertilidade e mascarar o valor preditivo do teste.

A dificuldade de detectar associação entre a fertilidade *in vivo* e algumas características espermáticas como a motilidade pode ser reflexo da pequena variação destas características em machos férteis [4,56]. O valor

preditivo de alguns testes pode ser limitado quando a pré-seleção, por critérios de concentração, motilidade ou morfologia, exclui ejaculados ou machos de baixa qualidade seminal. A pré-seleção dos ejaculados, o elevado número de espermatozóides por dose, enfim, a elevada qualidade do sêmen usado nos programas de IA, contribuem para a redução na variabilidade das características seminais. Desta forma, diminui a probabilidade de detectar diferenças na fertilidade dos machos que estejam associadas às características seminais [16,18].

Deve ser levado em conta que há variação na qualidade espermática entre ejaculados de um mesmo macho [37], o que implica na necessidade de usar maior número de ejaculados para que a avaliação seja representativa e confiável. Além disto, a fertilidade de um mesmo macho pode mudar ao longo do tempo, o que diminui a validade de predição dos testes [16,43].

Nos testes laboratoriais, é avaliada uma amostra representativa de todos os espermatozóides [16] embora o ejaculado seja heterogêneo, isto é, composto de várias subpopulações espermáticas [1,40], as quais, sob condições de capacitação *in vitro*, mostraram mudanças no padrão de motilidade atingindo um percentual específico de cada subpopulação, mas sem alterar a estrutura específica das subpopulações iniciais [41]. Considerando a heterogeneidade do ejaculado, suas respostas frente ao agente capacitante bicarbonato [1] e o fato de que somente uma minoria de espermatozóides do ejaculado consegue preencher todos os requisitos para a fecundação, Holt & Van Look [25] propõem que, quando ejaculados de dois ou mais machos suínos são misturados e expostos ao bicarbonato naturalmente presente no trato reprodutivo da fêmea, a proporção relativa de espermatozóides mais ativos vai ser diferente nas subpopulações de cada ejaculado. Os ejaculados com maior proporção de espermatozóides ativos terão vantagens em termos de fertilidade. Neste contexto, mesmo que a motilidade seja avaliada com métodos sofisticados, a mesma poderá não ser informativa, a não ser que seja levada em conta a heterogeneidade do ejaculado. Assim, no futuro, para terem maior valor preditivo da fertilidade, é necessário que seja possível incluir nos testes laboratoriais a avaliação das características da subpopulação espermática com maior potencial fecundante [16,25,40]. A capacidade de regular o volume celular, a capacidade de ligação ao epitélio do oviduto e a capacidade de realizar a capacitação, em tempo e de forma adequados, são três características com caráter promissor para avaliar a fertilidade de machos, visto que revelam a heterogeneidade que há dentro de um ejaculado e as mesmas são relevantes para o estabelecimento do reservatório espermático e subsequente fecundação [38].

Deve ser lembrado que a variação nos dados de fertilidade também depende de fatores relacionados ao processamento e armazenamento do sêmen (tipo de diluente, envelhecimento *in vitro*, etc), às diferenças intrínsecas de fertilidade das fêmeas (qualidade de oócitos, condições do oviduto e útero, etc) e às diferenças no manejo da detecção do estro e momento da inseminação, que podem resultar em envelhecimento dos espermatozóides *in vivo* [3]. Quanto mais eficientes forem as técnicas de detecção do estro e se a inseminação for efetuada em momento ótimo, menor será a contribuição desses elementos de variação e o valor discriminatório dos métodos de avaliação de sêmen deverá ser mais significativo [24].

Uma das razões de não ter sido encontrado um teste útil 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 espermatozóides. Além disto, as relações entre as características seminais e 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 outros machos. Portanto, é possível que para cada macho um ou alguns desses aspectos sejam o limitante para a ocorrência da fecundação [39]. Por isto, a inclusão de várias variáveis espermáticas, em análises multivariadas de regressão, tem sido considerada mais adequada para a discriminação do potencial de fertilidade dos machos [38,40,42]. Análises multivariadas ajudam a melhor discriminar o potencial de fertilidade porque combinam informações de diversos atributos espermáticos [18,40]. Dentre as diversas variáveis avaliadas por Gadea et al. [17], o modelo de regressão com a inclusão da taxa de penetração *in vitro*, motilidade e motilidade progressiva explicou 30% da variação no tamanho da leitegada. No modelo de regressão logística, além das três variáveis citadas, foram acrescentadas outras como o conteúdo de ATP, espermatozóides com acrossoma intacto e espermatozóides viáveis, pela coloração de eosina-nigrosina, o que permitiu explicar 31% na variação taxa de parto. Surpreendentemente, em outro estudo, as diferenças entre antes e após o congelamento do sêmen, nas variáveis motilidade, acrossomas normais, taxa de penetração de oócitos de hamster livres de ZP e número de espermatozóides ligados aos oócitos foram incluídas em modelo de regressão múltipla e explicaram 94% do índice heterospermico de fertilidade [20], o qual, no entanto, se restringe aos aspectos relativos à paternidade da leitegada,

mas não à taxa de concepção. Petrunkina et al. [37] mostraram que 66% da variação na taxa de parto foi explicada por modelo de regressão com inclusão de três variáveis (morfologia, integridade de membrana e espermatozoides com elevação de cálcio intracelular em resposta à indução de reação acrossômica), enquanto quatro variáveis (motilidade, morfologia, integridade de membrana e percentual de espermatozoides com reação acrossômica) explicaram 48% da variação do tamanho da leitegada. No estudo de Collins et al. [10], o modelo com as variáveis motilidade, morfologia, acrossomas normais, presença de gota citoplasmática distal e número de espermatozoides ligados à ZP, foi significativo para explicar a fertilidade resultante de inseminações heterospérmicas. A motilidade e morfologia tiveram o maior efeito na fertilidade, seguidas pela capacidade de ligação à ZP, *status* do acrossoma e presença de gota citoplasmática distal, embora esta última tenha tido apenas efeito marginal. Dentro do contexto do uso de análises multivariadas, alguns aspectos moleculares tais como níveis de citoquinas, proteínas de proteção contra o choque térmico (proteínas HSP) e o *status* oxidativo do plasma seminal têm sido propostos como características a serem incluídas em futuros estudos, junto com as medidas tradicionais, na tentativa de melhorar a estimativa de fertilidade [53].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O impacto econômico de diferenciar a fertilidade de machos advém do fato de eliminar ou limitar o uso de machos menos férteis. Seria também possível usar doses com menor número de espermatozoides para machos comprovadamente de alta fertilidade. No entanto, visto que cada teste traz uma informação diferente da competência funcional dos espermatozoides, ainda não há um teste que discrimine com exatidão os machos de alta fertilidade.

De modo geral, os resultados têm sido controversos e em poucos trabalhos têm sido detectados valores altos de correlação entre características seminais ou respostas espermáticas funcionais e a fertilidade *in vivo*. Dificilmente um único teste será exato para estimar o potencial de fertilidade visto que não mede todos os atributos qualitativos e funcionais necessários para a fecundação e desenvolvimento embrionário normal, que ocorrem *in vivo*. De modo geral, as condições de realização dos testes ou avaliações, *in vitro*, não conseguem reproduzir as condições *in vivo*, sobretudo no que diz respeito à interação do gameta masculino com o trato reprodutivo feminino e com o oócito. Por isto, a análise combinada de vários atributos espermáticos apresenta potencial preditivo maior. No entanto, é necessário definir quais são os atributos ou funções espermáticas que mais podem contribuir para a estimativa de fertilidade.

Algumas avaliações *in vitro*, mesmo que promissoras, necessitam de aparelhos de custo elevado. Visto o custo de equipamentos, a complexidade ou demora na realização de determinadas avaliações ou testes, o valor preditivo de fertilidade terá que ser alto para justificar o uso de tal tecnologia em situação comercial. As centrais de IA têm relutado em investir nestes itens a menos que os resultados sejam garantidos.

REFERÊNCIAS

- 1 **Abaigar T., Holt W.V., Harrison R.A.P. & Del Barrio G. 1999.** Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*. 60: 32-41.
- 2 **Alm K., Peltoniemi O.A.T., Koskinen E. & Andersson M. 2006.** Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 210-213.
- 3 **Ardón F., Evert M., Beyerbach M., Weitze K-F. & Waberski D. 2005.** Accessory sperm: a biomonitor of boar sperm fertilization capacity. *Theriogenology*. 63: 1891-1901.
- 4 **Berger T., Anderson D.L. & Penedo M.C.T. 1996.** Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Animal Reproduction Science*. 44: 231-239.
- 5 **Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D., Nielsen M.B.F. & Hedeboe A.M. 2008.** Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69: 728-736.
- 6 **Braundmeier A.G., Demers J.M., Shanks R.D. & Miller D.J. 2004.** The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *Journal of Animal Science*. 82: 452-458.
- 7 **Caballero I., Vazquez J.M., Centurión F., Rodríguez-Martínez H., Parrilla I., Roca J., Cuello C. & Martínez E.A. 2004.** Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 370-375.
- 8 **Chen K., Knorr C., Moser G., Gatphayak K. & Brenig B. 2004.** Molecular characterization of the porcine testis-specific phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) gene and its association with male fertility. *Mammalian Genome*. 15: 996-1006.

- 9 Colenbrander B., Gadella B., Feitsma H. & Woelders H. 2000. Semen quality assessment, present and future. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Boar Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.35-41.
- 10 Collins E.D., Flowers W.L., Shanks R.D. & Miller D.J. 2008. Porcine sperm zona binding ability as an indicator of fertility. *Animal Reproduction Science*. 104: 69-82.
- 11 Evenson D.P., Thompson L. & Jost L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 41: 637-651.
- 12 Fazeli A., Duncan A.E., Watson P.F. & Holt W.V. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction*. 60: 879-886.
- 13 Feitsma H., Bergsma R. & Ducro-Steeverink D.W. 2006. The effect of morphological abnormal cells on sow fertility. In: *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress* (Copenhagen, Denmark). p.545.
- 14 Flowers W.L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52: 67-78.
- 15 Flowers W.L. 2002. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. *Journal of Animal Science*. 80 (Suppl 1): 47-53.
- 16 Gadea J. 2005. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*. 63: 431-444.
- 17 Gadea J., Matas C. & Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration hIVP/assay. *Animal Reproduction Science*. 56: 95-108.
- 18 Gadea J., Sellés E. & Marco M.A. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 39: 303-308.
- 19 Green C.E., Bredl J., Holt W.V., Watson P.F. & Fazeli A. 2001. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells *in vitro*. *Reproduction*. 122: 305-315.
- 20 Hammitt D.G., Martin P.A. & Callanan T. 1989. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*. 32: 385-399.
- 21 Harkema W., Harrison R.A.P., Miller N.G.A., Topper E.K. & Woelders H. 1998. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biology of Reproduction*. 58: 421-430.
- 22 Harkema W., Visser I., Soede N.M., Kemp B. & Woelders H. 2004. Capacity of boar spermatozoa to bind zona pellucida proteins *in vitro* in relation to fertilization rates *in vivo*. *Theriogenology*. 61: 227-238.
- 23 Hirai M., Boersma A., Hoeflich A., Wolf E., Föll J., Aumüller R. & Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology*. 22: 104-110.
- 24 Holt C., Holt W.V., Moore H.D.M., Reed H.C.B. & Curnock R.M. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*. 18: 312-323.
- 25 Holt W.V. & Van Look K.J. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*. 127: 527-535.
- 26 Huang S.Y., Chena M.Y., Lin E.C., Tsou H.L., Kuo Y.H., Ju C.C. & Lee W.C. 2002. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*. 70: 99-109.
- 27 Ivanova M. & Mollova M. 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*. 40: 397-410.
- 28 Juonala T., Lintukangas T.S., Nurtila T. & Andersson M. 1998. Relationship Between semen quality and fertility in 106 AI-boars. *Reproduction in Domestic Animals*. 33: 155-158.
- 29 Lin C.L., Jennen D.G.J., Ponsuksili S., Tholen E., Tesfaye D., Schellander K. & Wimmers K. 2006. Haplotype analysis of beta-actin gene for its association with sperm quality and boar fertility. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123: 384-388.
- 30 Lin C.L., Ponsuksili S., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K. & Wimmers K. 2006. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Animal Reproduction Science*. 92: 349-363.
- 31 Lin C.L., Tholen E., Jennen D.G.J., Ponsuksili S., Schellander K. & Wimmers K. 2006. Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 538-543.
- 32 Lovercamp K.W., Safranski T.J., Fischer K.A., Manandhar G., Sutovsky M., Herring W. & Sutovsky P. 2007. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology*. 67: 704-718.
- 33 Martínez E., Vázquez J.M., Roca J., Blanco O., Lucas X., Matás C. & Gil M.A. 1998. Relationship between homologous *in vitro* penetration assay and boar semen fertility [abstract]. In: *Theriogenology*. 49: 371.
- 34 Pérez-Llano B., Lorenzo J.L., Yenes P., Trejo A. & García-Casado P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*. 56: 387-398.
- 35 Petrunkina A.M., Gehlhaar R., Drommer W., Waberski D. & Töpfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium *in vitro*. *Reproduction*. 121: 889-896.
- 36 Petrunkina A.M., Harrison R.A.P., Ekhlasi-Hundrieser M. & Töpfer-Petersen E. 2004. The role of volume-sensitive osmolyte and anion channels in volume regulation by mammalian spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 10: 815-823.
- 37 Petrunkina A.M., Volker G., Brandt H., Töpfer-Petersen E. & Waberski D. 2005. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 64: 1766-1782.
- 38 Petrunkina A.M., Waberski D., Günzel-Apel A.R. & Töpfer-Petersen E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*. 134: 3-17.

- 39 Popwell J.M. & Flowers W.L. 2004. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Animal Reproduction Science*. 81: 97-113.
- 40 Quintero-Moreno A., Rigau T. & Rodríguez-Gil J.E. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*. 61: 673-690.
- 41 Ramio L., Rivera M.M., Ramirez A., Concha I.I., Pena A., Rigau T. & Rodríguez-Gil J.E. 2008. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction. *Theriogenology*. 69: 501-512.
- 42 Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*. 38: 312-318.
- 43 Rodríguez-Martínez H. 2005. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: *Anais do 16º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* (Goiânia, Brasil). Palestra 019. 1 CD-ROM.
- 44 Rodríguez-Martínez H. 2006. Can we increase the estimative value o semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*. 41 (Suppl 2): 2-10.
- 45 Ruiz-Sánchez A.L., O'Donoghue R., Novak S., Dyck M.K., Cosgrove J.R., Dixon W.T. & Foxcroft G.R. 2006. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*. 66: 736-748.
- 46 Saacke R.G., Dalton J., Nadir S., Bame J. & Nebel R.L. 1998. Spermatozoal characteristics important to sperm transport, fertilization and early embryonic development. In: *Proceedings of the 50th ICAR Anniversary Special Celebrating Conference* (Milan, Italy). pp.320-335.
- 47 Saravia F., Nunez-Martinez I., Morán J.M., Soler C., Muriel A., Rodríguez-Martínez H. & Pena F.J. 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*. 68: 196-203.
- 48 Sellés E., Gadea J., Romar R., Matás C. & Ruiz S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 38: 66-72.
- 49 Stahlberg R., Harlizius B., Weitze K.F. & Waberski D. 2000. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology*. 53: 1365-1373.
- 50 Stähr B., Berg C., Bechtold D. & Müller K. 2000. Relations between the amount of in-vitro-capacitated sperm cells after liquid-preservation and the fertility of AI-boars. In: *Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction* (Stockholm, Sweden). p.152.
- 51 Sutkeviciene N., Andersson M.A., Zilinskas H. & Andersson, M. 2005. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology*. 63: 739-747.
- 52 Tardif S., Laforest J.-P., Cormier N. & Bailey J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*. 52: 447-459.
- 53 Turba M.E., Fantinati P., Bernardini C., Gentilini F., Bacci M.L. & Forni M. 2007. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Animal Reproduction Science*. 99: 72-81.
- 54 Waberski D., Magnus F., Ardón F., Petrunkina A.M., Weitze K.F. & Töpfer-Petersen E. 2006. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium *in vitro* in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction*. 131: 311-318.
- 55 Wimmers K., Lin C.L., Tholen E., Jennen D.G.J., Schellander K. & Ponsuksili S. 2005. Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *Animal Genetics*. 36: 152-155.
- 56 Xu X., Pommier S., Arbov T., Hutchings B., Sotto W. & Foxcroft G.R. 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal of Animal Science*. 76: 3079-3089.
- 57 Zeuner A. 1992. On the relations between sperm morphology and the fertility of boar semen. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction* (The Hague, The Netherlands). pp.1617-1619.