



Desafios e estratégias para identificação de machos subférteis em rebanhos suínos

Challenges and strategies for identification of subfertile boars

Matheus Schardong Lucca¹, Laura dos Santos¹, Mayara de Souza Costa Tamanini¹, Ana Paula Gonçalves Mellagi¹, Fernando Pandolfo Bortolozzo¹, Rafael da Rosa Ulguim^{1E}

¹Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Resumo

A subfertilidade de reprodutores suínos pode alcançar até 15% dos machos em um plantel, gerando perdas econômicas pela menor taxa de parto e menor número de leitões nascidos totais. O uso de doses ou inseminações heterospermicas e o elevado número de espermatozoides para compensar características espermáticas do ejaculado, dificultam o diagnóstico desses machos na rotina produtiva. Além disso, há uma baixa associação dos exames espermáticos realizados nas centrais de produção de sêmen com os resultados *in vivo*. Ao longo dos anos, avaliações com a implementação dos sistemas computadorizados de análise de sêmen, proteômica do plasma seminal ou célula espermática, inseminação artificial em tempo fixo e a classificação dos machos pela capacidade de preservação das doses de sêmen durante o armazenamento foram metodologias utilizadas para classificar e identificar machos subférteis. O conhecimento de estratégias para classificação dos machos quanto a fertilidade pode auxiliar na tomada de decisão dos reprodutores a serem descartados e otimização dos melhores machos, proporcionando melhorias no desempenho reprodutivo.

Palavras-chave: reprodutor, inseminação, andrologia, subfertilidade.

Abstract

*Boar subfertility reach up to 15% of the males in a herd, which represent economic losses due to the lower farrowing rate, and fewer total piglets born. The use of heterospermic semen doses, heterospermic inseminations and the high number of sperm cells is used to compensate sperm characteristics of the ejaculates making difficult to identify these males in the productive routine. Furthermore, there is a low association of sperm analysis performed in the boar studs with *in vivo* results. Over the years, with the implementation of computerized systems for semen analysis, proteomics of seminal plasma or sperm cell, fixed-time artificial insemination, and classification of boars based on capacity for semen preservation during storage, were methodologies used to classify and identify subfertile boars. The knowledge of strategies for classification of boars regarding fertility aid the decision for culling or for optimizing the best boars allow an improvement on the reproductive performance. can help in the decision-making of breeders to be discarded and those where the user should be optimized, thus providing improvements in reproductive performance.*

Keywords: boar, insemination, andrology, subfertility.

Introdução

A produção de suínos caracteriza-se pela capacidade evolutiva em proporcionar melhorias na taxa de parto (TP) e no número total de leitões nascidos (TN). Os frequentes avanços no desempenho reprodutivo são relacionados entre eles ao nível de tecnificação das granjas, ao melhoramento genético, à sanidade e à inovação de processos e tecnologias voltadas à inseminação artificial (IA). A IA está consolidada na produção de suínos (Bortolozzo et al., 2015), sendo seu uso estimado em mais de 93% dos países produtores de suínos (Schulze et al., 2019). Devido ao amplo uso da IA, há uma maior necessidade de implementar medidas qualitativas de avaliação dos parâmetros seminais e dos reprodutores. Assim, deve-se considerar que um único macho tem impacto individual maior do que uma fêmea sobre a eficiência reprodutiva da atividade suínica (Ruiz-Sánchez et al., 2006).

A realização de múltiplas inseminações em fêmeas suínas, somado ao número elevado de espermatozoides nas doses inseminantes (DI) podem mascarar a observação de machos subférteis (Roca

¹Correspondência: rafael.ulguim@ufrgs.br

Recebido: 25 de outubro de 2021

Aceito: 08 de novembro de 2021



et al., 2016). Isso acontece devido a compensação de algumas características espermáticas através do aumento do número de espermatozoides na DI (Flowers, 2013). A redução no número de espermatozoides por fêmea inseminada é um processo que gradualmente vem sendo implementado na produção de suínos. Isso pode ampliar a observação de problemas de subfertilidade em machos que anteriormente eram considerados de alta fertilidade, quando usado DI convencionais - 3 bilhões de células espermáticas (Ruiz-Sánchez et al., 2006; Flowers, 2013).

O exame *in vitro* dos ejaculados é um dos métodos de avaliação dos reprodutores. Metodologias clássicas de avaliação da qualidade espermática permitem ao examinador fazer uma declaração prévia sobre a qualidade do ejaculado, em apto ou inapto, para utilização em programas de IA (Kummer et al., 2013). Contudo, estas avaliações não têm sido capazes de identificar os reprodutores subfêrteis (Popwell e Flowers, 2004), mesmo utilizando tecnologias como o sistema CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*) e a citometria de fluxo para avaliação seminal (Foxcroft et al., 2010). Flowers et al. (1997) sugerem um padrão mínimo de 60% de motilidade espermática para a IA. No entanto, de forma preventiva a eventuais falhas reprodutivas utiliza-se um padrão mínimo aceitável de 70% para motilidade espermática. A grande similaridade dos resultados dos testes *in vitro* entre os indivíduos dificulta a identificação daqueles reprodutores subfêrteis (Kummer et al., 2013). Portanto, existe a necessidade de estabelecer métodos capazes de identificar reprodutores que de maneira subclínica afetam a produtividade dos rebanhos suínos.

Essa revisão tem por objetivo definir a subfertilidade, demonstrar estimativas percentuais de machos subfêrteis, estimar o impacto no desempenho reprodutivo e quais métodos e estratégias podem ser utilizados para identificar a subfertilidade nas centrais de produção de sêmen (CPS).

Subfertilidade: definições e estimativas percentuais

A subfertilidade pode ser definida como a diminuição da capacidade fecundante, incluindo baixo número de células espermáticas e baixa qualidade seminal (Broekhuijse et al., 2012). A identificação precoce e subsequente remoção de reprodutores menos férteis é uma prioridade para as CPS (Roca et al., 2015). Não há um critério definido para classificar um macho subfêrtil. Classificações baseadas na qualidade seminal seria a forma mais aplicada a ser utilizada para identificação de machos subfêrteis. Porém, de acordo com Roca et al. (2015) os machos 10% superiores e 10% inferiores possuíam diferenças de 2-3% na TP e 0,5-0,6 TN, mesmo com padrões espermáticos aceitáveis. As diferenças pareçam pequenas, porém possuem um forte impacto econômico negativo nos sistemas produtivos (Roca et al., 2015). Outra possibilidade é definir a redução de produtividade baseado nos indivíduos que destoam em reduções de taxa de parto e nascidos totais frente a outros machos, baseado em ranqueamento e nos percentis ou quartis das distribuições observadas.

Estimativas do percentual de machos subfêrteis variam de acordo com os métodos de análises utilizados para identificação desses indivíduos, podendo ser de 5 a 7% (Roca et al., 2015) até 10 a 15% dos reprodutores no plantel (Patterson et al., 2011). Para a identificação de reprodutores subfêrteis é necessária a realização de uma série de análises combinadas de diversos parâmetros seminais, para possibilitar uma estimativa mais exata do potencial fecundante do sêmen (Reis et al., 2018). Embora os trabalhos tenham dificuldade em explorar alguns fatores, devemos considerar que a variabilidade na fertilidade entre os machos reprodutores é multifatorial e pode ser relacionada ao indivíduo ou às linhagens genéticas (Flowers, 2013).

Impactos no desempenho reprodutivo

Para as CPS, a relação entre a qualidade do sêmen e os resultados de fertilidade é um indicador importante a ser avaliado (Broekhuijse et al., 2011). Mesmo considerando que as falhas de fertilidade possam ser causadas tanto pela fêmea quanto pelo macho (Flowers, 2013), o impacto no desempenho reprodutivo do rebanho é maior quando há problemas de fertilidade no reprodutor (Smital, 2009). O impacto da fertilidade de um doador de sêmen sobre o desempenho reprodutivo do plantel é alto. Portanto, a predição da fertilidade do reprodutor tem grande importância econômica para os rebanhos suínos (Gadea et al., 2004), visto que a IA é amplamente utilizada.

Alguns estudos buscaram comparar o desempenho reprodutivo entre machos e observaram indivíduos de menor fertilidade. De acordo com Williams et al. (2011), o uso de 2 bilhões de espermatozoides na DI de leitoas submetidas à IA intracervical indicou uma amplitude de 64,8 a 100,0% na TP e 9,46 a 14,28 TN entre os machos. Em um estudo utilizando múltiparas com o uso de 2 bilhões de



espermatozoides na DI e deposição intracervical, observaram machos com menor TP (89,7%) e TN (11,9) em comparação a outros indivíduos com TP de 97,8% e TN de 14,1 (Kummer et al., 2013). Resultados semelhantes também foram observados por Ruiz-Sanchez et al. (2006), onde a utilização de 1,5 bilhão de espermatozoide na DI resultou em diferenças maiores de 10% na TP e de 1 TN entre diferentes machos. Observa-se que a redução de espermatozoides por DI pode permitir que os machos subfêrteis sejam identificados com maior eficácia.

A identificação de machos subfêrteis permite removê-los do rebanho ou a redução de seu uso. Estimativas indicam que a remoção de 10% dos reprodutores menos férteis, resultaria em mais de 223 TN por 100 fêmeas inseminadas, o que equivale a um ganho econômico de mais de 10.000 euros/ano em uma granja com 1000 fêmeas (Roca et al., 2015). Por outro lado, a possibilidade de identificar os melhores machos em termos de fertilidade, permitiria a busca de alternativas para otimizar o uso desses indivíduos, como redução do número de espermatozoides nas DI (Juonala et al., 1998; Hirai et al., 2001; Ruiz-Sánchez et al., 2006), ou aplicação estratégica desses machos na segunda IA do cio, considerando ser a dose responsável pela maior parte da fecundação (Vesseur et al., 1996).

Principais desafios no diagnóstico de machos subfêrteis

Na rotina prática da IA, situações como o uso de doses heterospermicas e de múltiplas inseminações com doses homospermicas de machos distintos (IA heterospermicas) impossibilitam rastrear individualmente os machos de menor fertilidade. As doses heterospermicas permitem uma distribuição similar no número de espermatozoides de diferentes machos, minimizando os efeitos individuais de fertilidade. Da mesma forma, o uso de IA heterospermica também busca tornar aleatório o efeito de machos de menor fertilidade.

As metodologias clássicas usadas para identificação da fertilidade dos reprodutores através de testes *in vitro* acabam identificando somente reprodutores nitidamente de baixa fertilidade. Alguns desses testes são rotineiramente realizados nas CPS, como a motilidade, que avalia o movimento da célula espermática, e a morfologia espermática que fornece uma estimativa do funcionamento do epitélio seminífero e da função epididimária (Gadea, 2005; Bernardi, 2008). Além disso, outros parâmetros de avaliação do ejaculado, como volume e intervalo entre coletas, também não demonstram associação com a TP e TN (Jung et al., 2015).

Alguns trabalhos apresentaram associação da motilidade espermática (Broekhuijse et al., 2012; Kummer et al., 2013), morfologia (Schulze et al., 2013; Mcpherson et al., 2014) e integridade de membrana (Juonala et al., 1998) com parâmetros de fertilidade. Entretanto, somente estas avaliações espermáticas não são capazes de identificar os reprodutores subfêrteis. Todavia, os testes *in vitro* da qualidade seminal constituem um desafio de diagnóstico por possuírem moderada correlação com os resultados de fertilidade *in vivo* para prever ou diagnosticar a subfertilidade (Rodríguez-Martínez, 2003).

Saacke et al. (2000) descreveram duas características espermáticas que afetam a fertilidade do reprodutor: características compensáveis e não compensáveis. As compensáveis são aquelas que podem ser superadas através da utilização de maior concentração de espermatozoides a cada inseminação. Portanto, problemas com motilidade e alguns defeitos morfológicos são compensadas com um aumento de espermatozoides na DI. Já as características não compensáveis são aquelas que não podem ser superadas pelo aumento de espermatozoides na dose, como vacúolos nucleares e na estrutura da cromatina espermática, os quais afetam a fecundação e desenvolvimento embrionário (Foxcroft et al., 2010). O uso da compensação faz com que a redução da fertilidade seja minimizada, no entanto, dificulta o mapeamento da real fertilidade dos reprodutores e o diagnóstico de machos subfêrteis.

Avançar no diagnóstico da fertilidade do reprodutor poderá prover informações para a identificação e rastreamento desses machos subfêrteis e assim removê-los precocemente do rebanho. O refinamento da pesquisa no sentido de facilitar e viabilizar a identificação desses machos subfêrteis é uma necessidade a ser explorada e aplicada no sistema produtivo.

Métodos e estratégias de identificação de machos subfêrteis

Os principais métodos discutidos na literatura para avaliação da fertilidade de reprodutores são: associação da motilidade espermática com os resultados “*in vivo*”, análise utilizando a cinética espermática pelo sistema CASA e mais recentemente a análise proteômica, tanto das células espermáticas quanto do plasma seminal. Avaliar as características de qualidade do ejaculado e relacioná-las com os



dados de fertilidade contribui para o desenvolvimento constante das avaliações (Broekhuijse et al., 2012).

Existem duas metodologias que podem ser empregadas *in vivo* para se obter dados sobre a fertilidade do reprodutor suíno. A primeira metodologia faz a utilização de doses heterospermicas, com a posterior análise de DNA para a identificação da paternidade dos descendentes (Ferreira et al., 2015; Flowers et al., 2016). No entanto, essa metodologia necessita identificar o número exato de leitões de cada reprodutor na leitegada, o que implica em um alto custo de exames de paternidade. O segundo método considera a utilização associada do uso de DI e IA homospermicas. Nesse caso há um ponto crítico em assegurar a realização dos procedimentos e também dos possíveis efeitos sobre o desempenho, devido a diferentes períodos de armazenamento das DI do reprodutor avaliado.

Para mitigar essas limitações, uma das alternativas seria o uso de uma única inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A técnica permite simplificar o processo de realização da IA, registro da informação e ainda pode ampliar a expressão do potencial de fertilidade do reprodutor quando uma única IA é realizada (Foxcroft et al., 2010), com reduzido número de células espermáticas através da inseminação intrauterina. Porém, deve-se considerar que a IATF preconiza a sincronização do ciclo estral e da ovulação através de combinações hormonais. Essa situação implica em custo adicional, além disso, os resultados reprodutivos do uso da IATF em suínos ainda necessitam melhorias em cenários de granjas de alto desempenho. Essas situações limitam a adoção da técnica em escala produtiva (Quirino et al., 2019).

No estudo de Ruiz-Sánchez et al. (2006), utilizando 1,5 bilhão de espermatozoides compensados por morfologia e motilidade (>80%), observou-se diferenças na fertilidade do reprodutor considerando os testes *in vitro* e *in vivo*. No estudo foi possível observar diferença na motilidade progressiva nos dias 3, 7 e 10 de armazenamento das DI de dois reprodutores considerados subfêrteis, refletindo em uma diferença de mais de 15% na TP e mais de 2 TN entre a categoria de fêrteis e subfêrteis. Isso demonstra uma possível associação entre a motilidade ao longo do período do armazenamento da DI com a fertilidade do reprodutor.

Com o avanço dos métodos de análises passou a ser explorada a identificação de biomarcadores no plasma seminal ou nas células espermáticas para fertilidade (Bustamante-Filho et al., 2014; Roca et al., 2020). Mills et al. (2020) categorizaram machos no início de sua vida reprodutiva em quatro classes: alta taxa de parto e total de nascidos, alta taxa de parto com baixo total de nascidos, baixa taxa de parto e total de nascidos e baixa taxa de parto com alto total nascidos. Foram encontradas 56 proteínas de plasma seminal que eram diferencialmente abundantes entre o fenótipo de alta fertilidade e pelo menos um dos três grupos subfêrteis, demonstrando que o perfil proteico do plasma seminal é distinto.

No estudo de Kummer et al. (2013), os defeitos de morfologia e a motilidade espermática avaliadas pelo sistema CASA em sêmen *in natura* e de DI demonstraram ser uma alternativa para discriminar ejaculados e classificá-los de acordo com a sua fertilidade por meio de análise multivariável. Os resultados, considerando 14 machos avaliados, identificaram um macho com baixa fertilidade e dois machos com maior fertilidade, apresentando diferenças entre eles de 8,1% na TP e de 2,2 TN. Parâmetros como motilidade total e progressiva, amplitude lateral da cabeça, presença de gotas citoplasmáticas do sêmen *in natura* e armazenado foram características espermáticas que melhor discriminaram a fertilidade do reprodutor. No entanto, os autores destacam a necessidade de estudos para melhor esclarecer a fertilidade com base nas características seminais (Kummer et al., 2013).

Outra possibilidade é o uso de ferramentas de *Machine Learning*, tecnologia onde os computadores tem a capacidade de aprender de acordo com as respostas esperadas por meio associações de diferentes dados, para auxiliar na decisão de escolha do melhor ejaculado para produção de doses inseminantes. Kamphuis et al. (2020) verificaram que a combinação de dados (resultados do CASA, estimativas de valores reprodutivos e informações meteorológicas) não trouxeram resultados satisfatórios na identificação de um ejaculado de melhor qualidade. Esses parâmetros, portanto, devem ser mais investigados por seu valor potencial ao avaliar a qualidade do macho e na preparação de doses de IA nas CPS.

Lucca et al. (2021), utilizando diluentes de curta ou longa duração, avaliaram a fertilidade de machos considerando a capacidade de preservação das DI. Foram utilizados reprodutores classificados como de baixa e alta capacidade de preservar as DI de acordo com a motilidade progressiva às 120 horas, em diluente de curta duração, e as fêmeas foram submetidas a uma única IATF (~43 fêmeas/macho). As doses de machos de alta preservação apresentaram maior motilidade total no momento da IA (24 h de armazenamento) quando comparado aos machos de baixa preservação, independente do tipo de diluente. A motilidade progressiva dos machos de alta preservação apresentaram maior motilidade quando diluídos em diluente de longa duração. A TP não foi afetada; porém, um menor TN foi observado em machos de



baixa preservação quando comparados com os de alta preservação (14,1 vs. 15,0). Este estudo forneceu a evidência de que a seleção de reprodutores pela motilidade progressiva às 120h de armazenamento, em diluente de curta duração, é um método útil na identificação de machos com menor fertilidade. Além disso se constitui em uma prática simples e pouco onerosa. Apesar do diluente de longa duração aumentar a motilidade espermática não foi capaz de melhorar o desempenho reprodutivo dos machos de baixa preservação.

Considerações finais

Identificar precocemente reprodutores de menor fertilidade pode contribuir para melhorar os índices reprodutivos e diminuir os impactos econômicos causados por essa classe de animais. Devido aos manejos reprodutivos comumente empregados na suinocultura, como o uso de doses ou inseminações heterospermicas, e inseminações com alto número de espermatozoides, o efeito individual da fertilidade é mascarado, tornando difícil a identificação da fertilidade dos indivíduos. Os parâmetros de qualidade seminal comumente realizados não possuem alta acurácia para indicar a fertilidade dos reprodutores. Entretanto, a motilidade ao longo do período de armazenamento pode ser considerada um parâmetro importante.

Referências

- 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. -16, 2008.
- Bortolozzo FP, Menegat MB, Mellagi APG, Bernardi ML, Wentz I.** New Artificial Insemination Technologies for Swine. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p.80–84, 2015.
- Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella B.** Artificial insemination in pigs: Predicting male fertility. *Veterinary Quarterly*, v.32, p.151–157, 2012.
- Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella B.** Field data analysis of boar semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.59–63, 2011.
- Bustamante-Filho IC, Salton GD, Munari FM, Schneider MR, Mattos RC, Laurino JP, Cirne-Lima EO, Jobim MIM.** Recombinant expression and purification of the bovine acidic seminal fluid protein. *Animal Reproduction*, v.11, p.96–103, 2014.
- Ferreira CER, Sávio DB, Guarise AC, Flach MJ, Gastal GDA, Gonçalves AO, Dellagostin OA, Alonso RV, Bianchi I, Corcini CD.** Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, p.1012–1019, 2015.
- Flowers WL.** Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction Fertility*, p. 67-78, 1997.
- Flowers WL.** Sperm characteristics that limit success of fertilisation. *Journal of Animal Science*, v.91, p. 3022–3029, 2013.
- Flowers WL, Deller F, Stewart KR.** Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and seminal plasma proteins in boar fertility. *Animal Reproduction Science*, v.174, p.123–131, 2016.
- Foxcroft GR, Patterson J, Dyck M.** Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry. *Proceedings of the 21st IPVS Congress*. Anais.Vancouver: Hein Jonker Media Management, 2010.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. v.63, p.431-444, 2005.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA.** The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 39, p. 303–308, 2004.
- Hirai M, Boersma A, Hoefflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braun J.** Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head. *Computer*, v.22, p.104–110, 2001.
- Jung M, Rüdiger K, Schulze M.** In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p.20–24, 2015.
- Juonala T, Lintukangas S, Nurttala T, Andersson M.** Relationship between Semen Quality and Fertility in 106 AI-Boars. *Reproduction in Domestic Animals*, v.33, p.155–158, 1998.
- Kamphuis C, Duenk P, Veerkamp RF, Visser B, Singh G, Nigsch A, De Mol RM, Broekhuijse M LWJ.** Machine learning to further improve the decision which boar ejaculates to process into artificial



- insemination doses. *Theriogenology*, v.144, p.112-121, 2020.
- Kummer ABHP, Gaggini TS, Bernardi ML, McManus C, Gonçalves EM, Wentz I, Bortolozzo FP.** Multivariate analyses for determining the association of field porcine fertility with sperm motion traits analysed by computer-assisted semen analysis and with sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.747-754, 2013.
- Lucca MS, Gianluppi RDF, Mellagi APG, BortolozzoFP, Wentz I, Ulguim RR.** Effects of the classification of boars according to progressive sperm motility and the extender type on the reproductive performance of a single fixed-time insemination. *Theriogenology*, v.161, p.120-125, 2021.
- Mepherson FJ, Nielsen SG, Chenoweth PJ.** Semen effects on insemination outcomes in sows. *Animal Reproduction Science*, v.151, p.28-33, 2014.
- Mills KM, Aryal UK, Sobreira T, Minton AM, Casey T, Stewart KR.** Shotgun proteome analysis of seminal plasma differentiate boars by reproductive performance. *Theriogenology*, v.157, p.130-139, 2020.
- Patterson J, Linck L, Williams A, Johnson A, Miller D, Holden N, Dyck M, Foxcroft G.** Increasing the genetic impact of elite boars. *In: Banff Pork Seminar - Advances in Pork Production*, Edmonton, Canada. Edmonton: University of Alberta, p.18-21. 2011.
- Popwell JM, Flowers WL.** 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.
- Quirino M, Pinheiro ARA, Santos JT, Ulguim,RR, Mellagi APG, Bortolozzo FP.** Reproductive performance of fixed-time artificial insemination in swine and factors for the technology success. *Ciência Rural*, v.49, p.1-7, 2019.
- Reis GR, Bernardi ML, Schwarz P, Bortolozzo FP, Wentz I.** Diferença entre machos suínos na manutenção da viabilidade espermática a 17°C. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.30, p.159, 2018.
- Roca J, Broekhuijse MLWJ, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Bolarin A.** Boar Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized? *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p.48-55, 2015.
- Roca J, Parrilla I, Bolarin A, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H.** Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology*, v.86, p.187-193, 2016.
- Roca J, Perez-Patiño C, Barranco I, Padilla LC, Martínez EA, Rodriguez-Martinez H, Parrilla I.** Proteomics in fresh and preserved pig semen: recent achievements and future challenges. *Theriogenology*, v.150, p.41-47, 2020.
- Rodríguez-Martínez H.** Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still Utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.312-318, 2003.
- 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*, v.66, p.736-748, 2006.
- Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, 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.
- Schulze M, Ruediger K, Mueller K, Jung M, Well C, Reissmann M.** Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. *Animal Reproduction Science*, v.140, p.70-76, 2013.
- Schulze M, Jakob U, Jung M, Cabezón F.** Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. *Theriogenology*, v127, p.15-20, 2019.
- Smital, J.** Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, v. 110, p. 335-346, 2009.
- VesseurPC, Kemp B, Den Hartog LA.** Factors influencing the proportion of offspring from a second insemination in sows. *Animal Reproduction Science*, v.41, p.255-265, 1996.
- Williams A, Johnson A, Miller D, Holden N, Patterson,J, Dyck M, Foxcroft G.** Commercial application of reducing semen concentration per dose and single sire evaluation. *In: Allen D. Leman Swine Conference*, Twin Cities, US. Twin Cities: University of Minnesota. p.131-134, 2011.
-