

VALORACIÓN MORFOMÉTRICA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DEL CERDO DOMÉSTICO SEGÚN SU EDAD.

Morphometric Evaluation of Sperm Head of Domestic Pig According their Age.

Armando Quintero-Moreno^{1*}, Decio González-Villalobos¹, José Julián Garde López-Brea^{2,3}, Milagros C. Esteso^{2,3}, María Rocío Fernández-Santos^{2,3}, José L. Carvalho-Crociata¹, Willian Mejía-Silva¹ y Gonzalo León-Atencio⁴

¹Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad del Zulia (LUZ), Apdo. 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela. ²IREC (UCLM-CSIC-JCCM). Campus Universitario s/n, 02071. Albacete, España.

³Sección de Recursos Cinéticos y Ganaderos, IDR (UCLM). Albacete, España. ⁴Empresa privada PROPORCA.

*E-mail: arturo93@cantv.net.

RESUMEN

Se utilizó el Análisis Automatizado de la Morfometría Espermática (ASMA) con el fin de determinar las dimensiones de la cabeza del espermatozoide (DCE) en semen de cerdos domésticos según la edad, además de agrupar las medidas obtenidas en subpoblaciones espermáticas (SP). Se evaluaron 36 muestras de semen fresco y diluido de 20 cerdos los cuales se clasificaron en dos categorías. A: menores de 18 meses de edad y B: mayores de 18 meses de edad. Las DCE (Largo, μm / Ancho, μm / Área, μm^2 y Perímetro, μm) se analizaron en frotis teñidos con Hemacolor[®] mediante Sperm-Class Analyser[®] (SCA) y los valores obtenidos guardados en una base de datos. El procedimiento GLM fue utilizado para evaluar el efecto de la edad del cerdo sobre las DCE y el análisis de agrupamiento (FASTCLUS) para identificar las SP. Los espermatozoides provenientes de cerdos mayores de 18 meses de edad presentaron mayor longitud (8,84 vs. 8,95 μm) que los cerdos menores de 18 meses de edad, sin embargo, las medias correspondientes al ancho (4,44 vs. 4,32 μm), área (33,33 vs. 32,39 μm^2) y perímetro (27,65 vs. 26,3 μm) fueron más pequeñas en los cerdos de mayor edad. Dos SP fueron obtenidas con el fin de ratificar las diferencias observadas entre las 2 categorías de edades evaluadas ($P < 0,001$). La población que incluyó los espermatozoides con las mayores dimensiones disminuyó de 41,61% en cerdos menores de 18 meses a 20,78% en cerdos mayores de 18 meses. Contrariamente, la SP que contenía los espermatozoides de menor tamaño incrementó de un 58,39% en cerdos menores de 18 meses a 79,22% en cerdos mayores de 18 meses. En conclusión, la edad de los cerdos influye significativamente sobre las DCE. Los cerdos de mayor edad tie-

nen 20% más de espermatozoides de menor tamaño que los cerdos más jóvenes.

Palabras clave: Espermatozoide, cerdo doméstico, morfometría, edad, subpoblaciones espermáticas.

ABSTRACT

Assisted Sperm Morphometry Analysis (ASMA) was used to determine the sperm head dimensions (DCE) of boar by age, and then the data set clustered in sperm subpopulations (SP). To this purpose were evaluated 36 fresh and diluted semen samples of 20 Daland domestic pigs, which were classified in 2 categories: under 18 months old and over 18 months old. The DCE (Length, μm / Width, μm /, Area, μm^2 / and Perimeter, μm) were analyzed in slides stained by Hemacolor[®] by the Sperm-Class Analyser[®] (SCA), and the mean measurements recorded. A GLM procedure was performed to evaluate the effects of boar age on sperm head dimensions and clustering analysis (FASTCLUS procedure) to separate in SP. Spermatozoa collected from older boar (over 18 months old) had head length larger (8.84 vs. 8.95 μm) than younger boar (under 18 months old), however, the width (4.44 vs. 4.32 μm), area (33.33 vs. 32.39 μm^2) and perimeter (27.65 to 26.3 μm) were smaller in older boar than younger boar. Two SP were clustered in this trial to ratify the differences between younger and older pigs. The mean values of each DCE among the SP were significantly different ($P < 0.001$). Thus, the percentage of representation of the subpopulation that includes those spermatozoa whose dimensions are the largest decreased from 41.61% in pigs under 18 months old to 20.78% in pigs over 18 months old. Whereas, the percent of representation of the SP containing the smallest spermatozoa increased from 58.39% in pigs under 18 months old to

79.22% in pigs over 18 months old. In conclusion, the age of sexually mature domestic male pig had a significant effect on the morphometric traits of their spermatozoa. Older boar had 20% more of smaller spermatozoa than younger boar.

Key words: Spermatozoa, domestic pig, morphometry, age, sperm subpopulations.

INTRODUCCIÓN

La valoración rutinaria del semen, incluyendo la morfología espermática ha sido tradicionalmente incluida en el análisis seminal clásico. Un eyaculado con un incremento de las anomalías espermáticas es indicativo de una fertilidad disminuida en muchas especies, incluyendo al cerdo (*Sus scrofa domestica*) [7]. La necesidad de incrementar el nivel tecnológico para obtener espermogramas objetivos de excelente calidad y prognosis ha derivado en la creación de sofisticados programas computarizados, capaces de realizar análisis de diversos parámetros seminales, que incluyen la motilidad y la morfología espermática. El análisis automatizado de la morfología espermática (Automated Sperm Morphology Analysis -ASMA-) determina el tamaño y la forma del espermatozoide de una manera objetiva y reproducible [2] siendo utilizada desde hace algún tiempo de manera experimental para determinar las dimensiones individuales de los espermatozoides de cerdos [9, 12, 13, 18, 19], además de hacer posible la separación de los espermatozoides de una muestra seminal en subpoblaciones [13, 19].

Existen muchos factores genéticos y ambientales que pueden incidir sobre la calidad seminal y la fertilidad de un eyaculado; entre ellos se destaca la edad del animal [12, 13]. La producción de semen y su calidad se pueden ver notablemente afectada por la edad del verraco [3]. Los parámetros de calidad seminal van mejorando paulatinamente a medida que el cerdo completa su desarrollo sexual, lo cual está asociado con el desarrollo de los testículos (que determina el número de espermatozoides) y con el desarrollo de las glándulas sexuales anexas, que inciden sobre el volumen del eyaculado [4, 11].

En esta investigación, mediante el análisis computarizado de la morfometría espermática, se busca describir y comparar las dimensiones de la cabeza espermática de cerdos domésticos clasificados en 2 categorías según su edad. Como segundo objetivo, se agruparán los espermatozoides valorados en 2 subpoblaciones, de acuerdo a sus dimensiones de la cabeza, con el fin de observar si hay cambios según el incremento de edad del cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de los animales y colección de semen

El estudio se realizó en una granja comercial (PROPORCA) ubicada en el municipio San Francisco del estado Zulia,

Venezuela; coordenadas 10°30'45"N y 71°45'42"O, en una zona agro ecológica caracterizada como bosque seco tropical [6]. Se utilizaron eyaculados pertenecientes a 20 verracos de la línea genética sintética Dalland Tempo (TOPIGS), alojados en ambiente controlado de confort higrotérmico (Chore time 2529,676, modelo 8-B1.5) y agrupados en 2 categorías según su edad (A: ≥ 10 meses y ≤ 18 meses, B: >18 meses y ≤ 30 meses). La extracción de semen fue realizada mediante manipulación manual [10] cada 5 días, desechando y filtrando la fracción inicial o gelatinosa del eyaculado. El semen fue evaluado al momento de la colección, cuantificando su volumen, observando la motilidad y la presencia o no de aglutinación espermática, además de cuantificar el número de espermios totales y sus anomalías morfológicas para decidir si serían o no procesados para inseminación artificial (IA). Los eyaculados que sobrepasaron el mínimo de requerimientos establecido por la granja para su uso en IA (motilidad >3 , conteo total $>20 \times 10^9$ espermatozoides y $<$ del 20% de morfoanomalías), se diluyeron con el producto comercial MR-A (Kubus, Majadahonda, España). Inmediatamente de concluir el proceso de dilución seminal, se tomaron dos muestras para realizar extendidos en portaobjetos para analizar los parámetros que se miden sobre la cabeza del espermatozoide como son: el porcentaje de vitalidad, porcentaje de acrosomas reaccionados o perdidos y la morfometría.

Análisis de la vitalidad y morfología

Se colocó 10 μ L de semen fresco y diluido en un portaobjeto atemperado a 37°C en una platina termostática y se mezcló con 10 μ L del colorante eosina-nigrosina [1], homogenizando suavemente y haciendo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 minutos. Los frotis fueron observados en el microscopio óptico (Globe, serial N° 62359, Alemania) con el objetivo de inmersión de 100X, para lo cual se contaron 200 espermatozoides por frotis. El resultado final se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos y además se determinó el porcentaje de espermatozoides con alteración del acrosoma, descrito de manera individual, aunque el objeto del presente estudio fue valorar los parámetros inherentes a la cabeza del espermatozoide.

Análisis de la morfometría espermática

Para evaluar la morfometría de la cabeza espermática se prepararon frotis de cada muestra seminal, colocando 10 μ L de semen en el extremo de una lámina portaobjeto y se deslizaba suavemente la gota hasta realizar un extendido fino. Estos frotis fueron secados al aire y teñidos con HEMACOLOR (Merck, Darmstadt, Alemania, Cat. N° 11661), en un procedimiento originalmente descrito para teñir cabezas espermáticas de alpaca [2]. Las muestras teñidas sobre el portaobjeto se protegieron permanentemente al fijarlas con un cubreobjeto con fosfato dibutil xileno (DPX). La evaluación de la morfometría espermática se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Castilla La Mancha, Espa-

ña. El ASMA se realizó mediante el módulo de morfometría de un software disponible comercialmente (*Sperm-class Analyzer*[®], Microptic, Barcelona, España). Este sistema consta de un microscopio Nikon, modelo Eclipse (E-200) con un objetivo de campo claro y una cámara de vídeo Sony (CCD AVC-D7CE, Sony Corporation, Tokio, Japón) en blanco y negro de 16 bits y resolución de 512×512 bits con 256 Mb de memoria conectada a un procesador *Pentium IV* de 950 MHz. La intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fue igual para todas las muestras. Las imágenes fueron grabadas en formato de vídeo y digitalizadas con 256 niveles de grises. Las dimensiones morfométricas para el largo (L), ancho (W), área (A), perímetro (P) fueron tomadas de 225-230 imágenes por frotis (FIG. 1). Este número de imágenes aseguraba un mínimo de 100 medidas de cabeza espermática por muestra y aquellas imágenes en las cuales no se observó bien la intensidad celular fueron excluidas del análisis. Algunas cabezas espermáticas no se les observa claramente su silueta, bien sea por fallas en la coloración en algunas zonas del portaobjeto o por carencia entre el contraste que debe haber entre el espermatozoide y su entorno. Las células espermáticas se seleccionaron al azar para el análisis morfométrico. Las medidas de cada cabeza espermática fueron guardadas en una base de datos.

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el *Statistical Analysis System software 8.2*, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. EUA. 2002). Los efectos de la edad del animal sobre las variables de calidad seminal evaluadas y sobre las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides (L, W, A, P) se analizaron en varios eyaculados de cada verraco utilizando el Modelo Lineal General del Análisis de la Varianza (Proc GLM) que se utiliza cuando hay datos faltantes. Cuando se encontraron diferencias entre las medias se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. Del mismo modo y con el propósito de agrupar la población de espermatozoides de la base de datos en subpoblaciones, se utilizó un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico mediante el procedimiento "FASTCLUS", el cual agrupa a los espermatozoides según sus características morfométricas comunes como se ha descrito anteriormente al evaluar descriptores de motilidad en cerdos [14-16]. Aquellos espermatozoides cuyas dimensiones fueron muy parecidas, eran asignados a un mismo grupo o "cluster", mientras que espermatozoides que diferían entre ellos fueron asignados a un cluster diferente. Para cualificar la relación existente entre la edad del animal y la frecuencia de distribución de los espermatozoides de cada subpoblación se analizaron los datos mediante la prueba Ji-cuadrado descrita en el SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores referentes a las dimensiones de la cabeza del espermatozoide de cerdos domésticos son descritos en la TABLA I.

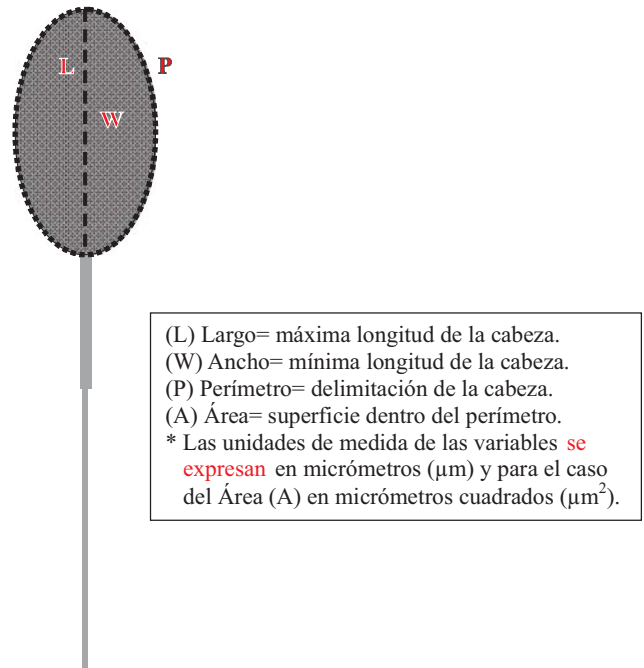


FIGURA 1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EVALUADOS / MORPHOMETRIC PARAMETERS EXAMINED.

Los eyaculados de los cerdos con edades entre 10 y 18 meses de edad tenían menor concentración espermática que los cerdos con edades entre 18 y 30 meses de edad. Estos últimos presentaron espermatozoides más largos en $0,11 \mu\text{m}$ al compararlos con los cerdos menores de 18 meses de edad ($P < 0,001$); sin embargo, el ancho, el área y el perímetro espermático presentaron valores inferiores en los cerdos de mayor edad.

Los hallazgos obtenidos demuestran que los espermatozoides de cerdos domésticos miden entre $8,5$ y $9,0 \mu\text{m}$ de largo y entre $4,2$ y $4,5 \mu\text{m}$ de ancho. Las primeras investigaciones hechas con una metodología diferente a la del presente estudio y a la de la mayoría de los reportes consultados, mencionan que el espermatozoide de cerdo presenta dimensiones de $8 \mu\text{m}$ de largo y $5 \mu\text{m}$ de ancho [5]. Otro estudio observó dimensiones de largo, ancho, y área de $8,0 \pm 0,29 \mu\text{m}$, $4,0 \pm 0,17 \mu\text{m}$, y $27,5 \pm 1,12 \mu\text{m}^2$, respectivamente [13]; mientras que otros autores han reportado una media de $8,56 \pm 1,12$ y $4,62 \pm 0,95$, para la longitud y anchura en cerdos jóvenes y de fertilidad comprobada [19]. Según estos dos últimos estudios, las dimensiones obtenidas en este experimento, están dentro de los parámetros establecidos para un semen de alta fertilidad y esto es producto de que todo el semen seleccionado cumplió con los requisitos mínimos de calidad seminal establecido dentro del centro de producción de semen de la granja. En verracos de alta fertilidad ($>86\%$), los espermatozoides presentan una longitud de $8,97 \pm 0,02 \mu\text{m}$, un ancho de $4,73 \pm 0,02 \mu\text{m}$ y un área de $35,1 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ de la cabeza [9]. Las dimensiones obtenidas por Kondracki y col. [12] son superiores a las mostradas en este trabajo.

Es posible conseguir diferencias en cuanto a las dimensiones de la cabeza del espermatozoide de cerdos al comparar los hallazgos de trabajos recientes [9, 12, 13, 19], lo cual, podría deberse al método de procesado de la muestra, previo al análisis (fijación y tinción de la muestra).

Los resultados indican que las dimensiones de la cabeza de espermatozoides del cerdo doméstico experimentan cambios asociados al desarrollo sexual del animal. En general, los espermatozoides de un animal mayor de 18 meses de edad son más largos que los de cerdos más jóvenes, sin embargo, experimenta una disminución en cuanto al ancho, al área y al perímetro. El resultado es un espermatozoide más elongado. En otro experimento similar pero con resultados diferentes al presente, no se encontraron diferencias en cuanto al largo y ancho del espermatozoide, de acuerdo a la edad

del animal; además los verracos mayores de 18 meses de edad presentaron un área mayor [12].

Algunos investigadores explican que las diferencias en las dimensiones de la cabeza del espermatozoide de toro (*Bos taurus-indicus*) se asocian a la variabilidad existente en cuanto a la estructura de la cromatina [17]. Existe un estudio hecho en espermatozoides de gato (*Felis catus*), que sería interesante hacerlo en el porcino (*Sus scrofa doméstica*) que relaciona una distribución anormal de la densidad intracelular del espermatozoide a anomalías o daños en la estructura de la cromatina [8].

El análisis de agrupamiento con el procedimiento FAST-CLUS del SAS® permitió separar la población espermática obtenida mediante el ASMA en 2 subpoblaciones (TABLA II). El mayor número de espermatozoides conforman la subpoblación

TABLA I
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO SEGÚN SU EDAD / MORPHOMETRICS CHARACTERISTICS OF BOAR SPERMATOOZA ACCORDING THEIR AGE

| Parámetro | Grupo A | Grupo B |
|---|---------------------------|---------------------------|
| | (≥ 10 meses ≤ 18 meses) | (>18 meses ≤ 30 meses) |
| Nº de cerdos (Nº eyaculados) | 20 (24) | 9 (12) |
| Nº espermatozoides/ eyaculado (10 ⁹ /mL) | 65,82 ± 0,32 ^b | 76,18 ± 0,47 ^a |
| Nº espermatozoides evaluados | 2728 | 1179 |
| Vitalidad (%) | 93,27 ± 0,14 ^a | 91,75 ± 0,10 ^a |
| Acrosomas Reaccionados (%) | 4,62 ± 0,13 ^b | 6,49 ± 0,16 ^a |
| Longitud de la cabeza µm ² | 8,84 ± 0,008 ^b | 8,95 ± 0,01 ^a |
| Ancho de la cabeza µm ² | 4,44 ± 0,005 ^a | 4,32 ± 0,009 ^b |
| Área de la cabeza µm ² | 33,33 ± 0,05 ^a | 32,39 ± 0,06 ^b |
| Perímetro de la cabeza µm ² | 27,65 ± 0,04 ^a | 26,33 ± 0,04 ^b |

Diferentes letras (a, b) en cada fila indica diferencias estadísticas (P<0,001). Los resultados son expresados en media ± error estándar de muestras seminales analizadas de 20 cerdos domésticos.

TABLA II
SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS (SP) EN SEMEN DE CERDO DOMESTICO SEGÚN SU EDAD / SPERM SUBPOPULATIONS (SP) IN DOMESTIC PIG SEMEN ACCORDING THEIR AGE

| Parámetro | Subpoblaciones espermáticas | |
|--|-----------------------------|---------------------------|
| | SP ₁ | SP ₂ |
| Longitud de la cabeza µm ² | 8,65 ± 0,41 ^b | 9,10 ± 0,41 ^a |
| Ancho de la cabeza µm ² | 4,28 ± 0,243 ^b | 4,55 ± 0,27 ^a |
| Área de la cabeza µm ² | 31,69 ± 1,89 ^b | 35,33 ± 1,88 ^a |
| Perímetro de la cabeza µm ² | 26,37 ± 1,9 ^b | 28,85 ± 2,1 ^a |
| Espermatozoides evaluados, % (Nº) | 64,68 (2.557) | 35,32 (1380) |
| Edad A (≥ 10 meses ≤ 18 meses) | 58,39 (1593) ^a | 41,61 (1135) ^b |
| Edad B (> 18 meses ≤ 30 meses) | 79,22 (934) ^a | 20,78 (245) ^b |
| Diferencia (Edad A-Edad B) | - 20,83 | + 20,83 |

Diferentes letras (a, b) en cada fila indica diferencias estadísticas (P<0,001). Los resultados son expresados en media ± error estándar de muestras seminales analizadas de 20 cerdos domésticos. El número total de espermatozoides analizados corresponden a 3,907. Los valores de Ji-cuadrado observados al comparar los cerdos según su edad revelan diferencias significativas (P<0,0001).

número 1 (SP₁), que corresponden a los espermatozoides más pequeños (64,68%), seguidos de la subpoblación 2 (35,32%) representada por espermatozoides de mayor tamaño.

La metodología para establecer subpoblaciones espermiáticas ha sido utilizada anteriormente [13-16]. El origen de estas subpoblaciones no está claro, sin embargo, es probable que dicha variabilidad se deba a los diferentes grados de maduración que tiene la célula espermiática en el epidídimo, y que se observa al momento de la eyaculación, lo que puede reflejarse en variaciones sutiles en la morfología de la célula espermiática [13, 19]. Peña y col. [13] separaron la población de espermatozoides muestreada en 4 subpoblaciones, mientras que Thurston y col [19] establecieron 3 subpoblaciones. En el presente caso se observó que, agrupando los espermatozoides solo en 2 poblaciones, se podían observar de una manera precisa las diferencias morfométricas esperadas.

Cuando se evalúa el efecto de la edad del cerdo doméstico sobre la distribución de los espermatozoides en las 2 subpoblaciones, se puede evidenciar que en verracos menores de 18 meses de edad, existe un porcentaje del 58,39% de la SP₁ y 41,61% de la SP₂. Esta última población contiene espermatozoides de mayor tamaño; sin embargo, a medida que el cerdo completa su desarrollo sexual y supera los 18 meses de edad, se evidencia que la población que contienen los espermatozoides de mayor dimensión (SP₂) disminuye porcentualmente hasta un 20,83%, lo cual deriva en un 79,22% de espermatozoides con menores dimensiones, correspondiente a la SP₁. Los espermatozoides con estas características provenían de muestras seminales que presentaron buena fertilidad en experimentos previos.

La edad del animal afecta significativamente la distribución de los espermatozoides dentro de las 2 subpoblaciones espermiáticas, existiendo una disminución de las dimensiones de la cabeza espermiática cercana al 21%. En la actualidad, no existen reportes similares de cambios en las subpoblaciones espermiáticas establecidas morfométricamente, producto de la edad del cerdo doméstico.

CONCLUSIONES

Las dimensiones de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico varían desde que inicia su vida como reproductor hasta alcanzar los dos años y medio de edad. Los cerdos con edades superiores a los 18 meses de edad, producen espermatozoides más elongados, es decir son más largos, menos anchos y presentan menor área y perímetro en un 79% de la población total de espermatozoides valorados.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, por el aporte económico brindado mediante el proyecto N°: CC-0045-06, para realizar esta investi-

gación. A la empresa privada PROPORCA por facilitar sus instalaciones y unidades experimentales para desarrollar el experimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAMBA, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. **Theriogenol.** 29:1245-1251.1988.
- [2] BUENDÍA, P.; SOLER, C.; PAOLICCHI, F.; GAGO, G.; URQUIETA, B.; PÉREZ-SÁNCHEZ G.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer computer assisted system. **Theriogenol.** 57: 1207-1218. 2002.
- [3] BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Semen production in young Large White boars at an AI centre. In: **24es Journées de la Recherche Porcine en France.** París. 02/4-6. Francia: 357-362pp. 1992.
- [4] CLARK, S. G.; SCHAEFFER, D. J.; ALTHOUSE, G. C. B-mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm number. **Theriogenol.** 60: 1011-1023. 2003.
- [5] CUMMINS, J.M.; WOODALL, P.F. On mammalian sperm dimensions. **J. Reprod. Fertil.** 75:153-175. 1985.
- [6] EWELL, J.J.; MADRIZ, A.; TOSI JR., J.A. Bosque seco tropical. En: **Zonas de Vida de Venezuela**, 2ª Ed. Ediciones Sucre. Caracas, Venezuela. 1-270 pp. 1968.
- [7] GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenol.** 63:431-444. 2005
- [8] HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Androl.** 27: 275-279. 1995.
- [9] HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFELICH, A.; WOLF, E.; FOLL, J.; AUMULLER, 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.** 22:104-110. 2001.
- [10] KING, G.J.; MCPHERSON, J.W. A comparison of two methods for boar semen collection. **J. Anim. Sci.** 36:563-565. 1973.
- [11] KONDRACKI, S.; BANASZEWSKA, D.; WYSOKINSKA, A.; KOSIERADZKA, J. Effect of age on semen traits of young landrace boar. **J. Agrobiol. Ecol.** 1: 112-117. 2004.
- [12] KONDRACKI, S.; BANASZEWSKA, D.; MIELNICKA, D. The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). **Cell & Mol. Biol. Lett.** 10: 3-13. 2005.

- [13] PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; GARCÍA-HERREROS, M.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; TAPIA, J.A.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in Two Different Portions of the Boar Ejaculate and Its Relation to Postthaw Quality. **J. Androl.** 26:716-723. 2005.
- [14] QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. **Theriogenol.** 61:673-690. 2004.
- [15] RIVERA, M. M.; QUINTERO-MORENO, A.; BARRERA, X.; PALOMA, M. J.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis. **Theriogenol.** 64: 934-946. 2005.
- [16] RIVERA, M. M.; QUINTERO-MORENO, A.; BARRERA, X.; PALOMA, M. J.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Effects of constant, 9 and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage ability and motile sperm subpopulation structure of boar semen. **Reprod. Dom. Anim.** 41: 386- 393. 2006.
- [17] SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry.** 24: 167-173. 1996.
- [18] SANCHEZ, L.; PETROV, N.; ALEGRE, E. Statistical approach to boar semen evaluation using intracellular intensity distribution of head images. **Cell. Mol. Biol.** 52:38-43. 2007.
- [19] THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **J. Androl.** 22:382-394. 2001.