

# Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computarizado en semen de cerdo recién colectado y refrigerado

## Computer sperm head biometry analysis of boar spermatozoa in fresh and cooling semen samples

B. Morales<sup>1,2</sup>, A. Quintero-Moreno<sup>1</sup>, C. Osorio-Meléndez<sup>1</sup>, J. Rubio-Guillén<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)/ Facultad de Ciencias Veterinarias, Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. Universidad del Zulia (LUZ).

<sup>2</sup>Maestría en Producción Animal. Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias

### Resumen

Para determinar los parámetros biométricos de la cabeza espermática en semen porcino, así como evidenciar la presencia de subpoblaciones espermáticas fueron evaluadas 78 muestras seminales de 27 verracos. Sobre semen recién colectado y refrigerado fue evaluada la motilidad, vitalidad, acrosomas alterados y/o ausentes y anomalías espermáticas. Mediante el análisis computarizado de la morfología espermática (ASMA), en frotis teñidos con Hemacolor<sup>®</sup>, se realizaron las mediciones de la cabeza espermática: longitud (L,  $\mu\text{m}$ ), ancho (W,  $\mu\text{m}$ ), área (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perímetro (P,  $\mu\text{m}$ ) y elongación (E). El efecto del proceso de refrigeración sobre las variables de calidad seminal y biometría se analizaron utilizando el GLM del SAS. Para identificar las subpoblaciones espermáticas, se utilizó el procedimiento FASTCLUS del SAS. La refrigeración a 16°C por 24 horas afectó negativamente la motilidad espermática e indujo el aumento de la L y el W de la cabeza de los espermatozoides ( $P < 0,01$ ). Se logró establecer la presencia de tres subpoblaciones espermáticas en el semen de verracos, 10,45% en la subpoblación 1 (grandes), 44,64% en la subpoblación 2 (medianos) y 45,25% en la subpoblación 3 (pequeños). La refrigeración afectó la distribución de los espermatozoides dentro de las subpoblaciones, existiendo un incremento del 6% en la subpoblación 2 en función de una leve disminución de las subpoblaciones 1 y 3, comparando con el semen recién recolectado. El proceso de refrigeración indujo cambios ligeros en la biometría de la cabeza de los espermatozoides y en su distribución porcentual en subpoblaciones espermáticas.

**Palabras clave:** semen, morfometría, refrigeración, subpoblaciones espermáticas, verracos.

Recibido el 28-1-2010 ● Aceptado el 15-2-2012

Autor de correspondencia e-mail: arturo93@cantv.net

## Abstract

To determine the biometric parameters of the sperm head, and to identify the presence of separate sperm subpopulations in boar semen, 78 ejaculate samples of 27 boars were evaluated. Sperm motility, viability, acrosome integrity and morphological abnormalities were evaluated on fresh and cooling semen samples. Morphometry dimensions: length (L,  $\mu\text{m}$ ), width (W,  $\mu\text{m}$ ), area (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perimeter (P,  $\mu\text{m}$ ), and elongation (E) were determined by means of Assisted Sperm Morphometry Analysis (ASMA), in slides stained with Hemacolor<sup>®</sup>. Effect of cooling procedure on variables of semen quality and morphometric parameters were analyzed using GLM (SAS<sup>®</sup>). For identifying the sperm subpopulations, FASTCLUS procedure was used. Cooling at 16°C for 24 hours decreased the sperm motility and increased sperm length and width ( $P < 0.01$ ). Results demonstrated that three separate sperm subpopulations coexist in boar ejaculates, 10.45% in subpopulation 1 (larges), 44.54% in subpopulation 2 (average), and 45.25% in subpopulation 3 (small). The cooling process affected the sperm subpopulation distribution, showing an increase of 6% in the subpopulation 2 with a light decrease in subpopulation 1 and 3 in comparison to fresh semen. The cooling proces induce subtles changes in the sperm biometry and the percentage distribution in sperm subpopulation.

**Key words:** semen, morfometry, refrigeration, sperm subpopulations, boar.

## Introducción

La valoración de la morfología espermática ha sido tradicionalmente incluida en el análisis seminal clásico, debido a que potencialmente puede determinar las variaciones celulares que podrían afectar la fertilidad (Barratt *et al.*, 1995; Gadea, 2005). A medida que se ha sofisticado la tecnología que estudian las características y funciones de los espermatozoides se ha hecho obvio que existe una considerable heterogeneidad (Thurston *et al.*, 2001).

El análisis computarizado que se hace sobre los espermatozoides de una muestra seminal, es en parte responsable de la detección de esta heterogeneidad y está siendo utilizado actualmente para realizar evaluaciones seminales con mayor objetividad y sen-

## Introduction

The analysis of the spermatic morphology has been traditionally included in the classic boar analysis, since it can potentially determine the cell variations that might affect the fertility (Barratt *et al.*, 1995; Gadea, 2005). At the time that the technology that study the characteristics and function of the spermatozoids has advanced, it is obvious that there is a considerable heterogeneity (Thurston *et al.*, 2001).

The computerized analysis done on the spermatozoids in an ejaculate boar sample is, in part, responsible on detecting this heterogeneity and is has been used for investigating boars objectively (Rodríguez-Martínez, 2003; Gadea, 2005). The technique conducts

sibilidad (Rodríguez-Martínez, 2003; Gadea, 2005). La técnica propicia la evaluación rápida de una población numerosa de espermatozoides y genera información precisa sobre varios aspectos de la funcionalidad espermática (Buendía *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2005); atenuando en gran parte el factor subjetivo implícito en el análisis seminal. Uno de los aspectos que considera esta técnica es la valoración computarizada de la morfología espermática (Automated Sperm Morphology Analysis ASMA), la cual genera información sobre las dimensiones (biometría) y la forma de la cabeza del espermatozoide de una manera muy objetiva y reproducible (Katz *et al.*, 1986; Gravance y Davis, 1995; Buendía *et al.*, 2002). En mamíferos incluyendo al cerdo, se viene utilizando desde hace algún tiempo en forma experimental para determinar las dimensiones individuales de los espermatozoides y se han obtenido resultados muy interesantes (Thurston *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2005, González *et al.*, 2008, Quintero-Moreno *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha aplicado el Análisis Estadístico Multivariado de Agrupamiento a la población de espermios de una muestra seminal mediante el ASMA y ha sido posible determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas en eyaculados de cerdos (Thurston *et al.*, 2001, González *et al.*, 2008, Quintero-Moreno *et al.*, 2009); sin embargo, existe muy poca información referente a la biometría espermática en semen refrigerado y ninguna verificando los cambios biométricos de la cabeza espermática debido al proceso de refrigeración seminal.

to the fast evaluation of a numerous population of spermatozoids and generates precise information on different aspects of the spermatoc function (Buendía *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2005), mitigating the implicit subjective aspect in the boar analysis. One of the aspects that this technique considers is the computer sperm morphology (Automated Sperm Morphology Analysis ASMA), which generates information about dimensions (biometry) and the spermatozoid head's shape in an objective and reproducible way (Katz *et al.*, 1986; Gravance and Davis, 1995; Buendía *et al.*, 2002). In mammals, including the boar, it has been used from a long time ago, in an experimental way in order to determine the individual dimensions of the spermatozoids and very interesting results have been obtained (Thurston *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2005, González *et al.*, 2008, Quintero-Moreno *et al.*, 2009). On the other side, the Multivariate Grouping Statistical Analysis has been applied to the sperm population of an ejaculate boar sample using ASMA, and it has been possible to determine the existence of sperm subpopulation in ejaculate boars (Thurston *et al.*, 2001, González *et al.*, 2008, Quintero-Moreno *et al.*, 2009); however, there is little information regarding the sperm biometry in refrigerated semen and none reported in the biometric changes of the sperm's head due to the boar's refrigeration process.

The objective of this research is to identify the changes that occurred in the boar sperm head's dimension in fresh and refrigerated semen, and the

Este ensayo planteó identificar los cambios que se suscitaron en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de cerdo en semen fresco y refrigerado y la proporción de las subpoblaciones espermáticas establecidas, producto del proceso de refrigeración a 16°C por 24 horas.

## **Materiales y métodos**

### **Manejo de los animales y colección del semen**

El estudio se realizó en una granja comercial (PROPORCA) ubicada en el municipio San Francisco del estado Zulia, Venezuela; cuyas coordenadas son: 10°30'45"LN y 71°45'42"LO, en una zona agro-ecológicamente caracterizada como bosque seco tropical. Se utilizaron 78 eyaculados pertenecientes a 27 verracos puros y mestizos de raza Pietrain, con edades comprendidas entre los 12 y 24 meses alojados en un ambiente controlado de confort higrotérmico (Chore time 2529,676, modelo 8-B1.5) con temperatura ambiental entre 24 y 28°C y humedad relativa del 70%. Los eyaculados fueron obtenidos mediante manipulación manual (King y Mcpherson, 1973), desechándose y filtrando la fracción inicial o gelatinosa del eyaculado. El semen fue evaluado al momento de la colección. Se midió su volumen en una probeta graduada en mL. La motilidad y calidad de movimientos se valoraron recolocando una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica (Osaka, OK 51, España) a 37°C, se colocó un cubreobjeto y se observaron al microscopio binocular (Globe, modelo 1600, Germany) con objetivo de 40X.

proportion of established sperm subpopulations, product to the refrigeration at 16°C for 24 hours.

## **Materials and methods**

### **Animals' handle and semen collection**

The research was carried out at the commercial farm (PROPORCA) located on San Francisco parish, Zulia state, Venezuela; which coordinates are: 10°30'45"NL and 71°45'42"WL, in a agro-ecological area characterized by dry tropical forest. 78 ejaculates of 27 pure and half-breed boars of Pietrain breed were used, from 12 and 24 to month olds, in a controlled environment with hygro-thermal comfort (Chore time 2529.676, model 8-B1.5) with environmental temperature from 24 to 28°C and relative humidity of 70%. The ejaculates were obtained after the manual manipulation (King and Mcpherson, 1973) discharging and filtering the initial of gel fraction of the ejaculate. The semen was evaluated at the moment of the recollection. Its volume was measured in a cylinder graduated in mL. The motility and quality of movements were valued putting a drop of the sample in a slide, which was previously heated in a thermal flange (Osaka, OK 51, España) at 37°C, a cover glass was used and were observed in a binocular microscope (Globe, model 1600, Germany) with a 40X objective. The movement quality of the spermatozoids was analyzed and classified with a 0 to 5 scale, where 0 was null movement and 5 the fast, progressive and lineal movement (Martín-Rillo *et al.*, 1996).

La calidad del movimiento de los espermatozoides se valoró y clasificó según una escala de 0 a 5, donde 0 era movimiento nulo y 5 el movimiento rápido, progresivo y lineal (Martín-Rillo *et al.*, 1996).

La concentración de espermatozoides.mL<sup>-1</sup> se determinó mediante una cámara de Neubauer (Hemocitómetro). Para ello se colectó una muestra de semen de 1 mL que se diluyó a 100 mL, con solución salina formulada espermicida (9 g de cloruro de sodio, 3 mL de formol en 1000 mL de agua destilada) y se contaron los espermatozoides presentes en cinco de los 25 cuadros de la cámara. El volumen ocupado por los cinco cuadros contados, multiplicado por la dilución originó el factor de multiplicación (5000) y la concentración espermática resultó de la siguiente ecuación:

Concentración de espermatozoides.mL<sup>-1</sup> = N° de espermatozoides contados x 5000.

Los eyaculados que sobrepasaron el mínimo de requerimientos establecido en esta granja para su uso en inseminación artificial (Motilidad >3, conteo total >20x10<sup>9</sup> espermatozoides), se diluyeron con el producto comercial MR-A (Kubus, España), en una cantidad suficiente para que resultará una concentración final de 4.000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por L, de esta dilución se tomaron muestras para realizar extendidos en portaobjetos con el propósito de analizar la vitalidad, morfología y morfometría. Una segunda toma de extendidos en láminas portaobjetos, se realizó a partir de muestras de semen diluido tomadas luego de ser envasado en botellas plásticas desechables para inseminación de

The spermatozoids.mL<sup>-1</sup> concentration was determined using a Neubauer chamber (hemocytometer). For this, a semen sample of 1 mL was recollected, which was diluted at 100 mL with a formulated spermicide saline solution (9 g of sodium chloride, 3 mL of formalin in 1000 mL of distilled water) and the presented spermatozoids in five out of the 25 areas of the chamber were counted. The volume occupied by the five places counted, multiplied by the dilution originated the multiplication factor (5000) and the sperm concentration resulted from the following equation:

Sperms concentration.mL<sup>-1</sup> = number of counted sperms x 5000.

The ejaculates that over passed the minimum of established requirements in this farm for their use in artificial insemination (motility >3, total count >20x10<sup>9</sup> spermatozoids), diluted with the commercial product MR-A (Kubus, España) in a sufficient quantity to obtain a final concentration of 4.000 x 10<sup>6</sup> spermatozoids by L, from this dilution were taken samples to perform extended in slides with the aim of analyzing the vitality, morphology and morphometry. A second sample of the extended in slides was done after the diluted semen samples taken after been stored in plastic bottles for insemination of 100 mL and frozen at 16°C for 24 hours. Each bottle had a dose of 4.000 millions of spermatozoids.

### **Vitality analysis and sperm morphology**

These samples were done in fresh semen and refrigerated at 16°C for 24 hours. ten mL was put in a temperature-controlled slide at 37°C in

100 mL y refrigerado a 16°C por 24 horas. Cada botella contenía una dosis de 4.000 millones de espermatozoides.

### **Análisis de la vitalidad y morfología espermática**

Estas pruebas fueron realizadas en semen recién recolectado y en semen refrigerado a 16°C por 24 horas. Se colocó 10 mL en un portaobjeto atemperado a 37°C en una platina termorregulable y se mezcló con 10 mL del colorante Eosina-Nigrosina (Bamba, 1988), homogenizando suavemente y haciendo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 minutos. Los frotis fueron observados en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión de 100X (a 1000X de aumento), para lo cual se contaron un total de 200 espermatozoides por frotis. El resultado final se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos.

Para el caso de la morfología, los espermatozoides fueron clasificados según su apariencia en normales (aparición normal) y anormales (con presencia de morfoanomalías), y expresados en porcentaje (%) de espermatozoides anormales. Estos últimos incluían: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (número, forma y tamaño), presencia de gota citoplasmática proximal y distal, además, se determinó el porcentaje de espermatozoides con alteración del acrosoma. El criterio de evaluación del acrosoma fue el mismo empleado por Bamba (1988), el cual consistió en clasificar los espermatozoides con acrosoma intacto o con acrosoma dañado. Los acrosomas

a thermal-regulate flange and was mixed with 10 L of eosin-nigrosine color (Bamba, 1988), homogenizing softly and doing a fine layer (smear), letting it dry for 30 minutes. Smears were observed in an optical microscope with the immersion objective of 100X (to 1000 of increment), to which were counted a total of 200 spermatozoids per smear. The final result was expressed in percentage of alive spermatozoids.

For the case of the morphology, the spermatozoids were classified according to their appearance in normal (normal appearance) and abnormal (with presence of morpho-anomalities) and expressed in percentages (%) of abnormal spermatozoids. The latter included: defects on the head (number, size and appearance), defects of the intermediate piece (location and appearance), abnormalities in the scourge (number, shape and size), presence of the proximal and distal cytoplasmic drop, besides, was determined the sperms percentage with acrosome alteration. The evaluation criteria of the acrosome was the same employed by Bamba (1988), which consisted on classifying the sperms with intact acrosome to those with damaged acrosome. The intact acrosomes were those which had the apical a white and well defined apical border, besides of being softly adhered to the nucleus. The spermatozoids with damaged acrosomes show a detachment in the posterior area of the apical border, making it irregular, they can also had vesicles. Those sperms that lack of apical border with totally reacted sperms.

intactos fueron aquellos que presentaron el borde apical de color blanco y bien definido, además de estar suavemente adherido al núcleo. En cambio, los espermatozoides con acrosoma dañado denotaron un desprendimiento en la parte posterior del borde apical haciéndolo irregular, presentando también vesículas. Aquellos que carecieron de borde apical fueron espermatozoides totalmente reaccionados.

### **Análisis de las dimensiones de la cabeza del espermatozoide**

A partir de los eyaculados (recién recolectados y refrigerados), se procedió a realizar los frotis en un portaobjeto atemperado a 37°C, dejándolos secar al aire por 15 minutos. Luego fueron teñidos con el kit Hemacolor® (Merck, Darmstadt, Germany). Esta tinción constó de un fijador (metanol 50% en agua) y dos colorantes (eosina y Azur B). El protocolo de tinción comenzó realizándose cinco inmersiones en el fijador, esperando su secado para realizar posteriormente seis inmersiones en el primer colorante (eosina) y siete en el segundo colorante (azur B). Cada inmersión, tanto en el fijador como en los colorantes, debe ser rápida (un segundo). Al cabo de 30 minutos, se sumergieron sólo una vez en Xilol para eliminar el exceso de colorante. Veinticuatro horas más tarde se agregó un medio de montaje sobre la tinción (DPX, Fluka®). Posteriormente se realizó el análisis de las características morfológicas (dimensiones de la cabeza espermática) utilizando el *software* del módulo de morfometría del analizador de semen SCA®. La evaluación morfológica se realizó en el Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias

### **Sperms' head dimensions analysis**

Smears were done in the ejaculates (fresh and refrigerated) in a temperature-controlled slide at 37°C, letting it dry for 15 minutes. Later, were stained with the Hemacolor® kit (Merck, Darmstadt, Germany). This coloring has a fixer (methanol 50% in water) and two colors (eosine and Azur B). The stain protocol started with five immersions in the fixer, was let dried, later, six immersions in the first coloring (eosine) and seven in the second coloring (azur B). Each immersion, in both the fixer and colors, must be fast (a second). After 30 minutes, were submerged once in Xylol to eliminate the excess of color. 24 hours later a mounting medium was added on the color (DPX, Fluka®). Later, an analysis of morphometric characteristics was done (sperm head dimensions) using the morphometric semen analyzer software SCA®. The morphometric evaluation was done in the Andrology Laboratory at the Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. To evaluate the stained slides ASMA was used, generically called Automated Semen Morphology Analysis, using the available morphometry software (Spem-class Analyzer, Update SCA® v.3.4). The system had a triocular microscope (Olympus Bx41®) with a video chamber (Basler A312F®, Serial DA00067801CCD) connected to a Intel Core Duo processor (Compaq®), the intensity of the illumination source and the chamber transportation were the same for all samples. The configuration of the computer system included a video images digitalizator

Veterinarias, Universidad Zulia, Venezuela. Para evaluar los frotis teñidos se utilizó el ASMA, genéricamente denominado "Automated Semen Morphology Analysis" a través del módulo de morfometría de un programa disponible comercialmente (Spem-class Analyzer, Update SCA® v.3.4) El sistema constó de un microscopio triocular (Olympus Bx41®), provisto de una cámara de video (Basler A312f®, Serial DA00067801CCD) conectada a un procesador Intel Core Duo (Compaq®), la intensidad de la fuente de iluminación y el desplazamiento de la cámara fue igual para todas las muestras. La configuración del sistema de la computadora incluyó un digitalizador de imágenes de video PIP-1024 B (Matrox Electronic Sistem Ltd.®, Québec, Canadá) un software de análisis y un monitor de alta resolución pantalla plana de 17" (Compaq®), las imágenes fueron grabadas en formato de video 512 x 512 x 8 bits, digitalizadas a 262,144 pixels (elementos de fotografía) y 256 niveles de grises. La resolución de las imágenes fue 0,11 y 0,15  $\mu\text{m}$  por píxel en el plano horizontal y vertical, respectivamente. Estas imágenes y videos fueron transmitidas al computador, en cuyo software se realizó las mediciones lineales básicas sobre el espermatozoide: Longitud de la cabeza del espermatozoide (L,  $\mu\text{m}$ ), ancho de la cabeza (W,  $\mu\text{m}$ ), área (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perímetro (P,  $\mu\text{m}$ ) y elongación (E), descritos en trabajos previos (González *et al.*, 2008; Quintero-Moreno *et al.*, 2009).

#### **Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el *Statistical Analysis System software* 8.2, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC.

PIP-1024 B (Matrox Electronic System Ltd.®, Quebec, Canada), an analysis software and a high resolution flat monitor of 17" (Compaq®), the images were recorded in a video format 512 x 512 x 8 bits, digitalized at 262,144 pixels (photography elements) and 256 gray levels. The images resolution was 0.11 and 0.15  $\mu\text{m}$  per pixel horizontally and vertically, respectively. These images and videos were transported to the computer, where can be performed the basic lineal measured on the sperm: sperm head's longitude (L,  $\mu\text{m}$ ) head's width (W,  $\mu\text{m}$ ), area (A,  $\mu\text{m}^2$ ), perimeter (P,  $\mu\text{m}$ ) and elongation (E), described in previous researches (González *et al.*, 2008; Quintero-Moreno *et al.*, 2009).

#### **Statistical analysis**

All the data obtained were analyzed using the Statistical Analysis System software 8.2 for Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. USA. 2002). The refrigeration process on the evaluated variables of boar quality and the head's dimensions of the spems (L, W, A, P, E) were analyzed in some ejaculates of each boar using the General Lineal Model (Proc GLM) doing an adjustment of the genetic group of the animal. When differences between means were found the effect was quantified using LSMEANS process.

At the same time and with the aim of identifying the presence of spermatic sub-populations in the ejaculate, all the dimensions of the spermatic head obtained in the experiment were submitted to a non-hierarchical grouped multivariate analysis using FASTCLUS of SAS, which groups the sperms according to common morph-metric characteristics



USA. 2002). Los efectos del proceso de refrigeración sobre las variables evaluadas de calidad seminal y sobre las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides (L, W, A, P, E) se analizaron en varios eyaculados de cada verraco utilizando el Modelo Lineal General (Proc GLM) realizando un ajuste del grupo genético del animal. Cuando se encontraron diferencias entre las medias, se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. Del mismo modo y con el propósito de identificar la presencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado, todas las dimensiones de la cabeza espermática obtenidas en el experimento fueron sometidas a un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico mediante el procedimiento FASTCLUS del SAS, el cual agrupa a los espermatozoides según sus características morfológicas comunes como se ha descrito anteriormente al evaluar descriptores de motilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2003 y 2004) y morfometría (Rubio-Guillén *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008; Quintero-Moreno *et al.*, 2009). Aquellos espermatozoides cuyas dimensiones eran muy parecidas se asignan a un mismo grupo o "cluster", mientras que espermatozoides que diferían entre ellos eran asignados a un cluster diferente. Para cualificar la relación existente entre semen recién recolectado/refrigerado y la frecuencia de distribución de los espermatozoides de cada subpoblación se analizaron los datos mediante la prueba Ji-cuadrado.

## Resultados y discusión

Se evaluaron un total de 27 verracos y se realizaron tres colectas de semen por animal con intervalo de

as described before when evaluating the motility descriptors (Quintero-Moreno *et al.*, 2003 and 2004) and morphometry (Rubio-Guillén *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008; Quintero-Moreno *et al.*, 2009). Those sperms which dimensions were very similar are assigned to a same cluster, while sperms that differed among them, were assigned to different cluster. To qualify the relation between the fresh/frozen semen and the distribution frequency of sperms on each population, the data was analyzed using the Ji-squared test.

## Results and discussion

A total of 27 boars were evaluated and three collections of semen per animal were done with an interval of a week between replications; which fulfilled with the established parameters that value the ejaculate quality for this specie and to be used in the artificial insemination program established by the Enterprise. The most important parameters at the moment of selecting the apt sample to be processed were the motility and the spermatic concentration, which had to be optimum. The parameters that determine the ejaculate quality, previous to the processing of the semen, such as: spermatic motility (3.46), the number of total sperms per ejaculate ( $95.15 \times 10^9$ ), the spermatic vitality (87.93) and the semen volume by ejaculate (243.95) were inside the values internationally established by the specie (Fuentes, 2000). Only the morphological abnormalities showed values that oscillate from 21 to 22%, which is slightly superior to the

una semana entre repetición; las cuales cumplían con los parámetros establecidos que valoraron la calidad seminal para esta especie y de esta manera poder ser utilizadas en el programa de inseminación artificial establecido por la empresa. Los parámetros más importantes al momento de seleccionar la muestra apta para ser procesada fueron la motilidad y la concentración espermática, las cuales debían de ser óptimas. Los parámetros que determinan la calidad seminal, previo al procesamiento del semen, como fueron: la motilidad espermática (3,46), el número de espermios totales por eyaculado ( $95,15 \times 10^9$ ), la vitalidad espermática (87,93) e inclusive el volumen de semen por eyaculado (243,95), se encontraron dentro de los valores establecidos internacionalmente para la especie (Fuentes, 2000). Sólo las anomalías morfológicas evidenciaron valores que oscilan entre un 21 y 22%, lo cual fue ligeramente superior a lo establecido (15-20%). En este estudio fueron utilizados verracos de alta calidad genética con excelente condición física, lo cual se evidenció por el alto porcentaje de espermatozoides vivos (85%) y de motilidad espermática (>3) obtenidos en los eyaculados muestreados en semen fresco y refrigerado.

En el cuadro 1, se muestran las características seminales de los eyaculados recién recolectados y de los refrigerados. La motilidad fue el único parámetro que se afectó ( $P < 0,01$ ) al refrigerar el semen, obteniendo un valor inferior (3,29) al obtenido en el semen recién recolectado (3,65). En relación a los porcentajes de vitalidad, acrosomas dañados o ausentes y anomalías morfológicas totales del es-

established (15-20%). In this research were used boars with high genetic quality with excellent physical quality, which is proved by the high percentage of alive spermatozoids (85%) and spermatic motility (>3) obtained in the sampled ejaculates in fresh and frozen semen.

In table 1 are shown the characteristics of fresh and frozen ejaculates. The motility was the only parameter that was affected ( $P < 0.01$ ) when frozen the semen, obtaining an inferior value (3.29) than the one obtained in the fresh semen (3.65). In relation to the percentages of vitality, damaged or absent acrosomes and total morphological abnormalities of the spermatozoid, the results did not show statistical significance, which indicates that the refrigeration process at 16°C for 24 hours does not affect all the parameters that qualify the ejaculate quality. The differences found among the values obtained for fresh and frozen semen agree to those found by Pérez-Llano *et al.* (2003), who found a reduction of the frozen motility semen for 24 hours at 15°C; however, different to the results on this research, these authors described an increment in the percentage of damaged acrosomes. These differences, due to the refrigeration, might be caused by the slight deterioration of the ejaculate doses product to the refrigeration and oxidative stress (González *et al.*, 2008). The values observed, in both the fresh semen (22.05%) and the frozen (21.04%) might consider slightly elevated values in function to what was normally recommendable for boars semen, who live under template weather

**Cuadro 1. Características seminales en muestras de semen de cerdo recién colectadas y refrigeradas a 16°C por 24 horas.****Table 1. Ejaculate characteristics in fresh and frozen boar semen samples at 16°C for 24 hours.**

Parámetros	Muestras seminales	
	Recién recolectadas	Refrigeradas
Motilidad (0-5)	3,65±0,09 <sup>a</sup>	3,29±0,09 <sup>b</sup>
Vitalidad (%)	88,30±1,17 <sup>a</sup>	88,64±1,14 <sup>a</sup>
Acrosomas, dañados/perdidos (%)	2,87±0,64 <sup>a</sup>	2,71±0,63 <sup>a</sup>
Anormalidades totales (%)	22,05±3,54 <sup>a</sup>	21,04±3,48 <sup>a</sup>

N= 75 dosis seminales que correspondieron a 27 cerdos.

(a, b): letras distintas en la misma fila implicaron diferencias significativas (P<0,01).

permatozoide, los resultados no mostraron significancia estadística, lo que indicó que el proceso de refrigeración a 16°C por 24 horas no afectó muchos de los parámetros que calificaron la calidad seminal. Las diferencias encontradas entre los valores obtenidos para semen recién recolectado y refrigerado concordaron con los resultados mostrados por Pérez-Llano *et al.* (2003), quienes encontraron una disminución de la motilidad del semen refrigerado por 24 horas a 15°C; sin embargo, a diferencia de los resultados del presente trabajo, esos autores describieron un aumento en el porcentaje de acrosomas dañados. Estas diferencias debidas a la refrigeración, podrían ser causadas por el deterioro leve de las dosis seminales producto de la refrigeración y estrés oxidativo (González *et al.*, 2008). Los valores observados tanto en semen recién recolectados (22,05%) como refrigerados (21,04%), podrían considerarse valores ligeramente elevados en función de lo recomendado comúnmente para semen de verraco que

conditions; however, these numbers were common and “normal” in tropical conditions (Fuentes, 2000) and even on hygro-thermal controlled environments, as observed in a previous research very similar to this (González *et al.*, 2008).

The refrigeration effect on the morphometric characteristics of the spermatozoid head can be observed in table 2, where were evaluated 11.098 spermatozoids, out of which 5.683 corresponded to the fresh semen and 5.415 frozen semen. The spermatozoids suffer an alteration in the biometric dimensions of their heads due to the refrigeration process (P<0.01). The measures done on L and W of the spermatozoid showed an increment in their dimensions, however, none changes were observed in A, P and E due to the refrigeration.

The study of the head's dimensions of the spermatozoid (morphometry/biometry) has acquired importance on the ejaculate evaluation and lots of technological efforts have

habitan bajo condiciones de clima templado; sin embargo, estas cifras fueron comunes y “normales” en condiciones tropicales (Fuentes, 2000), inclusive bajo ambientes de control higrotermico, tal como se observó en un trabajo previo muy similar a este (González *et al.*, 2008).

El efecto de la refrigeración sobre las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide se puede observar en el cuadro 2, donde se evaluaron 11.098 espermatozoides, de los cuales 5.683 correspondieron al semen recién recolectado y 5.415 al semen refrigerado. Los espermatozoides sufrieron una alteración en las dimensiones biométricas de su cabeza debido al proceso de refrigeración ( $P < 0.01$ ). Las mediciones realizadas sobre la L y el W del espermatozoide evidencian un incremento en sus dimensiones; sin embargo, no se observan cambios en el A, el P y la E debido a la refrigeración.

been done with the aim of researching if there is any relation between the measures and the reproductive potential of the boar. In other species, researches have been done, where the dimensions of the spermatid head have been related to the fertility (Katz *et al.*, 1986; Gravance and Davis, 1995, Buendía *et al.*, 2002, Rubio-Guillén *et al.*, 2007); however, the conclusions were not meaningful. There is a classic research done with a little sophisticated equipment, where was affirmed that the boar's spermatozoid measures  $8 \mu\text{m}$  of longitude and  $5 \mu\text{m}$  of width (Cummins and Woodall, 1985). This finding was similar to the currently referred; including those observed in this research, however, it is important to mention that there is little information in the boar that would describe the biometric characteristics of the spermatozoid and on the factors that might affect changes in this variable using ASMA.

## Cuadro 2. Características biométricas de los espermatozoides de cerdos comparando el semen recién recolectado Vs el semen refrigerado a $16^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

**Table 2. Biometric characteristics of boar spermatozoids comparing the fresh semen Vs frozen semen at  $16^{\circ}\text{C}$  for 24 hours.**

Biometría de la cabeza espermática	Semen recién recolectado	Semen refrigerado
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	$8,41 \pm 0,01^a$	$8,50 \pm 0,009^b$
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$4,23 \pm 0,003^a$	$4,24 \pm 0,003^b$
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$31,30 \pm 0,04^a$	$31,62 \pm 0,045^a$
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$22,36 \pm 0,02^a$	$22,49 \pm 0,02^a$
Elongación	$0,32 \pm 0,0005^a$	$0,33 \pm 0,0005^a$

N= 11.098 espermatozoides evaluados correspondieron a 27 cerdos.

(a, b): letras distintas en la misma fila implicaron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

El estudio de las dimensiones de la cabeza del espermatozoide (morfometría/biometría) ha adquirido recientemente una importancia creciente dentro de la evaluación seminal, y se están realizando innumerables esfuerzos tecnológicos con el fin de indagar si existe una relación entre estas medidas y el potencial reproductivo del verraco. En otras especies, se han hecho estudios en los que han relacionando las dimensiones de la cabeza espermática con la fertilidad (Katz *et al.*, 1986; Gravance y Davis, 1995; Buendía *et al.*, 2002; Rubio-Guillén *et al.*, 2007); sin embargo, las conclusiones no fueron contundentes. Existe un estudio clásico realizado con un equipo poco sofisticado donde se asevera que el espermatozoide de cerdo mide 8  $\mu\text{m}$  de longitud y 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Cummins y Woodall, 1985). Este hallazgo fue similar a los referidos actualmente, incluyendo los observados en esta investigación, sin embargo, es importante destacar que en el porcino existe poca información que describa las características biométricas del espermatozoide y sobre los factores que pueden afectar cambios en esta variable mediante el uso del ASMA.

Se ha descrito en verracos con alta tasa de no retorno (>86%) que la cabeza de los espermatozoides presentaron una L de 8,97  $\mu\text{m}$ , un W de 4,73  $\mu\text{m}$  y un A de 35,1  $\mu\text{m}^2$  (Hirai *et al.*, 2001). En otro estudio, Peña *et al.* (2005), cuantificaron dimensiones de 8,0  $\mu\text{m}$ , 4,0  $\mu\text{m}$  y 27,5  $\mu\text{m}^2$  para L, W y A de la cabeza espermática. Thurston *et al.* (2001) observaron una media de L y W de 8,56 y 4,62  $\mu\text{m}$ , respectivamente, en cerdos jóvenes y de fertilidad comprobada. En el pre-

Has been described in boars with a non-return high rate (>86%) that the spermatozooids' head had a L of 8.97  $\mu\text{m}$  and a W of 4.73  $\mu\text{m}$  and a A of 35.1  $\mu\text{m}^2$  (Hirai *et al.*, 2001). In other research, Peña *et al.* (2005), quantified dimensions of 8.0  $\mu\text{m}$ , 4.0  $\mu\text{m}$  and 27.5  $\mu\text{m}^2$  for L, W and A of the spermatid head. Thurston *et al.*, (2001) observed a mean of L and W of 8.56 and 4.62  $\mu\text{m}$ , respectively in young boars with tested fertility. In the current research, the results were similar to those of the researches referred, highlighting that the described values were inside the parameters established for a semen of a high reproductive potential boar.

The refrigeration effect in the boars' semen has been widely discussed (Jhonson *et al.*, 2000). Differences in the biochemical composition of the plasmatic membrane and specifically in the relative content of phospholipids and cholesterol were involved in the sensitiveness of the spermatozooids to the refrigeration and frozen processes (Thurston *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2005). The biochemical characteristics of the diluents had an important role on the vitality of the semen exposed to low temperatures during extended periods of time (Althouse, 1997; Jhonson *et al.*, 2000).

Some morphometric characteristics of the spermatid head were affected by the refrigeration at 16°C for 24 hours. Both the L (8.41 Vs 8.50  $\mu\text{m}$ ) and W (4.23 Vs 4.26  $\mu\text{m}$ ) of the frozen semen spermatozooids increased in relation to the fresh semen (P<0.01). A (31.30 Vs 31.62  $\mu\text{m}^2$ ), P (22.36 Vs 22.49  $\mu\text{m}$ ) and E (0.32 Vs 0.33) did not show significant differences; however, a favorable

sente estudio, los resultados fueron similares a los de las investigaciones referidas, puntualizando que los valores descritos estuvieron dentro de los parámetros establecidos para un semen de verraco con un buen potencial reproductivo.

El efecto de la refrigeración en el semen de verracos ha sido ampliamente discutido (Jhonson *et al.*, 2000). Diferencias en la composición bioquímica de la membrana plasmática y específicamente en el contenido relativo de fosfolípidos y colesterol, estuvieron involucrados en la sensibilidad de los espermatozoides a los procesos de refrigeración y congelación (Thurston *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2005). Las características bioquímicas del diluyente presentaron un papel importante en la vitalidad del semen expuesto a bajas temperaturas durante periodos de tiempo prolongados (Althouse, 1997; Jhonson *et al.*, 2000).

Algunas características morfológicas de la cabeza espermática se vieron afectadas por la refrigeración a 16°C por 24 horas. Tanto la L (8,41 Vs 8,50  $\mu\text{m}$ ) como el W (4,23 Vs 4,26  $\mu\text{m}$ ) de los espermatozoides del semen refrigerado, aumentaron en relación al semen fresco ( $P < 0,01$ ). El A (31,30 Vs 31,62  $\mu\text{m}^2$ ), el P (22,36 Vs 22,49  $\mu\text{m}$ ) y la E (0,32 Vs 0,33) no mostraron diferencias significativas, sin embargo, se evidenció una propensión numérica favorable al semen refrigerado. En referencia a la L, y el W de la cabeza del espermatozoide estos hallazgos fueron similares a los publicados por González *et al.* (2008); sin embargo, al verificar el A, el P y la E los resultados fueron contrastantes.

numeric tendency in the frozen semen was observed. In reference to L, and W of the spermatozoid' head these findings were similar to those published by González *et al.* (2008); however, when verifying the A, P and E the results were contrasting.

A grouping observation analysis was done using FASTCLUS of SAS®. This performs a correct segregation and grouping of the spermatozooids according to the common characteristics of the spermatic head's dimensions, which resulted in the identification of three spermatic sub-populations that coexists in the semen of the sampled boars (table 3). Sub-population 1 (SP<sub>1</sub>) includes the spermatozooids which spermatic head had higher dimensions, the SP<sub>2</sub> includes spermatozooids with intermediate measures and SP<sub>3</sub> includes smaller spermatozooids. In both the fresh and frozen semen, all the parameters differed significantly among all the sub-populations ( $P < 0.01$ ).

In fresh samples the percentage of spermatozooids was higher for SP<sub>3</sub> with 46.33% and a number of spermatozooids evaluated of 2.633, being SP<sub>2</sub> the second in relation to the percentage (41.42) with a number of 2.354 evaluated spermatozooids, and in a lower proportion the SP<sub>1</sub> with a percentage of 12.25% and 696 spermatozooids. These values changed slightly their proportions when the semen was submitted to refrigeration at 16°C for 24 hours since SP<sub>1</sub> and SP<sub>3</sub> reduced in 4.38 and 2.21%, respectively, but SP<sub>2</sub> increased the percentage in 6.59%. These findings differ from the information showed by

Se realizó el análisis de agrupamiento de observaciones con el procedimiento FASTCLUS del SAS<sup>®</sup>. Este realiza una correcta segregación y agrupamiento de los espermatozoides de acuerdo a características comunes de dimensiones de la cabeza espermática, el cual resultó en la identificación de tres subpoblaciones espermáticas que coexistieron en el semen de los verracos muestreados (cuadro 3). La subpoblación 1 (SP<sub>1</sub>) incluyó los espermatozoides cuya cabeza espermática tenían mayores dimensiones, la SP<sub>2</sub> incluye los espermatozoides con medidas intermedias y la SP<sub>3</sub> incluye los espermatozoides más pequeños. Tanto en semen fresco como refrigerado, todos estos parámetros difirieron

González *et al.*, (2008) where the SP<sub>1</sub> population had 28.45% of sperms; SP<sub>2</sub> with 51.20% and SP<sub>3</sub> with 20.35%. Thurston *et al.* (2001) assumed that the variation in the spermatid morphology originates during the spermatogenesis, where the genotype influences the structure of the spermatid, which derives in spermatid sub-populations (Quintero-Moreno *et al.*, 2003). It has been proved that the morphology of the spermatid seems to be controlled under a strict genetic control (Roldan *et al.*, 1998).

The methodology employed for establishing spermatid sub-populations in function to the motility and spermatid morphometry

**Cuadro 3. Subpoblaciones espermáticas establecidas biométricamente en semen de verraco recién recolectado y refrigerado a 16°C por 24 horas.**

**Table 3. Spermatid sub-populations biometrically established in fresh and frozen boar semen at 16°C for 24 hours.**

Biometría de la cabeza espermática	Subpoblaciones espermáticas		
	SP <sub>1</sub>	SP <sub>2</sub>	SP <sub>3</sub>
Longitud (µm)	9,54±0,52 <sup>a</sup>	8,75±0,37 <sup>b</sup>	7,99±0,41 <sup>c</sup>
Ancho (µm)	4,50±0,25 <sup>a</sup>	4,31±0,19 <sup>b</sup>	4,14±0,19 <sup>c</sup>
Área (µm <sup>2</sup> )	37,08±2,04 <sup>a</sup>	32,94±1,20 <sup>b</sup>	29,00±1,65 <sup>c</sup>
Perímetro (µm)	25,25±1,76 <sup>a</sup>	23,09±0,76 <sup>b</sup>	21,29±0,78 <sup>c</sup>
Elongación	0,35±0,03 <sup>a</sup>	0,33±0,32 <sup>b</sup>	0,31±0,31 <sup>c</sup>
Espermatozoides evaluados, % (n)	10,11 (1122)	44,64 (4954)	45,25 (5022)
Recién recolectados (RC)	12,25 (696)	41,42 (2354)	46,33 (2633)
Refrigerados (R) a 24 h a 16°C	7,87 (426)	48,01 (2600)	44,12 (2389)
Diferencia (RC vs. R)	- 4,38	+ 6,59	-2,21

N= 11.098 espermatozoides evaluados correspondieron a 27 cerdos.

(a,b,c): letras distintas en la misma fila implicaron diferencias significativas (P<0,01).

ron significativamente entre cada una de las subpoblaciones ( $P < 0.01$ ). En las muestras recién recolectadas el porcentaje de espermatozoides fue mayor para la  $SP_3$  con 46,33% y un número de espermatozoides evaluados de 2.633, siendo la  $SP_2$  la segunda en cuanto a porcentaje (41,42) con un número de 2.354 espermatozoides evaluados y en menor proporción la  $SP_1$  con un porcentaje de 12,25% y 696 espermatozoides. Estos valores cambiaron ligeramente sus proporciones cuando el semen fue sometido a refrigeración a 16°C por 24 horas ya que disminuyeron tanto la  $SP_1$  y  $SP_3$  en un 4,38 y 2,21%, respectivamente; en cambio la  $SP_2$  aumento el porcentaje en 6,59%. Estos hallazgos difirieron de la información suministrada por González *et al.* (2008) en el cual la subpoblación  $SP_1$  contaba con el 28,45% de espermios; la  $SP_2$  con el 51,20% y la  $SP_3$  con el 20,35%. Thurston *et al.* (2001) asumió que la variación en la morfología espermática se originó durante la espermatogenesis, donde el genotipo influenció la estructura del espermatozoide; lo cual derivó en subpoblaciones espermáticas (Quintero-Moreno *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la morfología del espermatozoide parece estar controlado bajo estricto control genético (Roldan *et al.*, 1998).

La metodología empleada para establecer subpoblaciones espermáticas en función de las características de motilidad y morfometría espermática ha sido utilizada en estudios recientes en varias especies (Quintero-Moreno *et al.*, 2003, 2004 y 2007; Rubio-Guillén *et al.*, 2007, González *et al.*, 2008) y se basa en el establecimiento de rangos, denominados grupos o clusters, en base

characteristics, has been used in recent researches in some species (Quintero-Moreno *et al.*, 2003, 2004 and 2007; Rubio-Guillén *et al.*, 2007, González *et al.*, 2008) and is based in the establishment of ranks named groups or clusters, in function to the distances of medium points measured in function of quantitative variables. Peña *et al.*, (2005), established 4 sub-populations in based to the spermatic morphometry in boar semen, while Thurston *et al.*, (2001) established three sub-populations in the semen of this specie.

The refrigeration process at 16°C for 24 hours affects significantly the distribution of the spermatozoids inside the spermatic sub-populations, since  $SP_1$  reduced its percentage from 12.25% to 7.87%, as well as  $SP_3$  with a minimum percentage fro, 46.33% to 44.12%. The sub-population that increased its number of spermatozoids is  $SP_2$  with an increment of 6%, which makes to affirm that the refrigeration process causes the reduction on the size in a fraction of the spermatic population. There are not researches that study the changes that happen in the distribution of spermatic sub-populations morphometrically established product to the refrigeration in short periods of time.

## Conclusions

The slightly changes observed in the biometry of the spermatozoids' head as well as in the percentage distribution were product to the refrigeration and storage procedures of the semen at 16°C for 24 hours.



a las distancias de puntos medios calculados en función de variables cuantitativas. Peña *et al.* (2005), estableció cuatro subpoblaciones en base a la morfometría espermática en semen porcino, mientras que Thurston *et al.* (2001) estableció tres subpoblaciones en el semen de esta especie.

El proceso de refrigeración a 16°C por 24 horas afectó significativamente la distribución de los espermatozoides dentro de las subpoblaciones espermáticas, ya que la SP<sub>1</sub> disminuyó su porcentaje de 12,25% a 7,87%, también lo hizo la SP<sub>3</sub> con un porcentaje mínimo de 46,33% a 44,12%. La subpoblación que aumento su número de espermatozoides fue la SP<sub>2</sub> con un incremento del 6%, lo cual lleva a afirmar que el proceso de refrigeración ocasionó disminución de tamaño de una fracción de la población espermática. No se han evidenciado investigaciones que estudien los cambios que se suscitan en la distribución de las subpoblaciones espermáticas establecidas morfométricamente producto de la refrigeración por cortos periodos de tiempo.

## Conclusión

Los cambios ligeros observados en la biometría de la cabeza de los espermatozoides así como en su distribución porcentual en subpoblaciones espermáticas fueron producto de los procedimientos de refrigeración y almacenamiento del semen a 16°C por 24 horas.

## Agradecimiento

A la empresa privada PROPORCA, por el apoyo incondicional al facilitar las instalaciones y los

## Acknowledgment

The authors thank the private Enterprise PROPORCA by the unconditional support given providing the facilities and the animals to be experimented, also, to the Scientific and Humanistic Development Board of Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) by the economic support for this Project N°: CC-0858-08

*End of english version*

---

---

animales de experimentación, y en especial al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el apoyo económico prestado al financiar el proyecto N°: CC-0858-08.

## Literatura citada

- Althouse, G.C. 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 19:777-782.
- Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenol* 29:1245-1251.
- Barrat, C.L., M.J. Tomlinson y I.D. Cooke. 1995. Prognostic significance of computerized motility análisis for *in vitro* fertility. *Fertil Steril* 60:520-525.
- Buendía, P., C. Soler, F. Paolicchi, G. Gago, B. Urquieta, G. Pérez-Sánchez y E. Bustos-Obregón. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer Computer assisted system. *Theriogenol* 57:1207-1218.
- Cummins, J.M. y P.F. Woodall. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil* 75:153-175.

- Fuentes, A. 2000. Inseminación Artificial Porcina en Venezuela. 1ra Edición. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay (Venezuela). CENIAP- Serie C. 47 p.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenol* 63:431-444.
- González, D., A. Quintero-Moreno, J.J. Garde, M.C. Esteso, M.R. Fernández-Santos, J. Rubio-Guillén, W. Mejía Silva, Y. González, G. León y R. Bohórquez Corona. 2008. Caracterización morfológica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (resultados preliminares). *Revista Científica, FCV-LUZ. XVIII (5):570-577.*
- Gravance, C.G. y R.O. Davis. 1995. Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. *J. Androl* 16:88-93.
- Hidalgo, M., I. Rodríguez, J. Dorado, J. Sanz y C. Soler. 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med Czech.* 50:24-32.
- Hirai, M., A. Boersma, A. Hoeflich, E. Wolf, J. Foll, R. Aumuller y J. Braun. 2001. 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.
- Jhonson, L.A., K.F. Weitze, P. Fiser y W.M. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172. 2000.
- Katz, D.F., J.W. Overstreet, S.J. Samuels, N.P. Niswander, M.T. Bloom y E.L. Lewis. 1986. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility *J. Androl* 7: 203-210.
- King, G.J. y J.W. Mcpherson. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. *J. Anim. Sci.* 36:563-565.
- Martín-Rillo, S., E. Martínez, C. García-Artiga y C. De Alba. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Dom. Anim.* 35:519-526.
- Peña, F.J., F. Saravia, M. García-Herreros, I. Núñez-Martínez, J.A. Tapia, A. Johannisson, M. Wallgren y H. Rodríguez-Martínez. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J. Androl* 26:716-723.
- Pérez-Llano, B., P. Yenes-García y P. García-Casado. 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenol* 60:1401-1407.
- Quintero-Moreno, A., J. Miró, T. Rigau y J.E. Rodríguez-Gil. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenol* 59:973-1990.
- Quintero-Moreno, A., T. Rigau y J.E. Rodríguez-Gil. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. *Theriogenol* 61:673-690.
- Quintero-Moreno, A., T. Rigau y J.E. Rodríguez-Gil. 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod Dom Ani.* 42:312-319.
- Quintero-Moreno, A., D. González, J.J. Garde, M. Esteso, M.R. Fernández, J.L. Carvalho, W. Mejía y G. León. 2009. Valoración morfológica de la cabeza del espermatozoide de cerdo doméstico según su edad. *Revista Científica, FCV-LUZ. XIX (2):153-158.*
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Domest. Anim.* 38:312-318.
- Roldán, E.R.S., J. Cassinello, T. Abaigar, y M. Gomendio. 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry and ejaculate quality in a endangered ungulate. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 265:243-248.

Rubio-Guillén, J., D. González, J. Garde, M. Esteso, F. Fernández-Santos, J. E. Rodríguez-Gil, J. E., N. Madrid-Bury y A. Quintero-Moreno. 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Domest. Anim.* 42. 354-357.

Thurston, L.M., P.F. Watson, A.J. Mileham y W.V. Holt. 2001. 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.