

# EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD ACROSOMAL Y LA FUNCIONALIDAD BIOQUÍMICA DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN CERDOS REPRODUCTORES CON GOTAS CITOPLÁSMICAS PERSISTENTES<sup>1</sup>

## Acrosomal Integrity and Biochemical Functionality Assessment of the Sperm Membrane in Boars With Persistent Cytoplasmic Droplets

Orlando Díaz Franco<sup>2</sup>, Henry Mesa<sup>3</sup>, Juan Guillermo Valencia Mejía<sup>4</sup>, Germán Gómez Londoño<sup>5</sup> y Francisco Javier Henao Uribe<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup> Contribución del grupo de investigación Biotecnología Agraria. <sup>2</sup> MVZ. Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas. <sup>3</sup> Ph.D. Instituto de Biotecnología Agropecuarias, Universidad de Caldas. <sup>4</sup> MVZ. Laboratorio de Producción Porcina, Universidad de Caldas. <sup>5</sup> MVZ. Departamento de Sistemas de Producción. Universidad de Caldas. <sup>6</sup> Ph.D. Instituto de Biotecnología Agropecuaria, Universidad de Caldas. \*E-mail: fhenao@ucaldas.edu.co, Calle 65 N° 26-10, Manizales, Colombia.

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la integridad acrosomal, funcionalidad bioquímica de la membrana espermática y las relaciones entre éstas en machos con y sin persistencia de gotas citoplásmicas (PGC). Se usaron 254 eyaculados de 48 cerdos reproductores entre ocho y 48 meses de edad clasificados como jóvenes (<1 año), maduros (entre uno y tres años) y viejos (>3 años). Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza para medidas repetidas en un mismo individuo (efecto aleatorio). Se evaluó el efecto de procedencia (efecto bloque) y grupo etáreo sobre: PGC, integridad acrosomal, funcionalidad de membrana, proporción de espermatozoides vivos y con gotas citoplásmicas (GC). Además se evaluó el efecto de PGC sobre la integridad acrosomal y la funcionalidad de membrana. La presentación de PGC fue menor en cerdos reproductores jóvenes (37 ± 6%) que en los maduros (52 ± 5%; P=0,05) y los viejos (85 ± 13%; P<0,01). La diferencia en PGC entre machos maduros y viejos fue significativa (P=0,05). Los machos viejos presentaron mayor proporción de células con GC que los jóvenes (34,6 ± 4,8 vs. 19,7 ± 2,3%, respectivamente; P=0,01), mientras que los maduros no fueron diferentes de ninguno de los dos (23,5 ± 2,1%). Los cerdos reproductores que no presentaron PGC obtuvieron mayores valores de acrosoma intacto que los que presentaron PGC (86,5 ± 1,2 vs. 80,2 ± 1,1 %, respectivamente; P<0,01). Los defectos de la integridad acrosomal pre-

sentaron correlaciones significativas con defectos espermáticos asociados a GC (entre -0,20 y -0,36; P<0,05). Este estudio indica que cerdos reproductores mayores de tres años presentan con mayor frecuencia eyaculados de baja calidad espermática. Los resultados además sugieren que los defectos de membrana y morfológicos tienden a presentarse conjuntamente en un eyaculado, señalando la necesidad de construir un índice de calidad seminal multifactorial que pueda usarse como criterio de decisiones en la industria porcina.

**Palabras clave:** Porcino, gotas citoplásmicas, acrosoma, semen.

### ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the acrosomal integrity, biochemical functionality of the sperm membrane, and the relationship between them in boars with and without persistence of cytoplasmic droplets (PGC). It were used 254 ejaculates from 48 boars between eight and 48 months of age that were classified as young (<1 year), mature (1 to 3 years), and old (>3 years). Data were analyzed using analysis of variance for repeated measurements in the same individual (random effect). The effect of source (block effect) and age group on PGC, acrosomal integrity, membrane function, and proportion of live and with cytoplasmic droplets sperm cells were evaluated. The effect of PGC on acrosomal integrity and membrane function was also tested. Presence of PGC was lower in young (37 ± 6%) than mature (52 ± 5%; P=0.05) and old (85 ± 13%; P<0.01) boars.

The difference in PGC between mature and old boars was significant ( $P=0.05$ ). Old boars showed a higher proportion of cells with GC than young ones ( $34.6 \pm 4.8$  vs.  $19.7 \pm 2.3\%$ , respectively;  $P=0.01$ ), while mature boars were no different from the other two groups ( $23.5 \pm 2.1\%$ ). Boars that did not show PGC had a higher proportion of intact acrosomes than those with PGC ( $86.5 \pm 1.2$  vs.  $80.2 \pm 1.1\%$ , respectively;  $P<0.01$ ). Defects in acrosomal integrity were significantly correlated with sperm defects associated to GC (between  $-0.20$  y  $-0.36$ ;  $P<0.05$ ). These results suggest that membrane and morphologic defects tend to occur together in the same ejaculate, pointing out the need to build a multifactor seminal quality index that can be used as decision criterion in the swine industry.

**Key words:** Pig, cytoplasmic droplet, acrosome, semen.

## INTRODUCCIÓN

El reducido control sobre la calidad seminal de cerdos (*Sus scrota*) reproductores amenaza la productividad y la competitividad de la industria porcina por la variabilidad inducida en tamaño de camada y tasa de partos. La complejidad de los factores que intervienen en la biología de la fecundación es determinante para cualquier predicción respecto al uso de semen en programas de inseminación artificial (IA) en porcinos [2]; entre estos factores están: medio ambiente [34], nutrición [22, 37], sanidad [23], momento de la inseminación [19] y calidad seminal [12, 31]. Este último factor ha sido asociado al tamaño de camadas y a la tasa de partos [1, 4, 15].

Un buen programa de utilización de un cerdo reproductor propende obtener de manera consistente una alta producción de espermatozoides viables, que localizados oportunamente en el tracto reproductivo de la hembra aseguren tasas de fertilización superiores al 95%. Según Braundmeier y Millar [3], los caracteres seminales relacionados con la fertilidad se dividen en compensables y no compensables; los primeros no afectan la fertilidad, siempre y cuando se emplee un exceso de células espermáticas en la IA. A este grupo pertenecen la motilidad y la morfología; los segundos afectan negativamente la función del espermatozoide en etapas tardías de la fertilización y del desarrollo embrionario [9], impiden la actuación de una célula normal y no pueden ser contrarrestados por el número de células usado en IA. A este grupo pertenecen: vacuolas nucleares, deficiencias morfológicas que supriman el movimiento, y una estructura defectuosa de la cromatina.

El defecto espermático que más frecuentemente disminuye la calidad del eyaculado porcino es el exceso de gotas citoplásmicas, las que pueden presentarse asociadas a defectos funcionales o estructurales de la membrana, lo que disminuye la capacidad fecundante. Los umbrales usados en la actualidad para aceptar o rechazar un eyaculado para su uso en inseminación artificial consideran cada defecto espermático por separado y no hacen consideración de las posibles asociaciones entre éstos y su efecto conjunto sobre la fertilidad. Mien-

tras no se conozcan con precisión las interrelaciones entre los defectos espermáticos no será posible establecer un sistema de producción y evaluación de semen que responda con uniformidad y confiabilidad a las necesidades de la industria porcina. El objetivo del presente estudio fue evaluar las relaciones entre la integridad acrosomal, la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática (FBM) y las anomalías morfológicas de cerdos reproductores de diferentes edades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**General.** Se analizaron 254 eyaculados de 48 cerdos reproductores con edades entre ocho y 48 meses, pertenecientes a cuatro centros comercializadores de semen. Los animales fueron alimentados con agua a voluntad y concentrado con 16% de proteína, 3% de grasa, 8% de fibra, 9% de cenizas y 13% de humedad (1 Kg. dos veces al día); alojados en corrales individuales de 2,5 x 3,0 m; inmunizados y desparasitados según el plan sanitario establecido en cada granja. Los eyaculados se colectaron por la técnica de la mano enguantada entre las 04:00 y 06:00 horas y fueron envasados en dosis con  $3 \times 10^9$  espermatozoides diluidos en Beltsville Thawing Solution (BTS). [16] para un volumen final de 80 a 100 mL. Las muestras fueron analizadas en el momento mismo de la llegada al laboratorio en condiciones consideradas representativas de la llegada del semen a las granjas que lo usan en IA.

**Evaluación de variables seminales:** La concentración espermática se evaluó en la cámara de Bürker (Kubus, Polígono Industrial Európolis, España) con 5  $\mu$ L de una dilución 1:200 (5  $\mu$ L de semen y 995  $\mu$ L de solución salina formolada en microscopio de luz (Alphaphot 2; YS2; Nikon, Japón) a 400X de magnificación. La morfología espermática se evaluó mediante fijación con solución salina formolada (en dilución 1:1) y visualización en un microscopio de contraste de fases (Alphaphot 2, con MCL; YS2; Nikon, Japón), a 400X de magnificación para clasificar 300 espermatozoides así: espermatozoides normales, con defectos de cabeza (suelta, macrocabeza, microcabeza y piriforme), tracto intermedio (doble, excéntrico, lazo y engrosado), cola (látigo, ovillo, ovillo gota (Ogot), lazo, escalera y reflejo distal de la pieza media (Rdist)), gota citoplásmica (GC) proximal (GCP) y distal (GCD). La integridad acrosomal se evaluó con dos técnicas. En la primer técnica, los espermatozoides se fijaron con glutaraldehído al 2% (en dilución 1:1) y se clasificaron en un microscopio de contraste de fases a 400X de magnificación, en dos conteos independientes de 100 cada uno, en porcentaje células con: cresta apical normal (NAR), cresta apical dañada (DAR), cresta apical perdida (MAR) y capuchón acrosómico suelto (LAC) con base en la clasificación de Pursel y col. [29, 30]. En la segunda técnica, se usó la tinción Wells-Awa [36], usando alcohol etílico, eosina B y verde brillante, en concentración, tiempo, temperatura y método de secado especificado por los autores. La clasificación se realizó en un microscopio de luz convencional a 1600X de magnificación y por conteo de 200 espermatozoi-

des, teniendo en cuenta los espermatozoides que presentaban la cresta apical lisa y entera como íntegros (FCF). La supervivencia espermática se evaluó por extendido con Eosina-Nigrosina (en dilución 1:1). La visualización se realizó en un microscopio de luz convencional a 400X de magnificación y conteo de 100 espermatozoides, teniendo en cuenta los que permanecieron translúcidos como vivos. La FBM se evaluó mediante el *short Hyposmotic Swelling Test* (sHOST) [26, 27] así: se sometieron de forma independiente a 37°C, 100 µL de semen y 900 µL de solución hipoosmótica (100 mOsm/L); pasados cinco minutos, se mezclaron 100 µL de semen con la solución hipoosmótica y pasados 10 minutos más, se fijaron 400 µL de esta mezcla en 500 µL de solución salina formulada. Por visualización en un microscopio de contraste de fases a 400X de magnificación se clasificaron 200 espermatozoides teniendo en cuenta los que sufrieron algún tipo de enroscamiento como positivos.

La persistencia de GC (PGC) se definió como la presencia de un porcentaje total de GC (TGC, la suma de GCP, GCD, Rdist y Ogot) superior a 15% en por lo menos dos evaluaciones consecutivas de un mismo cerdo reproductor. Los valores de NAR y FCF se definieron como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro. Los cerdos reproductores fueron clasificados en grupos de edad como jóvenes ( $\leq 1$  año), maduros (entre 1 y 3 años) y viejos ( $> 3$  años).

**Procedimientos estadísticos.** Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza para medidas repetidas usando el PROC GLM y correlaciones mediante el PROC CORR de SAS [32]. El modelo estadístico evaluó el efecto de grupo etéreo, individuo (efecto aleatorio) y procedencia (efecto bloque) sobre: integridad del acrosoma, FBM, células con GC (GCP, GCD, Ogot y Rdist), TGC, PGC, porcentaje de espermatozoides vivos y otras anomalías morfológicas. Las comparaciones múltiples se ajustaron usando el método de Tukey-Kramer [32]. También se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de PGC sobre las variables seminales anteriormente señaladas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se presentan los parámetros seminales de cerdos reproductores jóvenes, maduros y viejos. Los cerdos reproductores jóvenes mostraron menor prevalencia de PGC que los maduros ( $P < 0,05$ ) y viejos ( $P < 0,01$ ), y los maduros menor que los viejos ( $P < 0,05$ ). Además, los machos jóvenes presentaron valores mayores de integridad acrosomal y supervivencia espermática que los viejos ( $P < 0,05$ ). Los cerdos reproductores viejos mostraron mayor cantidad de cabezas piriformes ( $P < 0,01$ ). Estos resultados concuerdan con otras investigaciones que indican que cerdos reproductores a partir de

TABLA I  
**PARÁMETROS SEMINALES DE CERDOS REPRODUCTORES JÓVENES, MADUROS Y VIEJOS / SEMINAL PARAMETERS OF YOUNG, MATURE, AND OLD BOARS.**

Variable*	Grupo etéreo		
	Jóvenes	Maduros	Viejos
PGC	36,7 ± 6,0 <sup>a</sup>	51,8 ± 5,5 <sup>b</sup>	85,1 ± 12,7 <sup>c</sup>
NAR	85,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	84,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	78,1 ± 2,4 <sup>b</sup>
FCF	84,5 ± 1,3	85,5 ± 1,0	85,5 ± 2,3
FBM	54,7 ± 1,8	59,3 ± 1,6	54,0 ± 3,5
Rdist	6,0 ± 1,3	6,5 ± 1,1	4,7 ± 2,6
Ogot	1,8 ± 0,7	1,8 ± 0,7	3,9 ± 1,5
GCD	8,0 ± 1,0	10,3 ± 0,9	13,1 ± 2,1
GCP	5,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,7 <sup>b</sup>
TGC	19,7 ± 2,3 <sup>a</sup>	23,5 ± 2,1 <sup>ab</sup>	34,6 ± 4,8 <sup>b</sup>
Vivos	87,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	87,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	78,9 ± 2,3 <sup>b</sup>
Piri	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>b</sup>

\* Los valores presentados son % ± error estándar.

PGC: Persistencia de gotas citoplásmicas.

NAR: Cresta apical normal, evaluada por fijación con glutaraldehído al 2%.

FCF: Acrosoma íntegro y liso, evaluada por tinción de Wells y Awa [35].

FBM: Funcionalidad bioquímica de la membrana plasmática.

Rdist: Reflejo distal de la pieza media.

Ogot: Ovillo gota.

GCD: Gota citoplásmica distal.

GCP: Gota citoplásmica proximal.

TGC: Total de gotas citoplásmicas.

Piri: Cabeza piriforme.

Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

los seis meses de edad pueden generar eyaculados normales [13], pero que con la edad avanzada aumentan las anomalías morfológicas [33].

Los resultados obtenidos en la evaluación de la integridad acrosomal (TABLA I y II) son similares a aquellos obtenidos en toros (*Bos taurus-indicus*), caballos (*Equus caballus*), cabras (*Capra hircus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y ratas (*Rattus norvegicus*) usando las mismas técnicas [36]. La integridad acrosomal de los cerdos reproductores que no tenían PGC fue mayor que en los cerdos reproductores que tenían PGC (TABLA II).

Las correlaciones entre las diferentes variables evaluadas se presentan en la TABLA III. Las GC se correlacionaron con daños en la integridad acrosomal. Es posible que el ambiente epididimario que genera espermatozoides inmaduros (con presencia de GC [5, 18, 28]) también altere los componentes de la membrana acrosomal. La GCD no se correlacionó con la integridad acrosomal cuando los espermatozoides se fijaron con glutaraldehído. Bonet y col. [2], en una visualización ultraestructural de los espermatozoides, encontraron vesículas citoplásmicas similares a las GC en forma y posición pero diferentes en composición interna. Este hallazgo puede dar la pauta para explicar la posible existencia de uno o varios factores no comunes entre las técnicas de evaluación de la integridad acrosomal que diferencien elementos asociados a las GCD. Los resultados de FCF se correlacionaron débilmente con FBM, aunque las técnicas para evaluar la integridad acrosomal se correlacionaron mediana y significativamente entre sí. Estos resultados concuerdan con los resultados de Pérez-Llano y col. [27], quienes plantean la independencia regional de la membrana plasmática de la cola

y de la cabeza del espermatozoide porcino. Según Pérez-Llano y col. [26], los valores de FBM hallados en el presente trabajo (TABLA I) indican que los eyaculados son de baja calidad. El valor de FBM en porcinos es de gran importancia porque tiene relación directa con los procesos de capacitación, reacción acrosómica y en la unión del espermatozoide con la superficie del ovocito [17, 21]. La pobre correlación de FBM con Rdist y Ogot puede describir el margen de error de la prueba por la similitud entre la respuesta al sHOST de los espermatozoides viables y las características morfológicas de Rdist y Ogot, aunque no es posible asegurar que la membrana espermática de Rdist y Ogot es inviable.

La GC se forma por la reducción del citoplasma de la espermátide antes de que esta se desprenda del epitelio germinal [18] y es liberada en gran proporción antes, durante o inmediatamente después de la eyaculación [5, 10, 28], y se absorbe en el epidídimo o se presenta de forma libre en el eyaculado [18]. La GC se caracteriza por tener elementos vesiculares internos derivados de la membrana como remanentes de Golgi, otros organelos de la espermátide degradados en el estado final espermiogénico [10, 18, 25] y poseer actividad enzimática hidrolítica [8, 11, 20]. Es posible que esta actividad enzimática, asociada a factores que alteran el proceso de maduración espermática tales como: dieta limitada en antioxidantes [24], alteración en el patrón de absorción y secreción de los fluidos epididimarios que regulan la osmolalidad [7, 28] o genéticos [6], coincidan con la debilidad de la estructura de la membrana donde se encuentre la GC. En este sitio se genera la fragilidad que posibilita el giro simple o el enrollamiento del flagelo [7, 28, 38], formando las alteraciones conocidas como Rdist y Ogot, respectivamente. La presentación

TABLA II

**PARÁMETROS SEMINALES DE CERDOS REPRODUCTORES CON Y SIN PERSISTENCIA DE GOTAS CITOPLÁSMICAS / SEMINAL PARAMETERS OF BOARS WITH AND WITHOUT PERSISTENCE OF CYTOPLASMIC DROPLETS.**

Variable*	Machos con PGC	Machos sin PGC	Significancia de la diferencia
FCF	83,5 ± 1,2	87,0 ± 1,1	P<0,01
NAR	80,2 ± 1,1	86,5 ± 1,2	P<0,01
Rdist	9,6 ± 1,1	0,4 ± 1,2	P<0,01
Ogot	3,4 ± 0,7	1,2 ± 0,8	P<0,01
GCD	14,3 ± 0,9	5,2 ± 0,9	P<0,01
GCP	10,3 ± 0,7	3,6 ± 0,7	P<0,01
TGC	37,0 ± 1,6	10,7 ± 1,7	P<0,01
FBM	57,0 ± 1,7	54,7 ± 1,8	NS
Vivos	84,01 ± 1,1	85,5 ± 1,1	NS

\* Los valores presentados son % ± error estándar.

PGC: Persistencia de gotas citoplásmicas.

FCF: Acrosoma íntegro y liso evaluado con la tinción de Wells y Awa [35].

NAR: Cresta apical normal evaluado con la fijación de glutaraldehído al 2%.

Rdist: Reflejo distal de la pieza media.

Ogot: Ovillo gota.

GCD: Gota citoplásmica distal.

GCP: Gota citoplásmica proximal.

TGC: Total de gotas citoplásmicas.

FBM: Funcionalidad bioquímica de la membrana espermática.

NS: no significativa.

TABLA III  
CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES EVALUADAS / CORRELATIONS AMONG THE VARIABLES ASSESSED.

	FCF	NAR	FBM	Rdist	Ogot	GCD	GCP	TGC
NAR	0,44*							
FBM	-0,20**	NS						
Rdist	-0,23**	-0,28*	0,17**					
Ogot	-0,20**	-0,13**	-0,14**	0,12**				
GCD	-0,27*	NS	NS	0,32*	NS			
GCP	-0,27*	-0,36*	NS	0,14**	0,15**	0,29*		
TGC	-0,36*	-0,39*	NS	0,75*	0,18*	0,73*	0,61*	
Vivos	NS	NS	NS	NS	NS	-0,20*	-0,17*	-0,22*

\* P<0,01.

\*\* P<0,05.

NS: No significativo (P>0,05).

de GC fue elevada (TABLA I y II) y afectó significativamente la calidad del eyaculado, principalmente la integridad acrosomal y la morfología espermática, características indispensables en el proceso de fertilización [12, 14, 35].

## CONCLUSIONES

Este estudio indica que cerdos reproductores mayores de tres años presentan con mayor frecuencia eyaculados de baja calidad, afectada principalmente por las GC. Además sugiere que los defectos de membrana y morfológicos tienden a presentarse conjuntamente en un eyaculado, señalando la necesidad de construir un índice de calidad seminal multifactorial que pueda usarse como criterio de decisiones en la industria porcina. Debido a la ausencia de registros sistematizados y confiables en las explotaciones analizadas no fue posible correlacionar los resultados *in vitro* con la fertilidad en campo. Esta debilidad dificulta el establecimiento de umbrales que correlacionen de manera acertada los parámetros indicadores de calidad seminal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARDÓN, F.; EVERT, M.; BEYERBACH, M.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Accesory Sperm: A Biomonitor of Boar Sperm Fertilization Capacity. **Theriogenol.** 63: 1891-1901. 2005.
- [2] BONET, S.; BRIZ, M.; FRADERA, A. Ultrastructural Abnormalities of Boar Spermatozoa. **Theriogenol.** 40: 383-396. 1993.
- [3] BRAUNDMEIERS, A.G.; MILLAR, D.J. The search is on: Finding accurate molecular markers of male fertility. **J. Dairy. Sci.** 84: 1915-1925. 2001.
- [4] BRAUNDMEIERS, A.G.; DEMERS, J.M.; SHANKS, R.D.; MILLAR, D.J. The Relationship of Porcine Sperm Zona-Binding Ability to Fertility. **J. Anim. Sci.** 82: 452-458. 2004.
- [5] BRIZ, M.D.; BONET, S.; CAMPS, R. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. **Anim. Reprod. Sci.** 43: 221-239. 1996.
- [6] CHENOWENT, P.J. Genetic sperm defects. **Theriogenol.** 64: 457-468. 2005.
- [7] COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microsc. Res. Tech.** 61: 28-38. 2003.
- [8] DOTT, H.M.; DINGLE, J.T. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. **Exp. Cell. Res.** 52: 523-540. 1968.
- [9] EVENSON, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reprod. Fétil. Dev.** 11 (1): 1-15. 1999.
- [10] FISCHER, K.A.; VAN LEYEN, K.; LOVERCAMP, K.W.; MANANDHAR, G.; SUTOVSKY, M.; FENG, D.; SAFRANSKY, T.; SUTOVSKY, P. 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic Droplet. **Reprod.** 130: 213-222. 2005.
- [11] FISCHER, M.C.; WILLIS, J.; ZINI, A. Human Sperm DNA Integrity: Correlation with sperm cytoplasmic droplets. **Urol.** 61: 207-211. 2003.
- [12] FLOWERS, W.L. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **J. Anim. Sci.** 80 (E. Suppl. 1): E47-E53. 2002.
- [13] FLOWERS, W.L. An Overview of Anatomy and Physiology of the Boar. **Midwest Boar Stud Conference II.** St. Louis, MO. July 20 to 24. 6-14 pp. 2004.
- [14] FLOWERS, W.L. Detailed Description of Sperm Motility/Morphology and Causes of Abnormalities. **Midwest Boar Stud Conference II.** St. Louis, MO. July 20 to 24. 15-22 pp. 2004.

- [15] GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reprod. Dom. Anim.** 39: 303-308. 2004.
- [16] JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISHER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Anim. Reprod. Sci.** 62: 43-172. 2000.
- [17] JUHASZ, J.; NAGY, P.; KULCSAR, M.; HUSZENICZA, G. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. **Acta Vet. Brno.** 69: 247-259. 2000.
- [18] KAPLAN, M.; RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N.; MARTAN, J. Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes. **Tissue and Cell.** 16 (3): 455-468. 1984.
- [19] KNOX, R.V.; RODRIGUEZ, Z.S.L. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. **J. Anim. Sci.** 79: 2957-2963. 2001.
- [20] KUSTER, C.E.; HESS, R.A.; ALTHOUSE, G.C. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. **J. Androl.** 25: 340-346. 2004.
- [21] LECHNIAK, D.; KEDZIERSKI, U.; STANISLAWSKI, D. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. **Reprod. Domest. Anim.** 37 (6): 379-80. 2002.
- [22] LOUIS, G.F.; LEWIS, A.J.; WELDON, W.C.; ERMER, P.M.; MILLER, P.S.; KITTOCK, R.J.; STROUP, W.W. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. **J. Anim. Sci.** 72: 2038-50. 1994.
- [23] MADSEN, K.S. Management of disease control and epidemics in AI in denmark. **Theriogenol.** 63: 585-594. 2005.
- [24] MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; PATE, J.L. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. **J. Anim. Sci.** 78: 1537-1543. 2000.
- [25] OKO, R.; HERMO, L.; CHAN, P.T.K.; FAZEL, A.; BERGERON, J.J.M. The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. **J. Cell. Biol.** 123 (4): 809-821. 1993.
- [26] PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCÍA-CASADO, P.A. Short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenol.** 56: 387-398. 2001.
- [27] PÉREZ-LLANO, B.; YENES-GARCÍA, P.; GARCÍA-CASADO, P. 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. 2003.
- [28] PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.D.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. **Theriogenol.** 63: 2219-2232. 2005.
- [29] PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; RAMPACECK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **J. Anim. Sci.** 34:278-283. 1972.
- [30] PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim. Sci.** 35 (3): 580-584. 1972.
- [31] ROZEBOOM, K.J. Evaluating of Boar Semen Quality. Animal Science Facts. Extension Swine Husbandry. **College of Agriculture & Life Sciences.** North Carolina State University. 1-8 pp. 1999.
- [32] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT® User's Guide (Release 6.11). 1995.
- [33] ŠERNIENE, L.; RIŠKEVICIENE, V.; BANYS, A.; ŽILINSKAS, H. Effects of age, and season on sperm qualitative parameters in lithuanian white and petren boars. **Veter. ir Zoot.** T. 17 (39). 2002.
- [34] SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on sperm morphology in duruc boars under different housing systems in Thailand. **J. Vet. Med. Sci.** 67 (8): 777-785. 2005.
- [35] WABERSKI, D.; MEDING, S.; DIRKSEN, G.; WEITZE, K.F.; LEIDING, C.; HAHN, R. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. **Anim. Reprod. Sci.** 36: 145-151. 1994.
- [36] WELLS, M.E.; AWA, O.A. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. **J. Dairy Sci.** 53: 227-232. 1970.
- [37] WILSON, M.E.; ROZEBOOM, K.J.; CRENSHAW, T.D. Boar nutrition for optimum sperm production. **Adv. in Pork Prod.** 15: 295-306. 2004.
- [38] YEUNG, C-H.; SONNENBERG-RIETHMACHER, E.; COOPER, T.G. Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. **Biol. Reprod.** 61: 1062-1069. 1999.