

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO MEDIANTE ANÁLISIS COMPUTARIZADO (RESULTADOS PRELIMINARES).

Morphometry Characterization of Boar Sperm Head with Computer Assisted Analysis (Preliminary results).

Decio González Villalobos^{1,2}, Armando Quintero-Moreno^{1,2}, José Julián Garde López-Brea^{3,4}, Milagros C. Esteso^{3,4}, María Rocío Fernández-Santos^{3,4}, Jorge Rubio-Guillén^{1,2}, Willian Mejía Silva², Yuleima González Marval¹, Gonzalo León Atencio⁵ y Rafael Bohórquez Corona^{1,6}

¹Laboratorio de Andrología. ²Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA)/ Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. Universidad del Zulia (LUZ). E-mail: arturo93@cantv.net. 0261-7596111 (A. Quintero-Moreno).

³IREC (UCLM-CSIC-JCCM). Campus Universitario s/n, 02071. Albacete, España. ⁴Sección de Recursos Cínicos y Ganaderos, IDR, (UCLM). Albacete, España. ⁵Empresa PROPORCA C.A. ⁶Unidad de Investigación en Reproducción Animal (UNIRA), FCV-LUZ.

RESUMEN

Para determinar los parámetros morfométricos de la cabeza espermática en semen porcino, así como evidenciar la presencia de subpoblaciones espermáticas fueron evaluadas 20 muestras seminales de 10 verracos Dalland. Sobre semen fresco y refrigerado fue evaluada la motilidad, vitalidad, acrosomas alterados y/o ausentes y anomalías espermáticas. Mediante el análisis automatizado de la morfología espermática (ASMA), en frotis teñidos con Hemacolor®, se realizaron las mediciones de la cabeza espermática: Longitud (μm), Ancho (μm), Área (μm^2), Perímetro (μm) y función Largo/Ancho. El efecto del proceso de refrigeración sobre las variables de calidad seminal y morfometría, se analizaron utilizando el GLM (SAS®) y para identificar las subpoblaciones espermáticas, se utilizó el procedimiento FASTCLUS (SAS®). La refrigeración a 16°C por 24 horas no afectó las características de calidad seminal de los eyaculados, pero sí afectó las características morfométricas. La longitud de la cabeza disminuyó de 8,82 a 8,71 μm , así como el perímetro de 30,08 a 29,05 μm , mientras que aumentaron los valores de ancho (4,36 a 4,45 μm) y área (33,13 a 33,14 μm^2). Se identificaron tres subpoblaciones espermáticas, con valores de distribución de 28,45% para la subpoblación 1 (espermatozoides grandes), 51,20% para la subpoblación 2 (medianos) y 20,35% para la subpoblación 3 (pequeños), las cuales se ven alteradas significativamente durante el proceso de refrigeración a 16°C.

Palabras clave: Semen, morfometría, refrigeración, subpoblaciones espermáticas, verracos.

ABSTRACT

To determine the morphometric parameters of the sperm head, and identify the presence of separate sperm subpopulations in boar semen were evaluated 20 ejaculate samples of 10 boars. Sperm motility, viability, acrosome integrity and morphological abnormalities were evaluated on fresh and cooling semen samples. By means Assisted Sperm Morphometry Analysis (ASMA), in slides stained by Hemacolor®, were determined the morphometric dimensions: Length (μm), Width (μm), Area (μm^2), Perimeter (μm), and function Length/Width. Effect of cooling procedure on variables of semen quality and morphometric parameters were analyzed using GLM (SAS®). For identify the sperm subpopulations was used FASTCLUS procedure (SAS®). Cooling at 16°C for 24 hours did not affect the parameters of semen quality, but affected morphometric characteristics. Sperm head length decreased of 8.82 to 8.71 μm , and the sperm head perimeter of 30.08 to 29.05 μm , however, the width (from 4.36 to 4.45 μm) and area sperm head increased (33.13 to 33.14 μm^2). Our results demonstrated that three separate sperm subpopulations coexist in boar ejaculates, 28.45% in the subpopulation 1 (larges), 51.20% in the subpopulation 2 (average), and 20.35% in the subpopulation 3 (small). These sperm subpopulation changed their distribution during cooling process.

Key words: Semen, morphometry, 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 afectan la fertilidad [12]. A medida que se ha sofisticado la tecnología para estudiar las características y funciones de los espermatozoides en forma individual, se ha hecho obvio que existe una considerable heterogeneidad [39]. El análisis computarizado 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 sensibilidad [12, 34]. Esta es una técnica desarrollada como consecuencia de los avances en el análisis de imágenes computarizadas [37] facilitando la evaluación rápida de un gran número de espermatozoides y determinando varios aspectos de la funcionalidad espermática [5, 8, 19], atenuando en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal y garantizando una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide [21].

Uno de los aspectos que considera esta técnica es la morfología espermática. El análisis automatizado de la morfología espermática (Automated Sperm Morphology Analysis -ASMA-) provee una determinación de las dimensiones y la forma del espermatozoide (morfometría) de una manera más objetiva y reproducible [5, 13, 23] siendo utilizada desde hace algún tiempo en forma rutinaria para determinar problemas reproductivos en hombres [23, 36] y en forma experimental, para determinar las dimensiones individuales de los espermatozoides en bovinos (*Bos taurus*) [15, 17, 34], caballos (*Equus caballus*) [14], caprinos (*Capra hircus*) [13, 16], ciervo rojo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) [9] y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) [12]. El estudio sobre la morfometría espermática en cerdos ha sido muy limitado [20, 29, 39], a pesar de que los resultados obtenidos al relacionar la morfometría espermática y el potencial de fertilidad de una muestra seminal han sido prometedores [4, 6].

Aplicando procedimientos estadísticos como el análisis multivariado de agrupamiento de observaciones a los resultados obtenidos del ASMA, ha sido posible determinar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides en un mismo eyaculado de varias especies [30, 31, 32], así como, se ha conseguido medir las dimensiones de las cabezas espermáticas en espermatozoides de machos fértiles y sub-fértiles [35, 39]. El ASMA también ha sido de suma importancia para demostrar el efecto de la criopreservación sobre las dimensiones de la cabeza espermática del toro [18], humano [38], caprinos [17], caballo [2] y ciervo rojo [9].

Los objetivos de esta investigación fueron: (1) determinar los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides del semen de reproductores porcinos, obtenidos de eyaculados frescos y refrigerados durante 24 horas, (2) evidenciar la presencia de subpoblaciones espermáticas según las dimensiones de la cabeza del espermatozoide del cerdos, además de [3] identificar los cambios proporcionales de dichas subpoblaciones en función del proceso de refrigeración a 16°C por 24 horas.

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-ecológicamente caracterizada como bosque seco tropical [10]. Se utilizaron eyaculados pertenecientes a 10 verracos de 2 años de edad y de la línea genética Dalland Tempo (TOPIGS, Canadá), que han sido utilizados con una frecuencia de 2 veces por semana en los últimos 12 meses y mantenidos bajo un ambiente controlado (temperatura 25-28°C y humedad relativa de 60-70%). La extracción fue obtenida mediante manipulación manual [24], 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 mediante una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica (Osaka, OK 51, España) a 37°C, se colocaron cubreobjetos y se observaron al microscopio binocular (Globe, modelo 1600, Alemania) con objetivo de 40X. 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 [28].

La concentración de espermatozoides/mL se valoró con 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). Se contaron los espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadros de la misma. El volumen ocupado por los 5 cuadros a contar, multiplicado por la dilución, origina el factor de multiplicación (5000) y la concentración espermática resulta de la siguiente ecuación:

Concentración de espermatozoides/mL = Nº 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, contaje total >10x10⁹ espermatozoides), se diluyeron con el producto comercial MR-A (Kubus, España) en una cantidad suficiente para que resulte una concentración final de 40 x 10⁹ espermatozoides por L, de esta dilución se tomaron muestras para realizar extendidos en portaobjetos para 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 100 mL y refrigerado a 16°C por 24 horas. Cada botella contiene una dosis de 4.000 millones de espermatozoides.

Análisis de la Vitalidad y Morfología

Estas pruebas fueron realizadas al semen fresco y al semen refrigerado a 16°C por 24 horas. Se colocó 10 µL en un

portaobjeto atemperado a 37°C en una platina termostática y se mezclaba con 10 µL del colorante eosina-nigrosina [3], 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 (GCP) y distal (GCD), además, se determinó el porcentaje de espermatozoides con alteración del acrosoma, descrito de manera individual.

Análisis de la Morfometría Espermática

Para evaluar la morfometría de la cabeza espermática se utilizó sobre los extendidos de semen fresco y refrigerado, la tinción HEMACOLOR (Merck, Darmstadt, Alemania, Cat. No. 11661). 24 horas más tarde, las muestras teñidas fueron permanentemente fijadas en las láminas portaobjetos con fosfato dibutil xileno (DPX). La evaluación de la morfometría espermática (ASMA) se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la Universidad de Castilla La Mancha, España. 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/ Labophot-2, Tokyo, Japón) con un objetivo de campo claro y una cámara de vídeo (Sony/ CCD AVC-D7CE, Sony Corporation, Tokyo, Japón) conectada a un procesador *Pentium* 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 150 medidas de cabeza espermática por muestra y aquellas medidas de cabeza inapropiadas fueron excluidas del análisis. Las células espermáticas se seleccionaron al azar para el análisis morfométrico. Las medidas de cada cabeza espermática de cada verraco en fresco y refrigerado, 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 del proceso de refrigeración (fresco vs. refrigerado) sobre las variables eva-

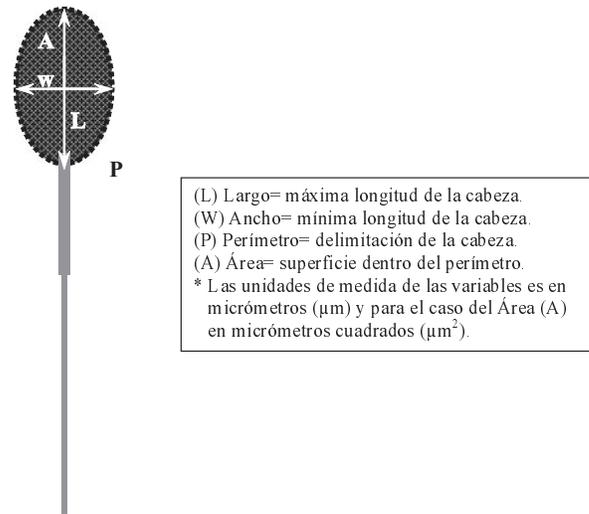


FIGURA 1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO / MORPHOMETRIC PARAMETERS EXAMINED IN THIS STUDY.

luadas de calidad seminal 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). 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 obtenidas de la cabeza espermática en las muestras recién colectadas y refrigeradas de los verracos fueron sometidas a 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 [31, 32]. Aquellos espermatozoides con dimensiones muy parecidas, fueron asignados a un mismo grupo o "cluster", mientras que espermatozoides que diferían entre ellos fueron asignados a un cluster diferente. Para observar la interacción existente entre las subpoblaciones espermáticas y tratamiento (fresco y refrigerado) sobre las dimensiones ya descritas se utilizó de nuevo el PROC GLM. Del mismo modo, para cualificar la relación existente entre el proceso de refrigeración y la frecuencia de distribución de los espermatozoides de cada subpoblación se analizaron los datos mediante la prueba Ji-cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio fueron utilizados verracos de buena calidad seminal, demostrado por el alto porcentaje de espermatozoides vivos (>90%) y de motilidad (>3) obtenidos presentes en los eyaculados muestreados, correspondiendo con la tasa de 80% de fertilidad de la granja. El porcentaje de espermatozoides anormales puede considerarse alto en función de lo recomendado comúnmente para verracos bajo condicio-

nes de clima templado, sin embargo, está dentro de los valores observados para verracos en condiciones tropicales [11].

Fueron evaluadas un total de 20 muestras (2 por verraco) las cuales se caracterizaron por obtener los mínimos requerimientos de calidad establecidos por la granja (PROPORCA) para poder ser utilizadas en el programa de inseminación artificial, esto es, una adecuada motilidad y concentración espermática (TABLA I). De estas muestras se obtuvieron un total de 20 extendidos para la evaluación de la morfología (vitalidad, espermatozoides anormales y acrosomas reaccionados). La misma cantidad de extendidos fueron utilizados para evaluar la morfometría espermática mediante el ASMA, donde se registraron 1037 espermatozoides (aproximadamente 200 espermatozoides por extendido) en los cuales se cuantificaron las mediciones de la cabeza espermática (TABLA I).

La incursión de los sistemas informáticos para el análisis de imágenes ha hecho que el estudio de la morfología espermática haya adquirido recientemente una creciente importancia dentro de la evaluación seminal con miras a dilucidar las características seminales más directamente relacionadas con la fertilidad [5, 13, 23]. En este sentido, se han publicado datos referentes a las dimensiones espermáticas en bovinos [35]. Desde un punto de vista general, la cabeza de un espermatozoide de cerdo "normal" mide 8 μm de largo y 5 μm de ancho [7], sin embargo, en la especie porcina existe poca información disponible sobre las características morfométricas del espermatozoide determinadas por ASMA y sobre los factores que pueden afectar cambios en esta variable.

Es posible sugerir, en base a estudios previos que las características morfométricas de los espermatozoides de verraco podrían estar relacionadas con la fertilidad del semen. 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, siendo estos espermatozoides significativamente menos largos pero más anchos que los verracos de menor fertilidad [20]. 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, para eyaculados de cerdos [29]; mientras que otros han encontrado una media de $8,56 \pm 1,12 \mu\text{m}$ y $4,62 \pm 0,95 \mu\text{m}$, para la longitud y anchura en espermatozoides de cerdos jóvenes y de fertilidad comprobada [39].

El efecto de la refrigeración a 16°C por 24 horas sobre las características seminales de los verracos se muestra en la TABLA II. De los 1037 espermatozoides evaluados, 624 correspondieron a las muestras provenientes de semen fresco y 413 de semen refrigerado. Puede observarse que el análisis detecta diferencias significativas ($P < 0,05$) para los valores de motilidad, vitalidad y acrosomas reaccionados a favor del semen refrigerado; sin embargo, desde el punto de vista técnico ambos resultados corresponde a valores de semen de gran calidad y las diferencias estadísticas indican que la refrigeración durante las primeras 24 horas no ejerce un efecto deletéreo sobre los parámetros de calidad del semen de verraco y que durante este tiempo ocurre un proceso de estabilización de los espermatozoides. Solo se observa un ligero efecto negativo sobre el aumento de las anomalías espermáticas.

El efecto de la refrigeración en el semen de verraco ha sido ampliamente discutido [22]. Diferencias en la composición bioquímica de la membrana plasmática y específicamente en el contenido relativo de fosfolípidos y colesterol están involucradas en la sensibilidad de los espermatozoides a los procesos de refrigeración y congelación seminal [29, 39]. Las características bioquímicas del diluyente poseen un rol importante en la viabilidad del semen expuesto a bajas temperaturas durante periodos de tiempo prolongados [1, 22, 33, 40]. Se cono-

TABLA I
CARACTERÍSTICAS GENERALES Y MORFOMÉTRICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO /
GENERAL AND MORPHOMETRICS CHARACTERISTICS ON SPERMATOOA OF BOAR.

Parámetro	Media	Desviación Estándar	IC inferior al 95%	IC superior al 95%
Conc. Espermática	68,43	17,24	67,38	69,48
Nº de dosis x eyaculado	16,98	4,40	16,71	17,25
Calidad de la Motilidad	3,40	0,19	3,39	3,41
Vitalidad (%)	93,25	10,04	92,64	93,86
Acrosomas Reaccionados (%)	3,12	3,17	2,93	3,32
Espermatozoides Anormales (%)	19,83	10,98	19,16	20,50
Longitud de la cabeza μm	8,81	0,48	8,84	8,78
Ancho de la cabeza μm	4,43	0,35	4,45	4,41
Área de la cabeza μm^2	33,48	3,26	33,68	33,28
Perímetro de la cabeza μm	29,54	1,98	29,66	29,42
Función Largo/Ancho	1,99	0,16	2,00	1,98

Conc. Espermática= Expresada en millones de espermatozoides por mL ($10^6/\text{mL}$). n=1037 espermatozoides. IC= Intervalo de Confianza.

ce que el diluyente comercial utilizado es capaz de garantizar una buena calidad seminal, excelente fertilidad y prolificidad en el semen almacenado bajo refrigeración hasta por cinco días, mientras que la fertilidad empieza a decrecer a partir del día siete [25, 26, 27]. En este estudio, la refrigeración a 16°C por 24 horas no afectó las características seminales de los eyaculados muestreados, más aún, el análisis estadístico favorece al semen refrigerado, sin embargo, esta situación podría ser debida a la variabilidad de las observaciones y a las técnicas de evaluación utilizadas, que están sujetas a error humano.

En cuanto al efecto de la refrigeración a 16°C por 24 horas sobre las características morfométricas (TABLA III), puede observarse igualmente, un ligero cambio en las dimensiones de los espermatozoides, observándose una disminución de la longitud (de 8,82 a 8,71 µm), así como el perímetro (de 30,08 a 29,05 µm), mientras que aumentaron los valores de anchura (4,36 a 4,45 µm) y área (de 33,13 a 33,14 µm) de la cabeza espermática, lo que indica que la refrigeración produce una modificación de la forma del espermatozoide, evidenciado adicionalmente por la variación en el perímetro. No existen reportes similares de cambios en las características morfométricas producto de la refrigeración por cortos períodos de tiempo.

Utilizando las variables de longitud, anchura, área y perímetro se realizó el análisis de agrupamiento con el procedimiento FASTCLUS del SAS® que resultó en la identificación de tres subpoblaciones espermáticas presentes en el semen

de los verracos (TABLA IV). Puede observarse que el mayor número de espermatozoides conforman la subpoblación número 2, que corresponden a los espermatozoides medianos, seguidos de la subpoblación 1 (espermatozoides grandes) y 3 (espermatozoides pequeños).

La metodología para establecer subpoblaciones espermáticas ha sido reportada previamente [30, 31, 32] y se basa en el establecimiento de rangos, denominados grupos o clusters, en función de las distancias de puntos medios calculados en función de variables cuantitativas. Este procedimiento ha sido utilizado para evidenciar subpoblaciones espermáticas en función de características de motilidad [31, 32] y de morfometría [35]. Utilizando este procedimiento se logró establecer la presencia de tres subpoblaciones coexistiendo en el semen de verracos muestreados, donde el 28,45% de los espermatozoides están incluidos en la subpoblación 1 (espermatozoides grandes); la subpoblación 2 contiene el 51,20% (espermatozoides medianos) y la subpoblación 3 representa el 20,35% de los espermatozoides (espermatozoides pequeños). El origen de estas subpoblaciones no está claro, sin embargo, es probable que esta variabilidad sea producto del proceso de espermatogénesis, donde el genotipo del cerdo determinará diferentes grados de maduración de cada espermatozoide dentro del epidídimo, lo que puede reflejarse en variaciones sutiles en la morfología de la célula espermática [29, 39].

El procedimiento de clusters tiene la desventaja de que el operador fija el número de subpoblaciones *a priori*, y es así

TABLA II
CARACTERÍSTICAS SEMINALES EVALUADAS EN MUESTRAS DE SEMEN FRESCO (0 HORAS) Y DESPUÉS DE CONSERVADO EN REFRIGERACIÓN A 16°C POR 24 HORAS / SPERM CHARACTERISTICS EVALUATED IN FRESH SPERM SAMPLES (0 HOURS) AND AFTER COOLING AT 16°C FOR 24 HOURS.

Parámetro	0 Horas		24 Horas		Pr>F
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	
Calidad de la Motilidad	3,40	0,008	3,37	0,009	0,0170
Vitalidad (%)	91,61	0,421	94,97	0,486	<0,0001
Acrosomas Reaccionados	3,80	0,128	1,95	0,148	<0,0001
Espermatozoides Anormales (%)	19,26	0,467	21,70	0,540	<0,0005

TABLA III
PARAMETROS MORFOMÉTRICOS ESPERMÁTICOS EVALUADOS EN MUESTRAS DE SEMEN FRESCO (0 HORAS) Y DESPUÉS DE CONSERVADO EN REFRIGERACIÓN A 16°C POR 24 HORAS / SPERM MORPHOMETRICS PARAMETERS EVALUATED IN FRESH SPERM SAMPLES (0 HOURS) AND AFTER COOLING AT 16°C FOR 24 HOURS.

Parámetro	0 Horas		24 Horas		Pr>F
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	
Longitud µm	8,82	0,016	8,71	0,019	<0,0001
Ancho µm	4,36	0,010	4,45	0,012	<0,0001
Área µm ²	33,13	0,066	33,14	0,076	0,8730
Perímetro µm	30,08	0,080	29,05	0,093	<0,0001
Función Largo/Ancho	2,030	0,006	1,97	0,007	<0,0001

TABLA IV
SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS (SP) ESTABLECIDAS MORFOMÉTRICAMENTE EN SEMEN DE VERRACO/
MORPHOMETRIC SPERM SUBPOPULATIONS IN BOAR SPERM.

SP	N	%	Longitud ¹	Ancho ²	Area ³	Perímetro ⁴	L/A ⁵
1	295	28,45	9,20±0,414	4,75±0,298	37,27±1,89	30,16±1,99	1,94±0,161
2	531	51,20	8,76±0,376	4,41±0,230	33,18±1,20	29,17±1,81	1,99±0,152
3	211	20,35	8,37±0,397	4,03±0,247	28,95±1,71	29,59±2,16	2,08±0,166

¹ Longitud de la cabeza espermática en μm ($\mu \pm$ desviación estándar). ² Ancho de la cabeza espermática en μm ($\mu \pm$ desviación estándar). ³ Área de la cabeza espermática en μm^2 ($\mu \pm$ desviación estándar). ⁴ Perímetro de la cabeza espermática en μm ($\mu \pm$ desviación estándar). ⁵ Función largo/ancho ($\mu \pm$ desviación estándar).

TABLA V
EFFECTO DE LA REFRIGERACIÓN A 16°C POR 24 HORAS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS
SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN SEMEN DE VERRACO / EFFECT OF COOLING AT 16°C FOR 24 HOURS
ON PORCENTUAL DISTRIBUTION OF SUBPOPULATIONS IN BOAR SPERM.

Subpoblación	0 Horas		24 Horas		Pr>F
	%	N	%	N	
1. Grandes	28,37	177	28,57	118	<0,01
2. Medianos	55,37	348	44,31	183	<0,01
3. Pequeños	15,87	99	27,12	112	<0,01

como Peña y col. [29], establecieron cuatro subpoblaciones en base a la morfometría espermática en semen porcino, mientras que Thurston y col. [39] establecieron 3 subpoblaciones en el semen de esta especie.

Cuando se evalúa el efecto de la refrigeración sobre la distribución de los espermatozoides en las subpoblaciones (TABLA V), se puede evidenciar que ocurre una migración desde la subpoblación 2 (medianos) hacia la subpoblación 3 (pequeños), y que la subpoblación 1 (grandes) permanece prácticamente invariable.

La refrigeración afecta significativamente la distribución de los espermatozoides dentro de las subpoblaciones espermáticas, existiendo una variación de aproximadamente el 11% de la subpoblación 2 en función del aumento de la subpoblación 3, es decir, el proceso de refrigeración ocasiona disminución de tamaño de una fracción importante de la población espermática. No existen reportes similares de cambios en las subpoblaciones espermáticas establecidas morfométricamente producto de la refrigeración por cortos períodos de tiempo.

CONCLUSIONES

La morfometría espermática determinada mediante el análisis automatizado de la morfología espermática (ASMA), en conjunción con las pruebas rutinarias de evaluación seminal, es capaz de detectar cambios sutiles en los espermatozoides de verraco producto de los procedimientos de preparación y almacenamiento para la inseminación artificial, tanto en la morfometría individual como en la distribución de los espermatozoides dentro de subpoblaciones espermáticas.

AGRADECIMIENTO

A la empresa privada PROPORCA por el apoyo en el desarrollo de las actividades de investigación y en especial, al mantenido patrocinio económico del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia necesario para que las investigaciones del proyecto N°: CC-0003-06 llegaran a feliz término.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALTHOUSE, G.C. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. **Compend Cont Educ Pract Vet** 19:777-782. 1997.
- [2] ARRUDA, R.; BALL, B.; GRAVANCE, C.; GARCIA, A.; LIU, K.M. Effects of extenders and cryopreservants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenol** 58:253-256. 2002.
- [3] BAMBA, K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. **Theriogenol** 29:1245-1251. 1988.
- [4] BOYLE, C.A.; KHOURY, M.J.; KATZ, D.F.; ANNEST, J.L.; KRESNOW, M.J.; DESTEFANO, F.; SCHRADER, S.M. The relation of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility. **Epidemiol.** 3:239-246. 1992.
- [5] BUENDÍA, P.; SOLER, C.; PAOLICCHI, F.; GAGO, G.; URQUIETA, B.; PÉREZ-SÁNCHEZ, G.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Morphometric characterization and clas-

- sification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer computer assisted system. **Theriogenol** 57: 1207-1218. 2002.
- [6] CASEY, P.J.; GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O.; CHABOT, D.D.; LIU, I.K. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenol**. 47:575-582. 1997.
- [7] CUMMINS, J.M.; WOODALL, P.F. On mammalian sperm dimensions. **J. Reprod. Fertil.** 75:153-175. 1985.
- [8] ESTESO, M.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.; GARDE, J.J. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. **CryoLett.** 24: 261-268. 2003.
- [9] ESTESO, M.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.; MONTERO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; GARDE, J.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. **Reprod. Dom. Anim.** 41: 241-246. 2006.
- [10] EWEL, J.; MADRIZ, A.; TOSI, A. Zonas de vida de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría/ Dirección de Investigación. 2da Ed. Editorial Sucre, Caracas, Venezuela. 264 pp. 1968.
- [11] FUENTES, A. Importancia de la Inseminación Artificial. En: Fuentes, A. **Inseminación Artificial Porcina en Venezuela**. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay (Venezuela). CENIAP- Serie C. 47 pp. 2000.
- [12] GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenol** 63:431-444. 2005
- [13] GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. **J. Androl.** 16:88-93. 1995.
- [14] GRAVANCE, C.G.; LEWIS, K.M.; CASEY, P.J. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. **Theriogenol**. 44: 989-1002. 1995.
- [15] GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.; DAVIS, R.O.; HUGHES, J.P.; CASEY, P.J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 108:41-46. 1996a.
- [16] GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. **Theriogenol**. 46:1205-1215. 1996b.
- [17] GRAVANCE, C.G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K.R.; CHAMPION, Z.J.; CASEY, P.J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. **Anim Reprod Sci** 49: 37-43. 1997.
- [18] GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D.L.; CASEY, P.J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **J. Androl.** 19:704-709. 1998.
- [19] HIDALGO, M.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Vet. Med -Czech.** 50: 24-32. 2005.
- [20] 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.
- [21] JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. The relationship between sperm morphologic classification and fertility in the stallion. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 197:389-394. 1990.
- [22] JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Anim. Reprod. Sci.** 62:143-172. 2000.
- [23] KATZ, D.F.D.; OVERSTREET, J.W.; SAMUELS, S.J.; NISWANDER, NP.F.W.; BLOOM, MT.MD.; LEWIS, E.L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility **J. Androl.** 7:203-210. 1986.
- [24] KING, G.J.; MCPHERSON, J.W. A comparison of two methods for boar semen collection. **J. Anim. Sci.** 36:563-565. 1973.
- [25] KORNIWICZ, D.; SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B.; SMORAG, Z. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. **Reprod. Domest. Anim.** 31:273-274. 1996.
- [26] LYCZYNSKI, A.; KOLAT, K. Boar semen preservation in MR-A diluent. **Reprod. Dom. Anim.** 31:271-272. 1996.
- [27] MARTÍNEZ, E.; RUIZ, S.; SEBASTIÁN, J.; SÁNCHEZ, R.; GARCÍA, C.; MARTÍN, S. Factores que afectan a la inseminación artificial porcina. **An. Vet. Murcia.** 2:115-120. 1986.
- [28] MARTÍN-RILLO, S.; MARTÍNEZ, E.; GARCÍA-ARTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practice. **Reprod. Dom. Anim.** 35:519-526. 1996.
- [29] 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.
- [30] QUINTERO-MORENO, A. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 164 pp. 2003.

- [31] QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenol.** 59:1973-1990. 2003.
- [32] 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.
- [33] REED, H.C. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. **Reprod. Dom. Anim.** Suppl 1:255-270. 1990.
- [34] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. **Reprod. Domest. Anim.** 38:312-318. 2003.
- [35] RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reprod. Domest. Anim.** 42:354-357. 2007.
- [36] SCHRADER, S.M.; RATDIFFE, J.M.; TURNER, T.W.; HORNUNG, R.W. The use of new field methods of semen analysis in the study of occupational hazards to reproduction: The example of ethylene dibromide. **J. Occup. Med.** 29:963-966. 1987.
- [37] SCHRADER, S.M.; TURNER, T.W.; SIMON, S.D. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers: sperm head morphometry. **J. Androl.** 11:32-39. 1990.
- [38] THOMPSON, L.A.; BROOK, P.F.; WARREN, M.; BARRATT, C.; COOKE, I. A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zone-bound and unbound sperm. **J. Androl.** 15:337-342. 1994.
- [39] 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.
- [40] WEITZE, K.F. Long-term storage of extended boar semen. **Reprod. Dom. Anim.** Suppl 1:231-253. 1999.