

# EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA Y MOVILIDAD ESPERMÁTICA DE VERRACOS EN CONDICIONES TROPICALES.

## ASSESSMENT OF BOAR SPERM KINETICS AND MOTILITY IN TROPICAL CONDITIONS

Valverde A.<sup>1\*</sup>, Madrigal-Valverde M.<sup>1,2</sup>, Zambrana-Jiménez A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Campus San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Apdo. Postal. 223-21001 Alajuela, Costa Rica. \*anvalverde@tec.ac.cr

<sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, CEP: 40100-110, Salvador, Bahia, Brasil.

**Keywords:** Reproduction; Semen; Boar; Spermatozoa.

**Palabras clave:** Reproducción; Semen; Verraco; Espermatozoide.

### ABSTRACT

Sperm motility is linked to the energy level of the reproductive cell. The aim was to determine the influence of breed on reproductive variables of semen quality, kinetics and motility. Data were collected from 524 ejaculates of from 72 boars with mean age of  $26.8 \pm 14.4$  months during the years 2015 and 2016. Four breeds were used: Duroc (D), Yorkshire (Y), Landrace (L) and Pietrain (P). There was an effect ( $P < 0.05$ ) of the breed on total and progressive motility, ejaculate volume (vol) and total sperm cells. The effect of the breed was significant ( $P < 0.05$ ) on the spermatocinetic variables except for amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ). We identified four sperm subpopulations (SP<sub>n</sub>) ( $P < 0.05$ ), SP<sub>1</sub> (28.60%) characterized by low speed and non-progressive movement, SP<sub>2</sub> (20.54%) with movement very active and progressive, SP<sub>3</sub> (16.12%) with moderate speeds and non-progressive trajectories, SP<sub>4</sub> (34.74%) with active movement and higher progressiveness. The spermatocinetic subpopulations disagree with generalized idea of the ejaculate as a unit and allowed to determine sperm groups by movement patterns and progressivity.

### RESUMEN

La movilidad espermática se relaciona con el nivel de energía de la célula reproductiva. El objetivo fue determinar la influencia de la composición racial sobre variables reproductivas de calidad, cinética y movilidad del semen. Se recolectaron 524 eyaculados de 72 verracos con una edad media de  $26,8 \pm 14,4$  meses durante los años 2015-2016. Se identificaron cuatro grupos raciales: Duroc (D), Yorkshire (Y), Landrace (L) y Pietrain (P). Hubo un efecto ( $P < 0,05$ ) del grupo racial sobre la motilidad total y progresiva, el volumen (vol) eyaculado y el número total de espermatozoides. El efecto del grupo racial fue significativo ( $P < 0,05$ ) sobre las variables de cinética espermática excepto para la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m}$ ). Se identificaron cuatro subpoblaciones (SP<sub>n</sub>) espermáticas ( $P < 0,05$ ), la SP<sub>1</sub> (28,60%) caracterizada por una baja velocidad y de movimiento no progresivo, SP<sub>2</sub> (20,54%) con movimiento muy activo y progresivo, SP<sub>3</sub> (16,12%) con velocidades moderadas y trayectorias no progresivas, SP<sub>4</sub> (34,74%) con movimiento activo y de alta progresividad. Las subpoblaciones espermáticas prescinden de la idea generalizada del eyaculado como una unidad y permiten determinar conjuntos celulares afines por patrones de movimiento y progresividad.

### INTRODUCCIÓN

La calidad seminal constituye una forma de seleccionar e identificar los verracos (Okere *et al.*, 2005). Sin embargo, la selección de estos animales se realiza con una importancia relativa superior para caracteres de crecimiento y calidad de canal, que para caracteres como la calidad del semen

(Robinson & Buhr 2005). Esto implica que el mérito genético de los verracos en relación con sus características reproductivas no es conocido. El estudio del efecto de la raza sobre la cinética y movilidad del semen, así como características individuales de los verracos, podría contribuir a mejorar la eficiencia reproductiva en la industria porcina. En la comercialización de dosis seminales, la cantidad y la calidad del semen afectan al número de dosis que se pueden producir por eyaculado (Flowers, 1997). En la década de los 80 años del siglo pasado, se desarrolló la tecnología del Análisis de Semen Asistido por Computadora (*Computer assisted semen analysis*, CASA) para mejorar la exactitud y precisión del análisis seminal (Bompart *et al.*, 2018; Gil *et al.*, 2009; Tardif *et al.*, 1999). Las características seminales como volumen, concentración y movilidad presentan variabilidad entre y dentro de razas. La variabilidad seminal está en función de factores exógenos y endógenos (Ciereszko *et al.*, 2000) y debe ser caracterizada para evaluar la calidad espermática (Smital 2009). La calidad seminal se estima por medio del análisis de semen y permite predecir la fertilidad potencial de un verraco reproductor. Un análisis genérico se basa en la estimación de la concentración espermática y la calidad del movimiento con parámetros cinéticos. Algunos autores han reportado que las características seminales no se correlacionan con la fertilidad de los verracos (Tsakmakidis *et al.*, 2010) mientras que otros indican que la calidad del semen se relaciona con la preñez (López Rodríguez *et al.*, 2013). El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de la composición racial sobre variables de calidad espermática, cinética y movilidad del semen en verracos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron 524 eyaculados de 72 verracos con una edad media de  $26,8 \pm 14,4$  meses durante 2015-2016. Los animales se encontraban entrenados para extracción seminal y se identificaron cuatro grupos raciales: Duroc (D), Yorkshire (Y), Landrace (L) y Pietrain (P). En todos los casos, se tomaron al menos dos eyaculados de cada animal. Los animales se mantuvieron en compartimentos separados (tamaño 12 m<sup>2</sup>). Los animales se alimentaron una vez al día, antes del momento de la recolección del semen, con 2,5 kg de un concentrado comercial para verracos. Se proporcionó agua *ad libitum*, mediante dispensadores automáticos. Se recolectaron muestras de semen fresco diluidas 1:1 (vol:vol), en un diluyente estándar comercial (BTS, Minitüb, Alemania) para preservación de semen porcino por periodo corto (tres días). Antes de cada eyaculación, se estimuló a los verracos, llevándolos a un corral de extracción separado que contenía el potro de extracción y se obtuvo el semen mediante manipulación manual del pene después de que el verraco montara sobre el potro. Las tres últimas fracciones de semen de cada eyaculado se recogieron en recipientes graduados de colección de semen y se filtraron a través de tres capas de gasa esterilizada para separar las secreciones de glándula bulbouretral de los otros constituyentes del semen. Después de cada recolección de semen, se realizó una evaluación macroscópica. Después de esta evaluación, que duró varios segundos, se colocó la fracción filtrada en un baño maría a 37 °C, donde las muestras permanecieron durante el período de envasado y determinación de la concentración. La concentración espermática se determinó con un espectrofotómetro. El número total de espermatozoides por eyaculado por verraco se calculó multiplicando la concentración de espermatozoides por volumen del eyaculado. Las muestras se almacenaron en un frigorífico climatizado a 17 °C, durante 24h previo a su análisis. La movilidad de las células y las características cinéticas de los espermatozoides se evaluaron con un sistema CASA (sistema integrado de análisis de semen o “Computer-assisted semen analysis”) ISASv1<sup>®</sup> (Proiser, Valencia, España), junto con un microscopio de contraste de fase (UB203i) con un objetivo de contraste de fase negativo 10x y una placa calefactada a 37 °C. Los archivos de video se grabaron y analizaron a veinticinco imágenes por segundo (fps “frame per second”) durante dos segundos. La motilidad de los espermatozoides se determinó agregando una alícuota de 2,7 μL del eyaculado; previa agitación del tubo Eppendorf; en una cámara de recuento comercial ISAS-D4C20 de 20 μm de profundidad. Cada muestra se analizó por duplicado y se tomaron como mínimo siete campos. Se consideró para

este estudio el área de la cabeza de los espermatozoides (área;  $\mu\text{m}^2$ ) y varios parámetros de movilidad que se describen a continuación según clasificaciones propuestas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). La motilidad total se definió como el porcentaje de células móviles que presentaron una velocidad curvilínea (VCL)  $> 10 \mu\text{m/s}$  dentro de la muestra. La motilidad progresiva indicó las células que presentaban un movimiento hacia adelante en línea recta. La velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ) se definió como la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de la trayectoria curvilínea real. La velocidad rectilínea (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ) se fijó como la velocidad de la cabeza de espermatozoide a lo largo de la línea recta entre la primera y la última posición detectada. La velocidad de la trayectoria promedio (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ) se calculó como una interpolación entre los puntos correspondientes a la trayectoria de la VCL. El índice de rectitud (STR; %) se definió como la linealidad de la distancia de trayectoria promedio,  $VSL / VAP$ , y la linealidad (LIN; %) fue la relación entre la distancia en línea recta y la distancia de la trayectoria real ( $VSL / VCL$ ). Otros parámetros cinéticos que se consideraron para caracterizar la calidad del movimiento espermático fueron el índice de oscilación ( $WOB = VAP/VCL$ ; %), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH;  $\mu\text{m}$ ), expresado como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea, y la frecuencia de batido (BCF; Hz), expresada como el número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la lineal. La configuración del software se ajustó al análisis de espermatozoides de verraco: de 10 a  $80 \mu\text{m}^2$ , para el área de la cabeza, y 11 para conectividad. El movimiento progresivo se definió como el porcentaje de espermatozoides que presentaron movimiento con un índice de rectitud (STR)  $\geq 75\%$  dentro de la muestra. Los espermatozoides estáticos correspondieron a aquellas células que presentaron una velocidad curvilínea (VCL)  $< 10 \mu\text{m/s}$ . Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, usando Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente, a los datos obtenidos del análisis de todos los parámetros espermáticos. Al intentar ajustar al modelo de la distribución normal, algunas variables se transformaron usando la función arcoseno de la raíz cuadrada ( $\arcsin \sqrt{x}$ ) antes de ejecutar el ANOVA de medidas repetidas. Cuando se comprobaron las hipótesis de la distribución normal y la homogeneidad de varianzas, se realizó un ANOVA de medidas repetidas. Los modelos lineales generales y mixtos se utilizaron para analizar las variables de cinética y movilidad del semen de verracos de diferentes grupos raciales. Se realizaron pruebas de comparación múltiple por el método de mínimos cuadrados, y se utilizó la corrección de Bonferroni, con un nivel de significación estadística de 0,05. Se realizó análisis multivariante con el propósito de identificar subpoblaciones de espermatozoides del conjunto completo de datos de movilidad. El primer paso fue realizar un análisis de componentes principales (PCA). Para seleccionar el número de componentes principales a utilizar en el próximo paso del análisis, se siguió el criterio de seleccionar solo aquellos con un valor propio (varianza extraída para ese componente principal particular)  $> 1$  (criterio de Kaiser). Además, se comprobó la factibilidad del análisis factorial (AF), mediante la prueba de esfericidad de Bartlett para contrastar la hipótesis nula de que, la matriz de correlaciones es una matriz identidad y el índice KMO (Kaiser-Meyer-Olkin), que determina el cálculo de las correlaciones entre dos variables una vez eliminada la influencia que las restantes variables ejercen sobre ellas y que, indica la conveniencia de realizar el AF. El segundo paso fue realizar un procedimiento de clúster de dos pasos con los índices derivados obtenidos después del PCA con los datos seminales. Todas las mediciones de los espermatozoides dentro de cada granja, raza, animal y eyaculado se agruparon mediante parámetros de forma y tamaño, mediante un procedimiento de agrupamiento no jerárquico (modelo k-medias y distancia euclídea). Esto clasifica los espermatozoides del conjunto de datos en un pequeño número de subpoblaciones de acuerdo con la velocidad, linealidad y progresividad de las células. Este análisis permitió la identificación de subpoblaciones de espermatozoides y la detección de valores atípicos. Los análisis estadísticos se realizaron usando IBM SPSS, versión 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de semen por sistemas CASA es una herramienta para optimizar la producción de dosis seminales en centros de inseminación artificial o empresas dedicadas a la venta de germoplasma (Broekhuijse *et al.*, 2012). El efecto del grupo racial fue significativo ( $P < 0,05$ ) para las variables de movilidad excepto para la concentración de espermatozoides. En trabajos previos se ha descrito que el efecto racial puede influir en la calidad seminal (Kawęcka *et al.*, 2008; Kondracki *et al.*, 2012). El volumen de eyaculado fue diferente entre todos los grupos raciales y la motilidad total fue estadísticamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre los grupos raciales Landrace y Duroc. Los volúmenes de eyaculado encontrados en el presente trabajo fueron similares a los descritos por Wolf & Smital (2009) pero mayores que los volúmenes de eyaculado encontrados por (Savić *et al.* (2013). El volumen de eyaculado podría inferir en la calidad del semen ya que mayores volúmenes podrían incrementar la cantidad de espermatozoides no funcionales (Martinez-Alborcia *et al.*, 2012). Los grupos raciales difirieron en el número total de espermatozoides coincidiendo con lo reportado por (Tăpăloagă *et al.* (2013); Wolf & Smital (2009). Los verracos de la raza Duroc presentaron un menor número total de espermatozoides con respecto a los demás grupos raciales mientras que, los verracos de la raza Yorkshire presentaron mayor número total de espermatozoides (Tabla I).

**Tabla I.** Parámetros reproductivos de calidad seminal en verracos de diferentes grupos raciales. (*Reproductive parameters of boar sperm quality of different breeds*).

Parámetro reproductivo	Grupo racial*			
	D	Y	L	P
Concentración ( $\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ )	0.33 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01
Volumen eyaculado (mL)	188.29 $\pm$ 7.52 <sup>a</sup>	316.47 $\pm$ 13.22 <sup>b</sup>	252.82 $\pm$ 13.38 <sup>c</sup>	239.54 $\pm$ 7.55 <sup>d</sup>
Número total Espz ( $\times 10^9$ )	64.11 $\pm$ 3.75 <sup>a</sup>	110.51 $\pm$ 6.58 <sup>b</sup>	88.18 $\pm$ 6.66 <sup>c</sup>	81.70 $\pm$ 3.76 <sup>d</sup>
Motilidad total (%)	76.46 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	74.93 $\pm$ 1.76 <sup>ab</sup>	70.83 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	75.08 $\pm$ 1.12 <sup>ab</sup>
Motilidad progresiva (%)	57.47 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	54.07 $\pm$ 2.18 <sup>b</sup>	52.00 $\pm$ 1.98 <sup>b</sup>	56.74 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>

\* D: Duroc, Y: Yorkshire, L: Landrace, P: Pietrain. Espz: espermatozoides; VCL: velocidad curvilínea,  $\mu\text{m/s}$ ; VSL: velocidad rectilínea,  $\mu\text{m/s}$ ; VAP: velocidad media,  $\mu\text{m/s}$ ; LIN: índice de linealidad, %; STR: índice de rectitud, %; WOB: índice de oscilación, %; ALH: desplazamiento lateral de la cabeza,  $\mu\text{m}$ ; BCF: frecuencia de entrecruzamiento, Hz. EE: error estándar. <sup>a,b,c,d</sup> Dentro de fila, valores con diferente superíndice presentan diferencias significativas  $P < 0,05$ .

Los valores bajos en el total de espermatozoides por eyaculado en la raza Duroc coinciden con los reportados por (Kawęcka *et al.* (2008) en verracos de la misma raza. La actividad espermatogénica se correlaciona positivamente con el número total de espermatozoides y por consiguiente con las dosis seminales producidas (Adamiak *et al.*, 2010; Knecht *et al.*, 2013). El efecto del grupo racial resultó significativo para las variables de cinética, excepto para ALH. Las diferencias entre razas en la calidad seminal se han demostrado en los estudios de (Smital 2009; Sonderman & Luebbe 2008). La VCL fue estadísticamente diferente entre grupos raciales excepto Duroc y Landrace. La VSL, VAP y STR mostrada por los verracos Pietrain fue diferente y mayor con respecto a los demás grupos raciales. La VSL es un parámetro importante en los centros de inseminación artificial para el procesado de las dosis seminales ya que en los trabajos de (Broekhuijse *et al.* (2012; Holt *et al.* (1997), este parámetro mostró una relación positiva con la fertilidad del verraco. Una mayor velocidad rectilínea podría permitir a los espermatozoides fertilizar mejor el ovocito (Liu *et al.*,

1991). Las razas que presentaron el mayor índice de linealidad (LIN) fueron Pietrain y York. Las razas Landrace y Duroc presentaron los valores más bajos de índice de oscilación (WOB), mientras que para la BCF sólo hubo diferencias entre las razas York y Pietrain (Tabla II).

**Tabla II.** Parámetros de cinética espermática (medias±EE) de verracos de diferentes grupos raciales. (*Kinematic sperm parameters in different boar breeds*).

Parámetro cinético	Grupo racial*			
	D	Y	L	P
VCL (µm/s)	58.06±0.69 <sup>b</sup>	53.33±1.81 <sup>a</sup>	56.92±1.31 <sup>b</sup>	59.02±0.84 <sup>c</sup>
VSL (µm/s)	27.88±0.41 <sup>a</sup>	26.95±1.10 <sup>a</sup>	27.04±0.80 <sup>a</sup>	30.79±0.51 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	36.52±0.44 <sup>a</sup>	35.52±1.15 <sup>a</sup>	35.65±0.83 <sup>a</sup>	39.29±0.53 <sup>b</sup>
LIN (%)	48.67±0.69 <sup>a</sup>	51.23±1.83 <sup>ab</sup>	48.51±1.32 <sup>a</sup>	52.79±0.85 <sup>b</sup>
STR (%)	75.80±0.58 <sup>a</sup>	75.65±1.53 <sup>a</sup>	75.24±1.11 <sup>a</sup>	78.21±0.71 <sup>b</sup>
WOB (%)	63.48±0.54 <sup>a</sup>	67.05±1.44 <sup>b</sup>	63.52±1.04 <sup>a</sup>	67.06±0.66 <sup>b</sup>
ALH (µm)	2.53±0.08	2.23±0.21	2.34±0.15	2.33±0.10
BCF (Hz)	7.71±0.05 <sup>ab</sup>	7.46±0.14 <sup>a</sup>	7.72±0.10 <sup>ab</sup>	7.89±0.06 <sup>b</sup>
Área (µm <sup>2</sup> )	25.20±0.16 <sup>a</sup>	25.85±0.45 <sup>ab</sup>	26.37±0.32 <sup>ab</sup>	25.73±0.21 <sup>b</sup>

\* D: Duroc, Y: Yorkshire, L: Landrace, P: Pietrain. VCL: velocidad curvilínea, µm/s; VSL: velocidad rectilínea, µm/s; VAP: velocidad media, µm/s; LIN: índice de linealidad, %; STR: índice de rectitud, %; WOB: índice de oscilación, %; ALH: desplazamiento lateral de la cabeza, µm; BCF: frecuencia de entrecruzamiento, Hz. EE: error estándar. <sup>a,b,c</sup> Dentro de fila, valores con diferente superíndice presentan diferencias significativas P < 0,05.

La BCF está asociada con el patrón de movilidad del flagelo y los entrecruzamientos de las trayectoria curvilínea y lineal (Sellés *et al.*, 2003), sin embargo, la estimación del parámetro se correlaciona con del número de imágenes por segundo que se pueden obtener según el sistema CASA. El análisis de componentes principales permitió extraer tres componentes según el criterio Kaiser >1 y en total explicaron un 92,35% de la varianza total. El primer componente se caracterizó por presentar células “lineales”, es decir, con índices de rectitud y linealidad. El segundo correspondió a células caracterizadas por su “velocidad” curvilínea y promedio. El tercer componente principal se asoció a oscilación y entrecruzamientos (Tabla III).

**Tabla III.** Vectores propios de componentes principales (CP) de parámetros de cinética espermática en verracos. (*Eigenvectors of principal components (PCs) for boar sperm kinetics parameters*).

	Vectores propios <sup>*/a</sup>		
	CP1	CP2	CP3
VCL		0.905	
VSL	0.721		
VAP		0.887	
LIN	0.986		
STR	0.878		
WOB	0.895	-0.480	
ALH		0.918	
BCF			0.923
Varianza explicada (%)	42.62	28.73	21.00

\* Se expresan las variables más importantes en cada CP. Sólo se presentan vectores propios > 0.4. <sup>a</sup> Matriz de componente rotado, método de rotación Varimax con normalización Kaiser. La rotación ha convergido en 5 iteraciones. VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad media; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de entrecruzamiento.

Las tres componentes principales se asociaron con la VSL, VAP y BCF respectivamente y presentaron un peso relativo superior a 0.7. En otros trabajos se ha asociado estas variables de cinética con la integridad de la membrana flagelar sugiriendo que células con buena integridad en sus membranas podrían promover un movimiento lineal rápido que favorecería la progresión del espermatozoide hasta el ovocito (Grieblová *et al.*, 2017). En el análisis de subpoblaciones por medio de “clusters” multivariante realizado sobre 26.050 espermatozoides se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento. La subpoblación 1: constituida por espermatozoides con una baja velocidad, con VCL = $53,57\pm 0,61$   $\mu\text{m/s}$ , VSL = $21,92\pm 0,36$   $\mu\text{m/s}$  y VAP = $30,38\pm 0,38$   $\mu\text{m/s}$ , y de trayectoria no progresiva (LIN = $41,38\pm 0,58\%$ ; STR = $71,96\pm 0,55\%$ ; ALH = $2,43\pm 0,023$   $\mu\text{m}$ ; y BCF = $7,05\pm 0,05$  Hz). Del total de los espermatozoides, el 28,60% fueron asignados a esta subpoblación. La subpoblación 2 estuvo representada por espermatozoides con un movimiento muy activo y progresivo, reflejado por valores altos de VCL ( $70,79\pm 0,72$   $\mu\text{m/s}$ ), ALH ( $2,74\pm 0,027$   $\mu\text{m}$ ) y STR ( $80,81\pm 0,65$  %). El 20,54 % del total de espermatozoides formó parte de esta subpoblación (Tabla IV).

**Tabla IV.** Medias ( $\pm$ EE) de parámetros de cinética espermática de diferentes subpoblaciones (SPs) de espermatozoides de verracos. (*Mean ( $\pm$ SE) of each kinetic kinematic parameter corresponding to different subpopulations (SPs) for boar sperm*).

Variable	SP1	SP2	SP3	SP4
n/%	7450/28.60	5351/20.54	4199/16.12	9050/34.74
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	$53.57\pm 0.61^a$	$70.79\pm 0.72^b$	$64.56\pm 0.81^c$	$50.71\pm 0.55^d$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	$21.92\pm 0.36^a$	$37.53\pm 0.43^b$	$25.45\pm 0.49^c$	$31.07\pm 0.33^d$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$30.38\pm 0.38^a$	$46.38\pm 0.44^b$	$38.67\pm 0.50^c$	$37.15\pm 0.34^c$
LIN (%)	$41.38\pm 0.58^a$	$53.47\pm 0.69^b$	$39.76\pm 0.78^a$	$61.54\pm 0.53^c$
STR (%)	$71.96\pm 0.55^a$	$80.81\pm 0.65^b$	$65.19\pm 0.74^c$	$83.61\pm 0.50^d$
WOB (%)	$57.29\pm 0.48^a$	$65.87\pm 0.57^b$	$60.30\pm 0.64^c$	$73.57\pm 0.44^d$
ALH ( $\mu\text{m}$ )	$2.43\pm 0.023^a$	$2.74\pm 0.027^b$	$2.47\pm 0.030^a$	$2.00\pm 0.021^c$
BCF (Hz)	$7.05\pm 0.050^a$	$8.20\pm 0.060^b$	$8.77\pm 0.057^c$	$7.61\pm 0.046^d$

VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad media; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de entrecruzamiento. EE: error estándar. <sup>a,b,c,d</sup> Dentro de fila, valores con diferente superíndice presentan diferencias significativas  $P < 0,05$ .

La subpoblación 3 presentó la menor cantidad de células con un 16,12 %. Las células de esta subpoblación mostraron una velocidad moderada, caracterizada principalmente por mostrar VSL = $25,45\pm 0,49$   $\mu\text{m/s}$  y trayectoria no progresiva (LIN = $39,76\pm 0,78\%$ ; STR = $65,19\pm 0,74\%$ ; WOB = $60,30\pm 0,64\%$ ). La subpoblación 4 estuvo representada por el 34,74% de la población total, incluyó aquellos espermatozoides con movimiento activo, pero de alta progresividad, indicado por los valores más elevados de LIN ( $61,54\pm 0,53$   $\mu\text{m/s}$ ) y STR ( $83,61\pm 0,50$   $\mu\text{m/s}$ ) (Tabla IV). En trabajos previos (Cremades *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2009; Estrada *et al.*, 2017) se han descrito resultados similares y sugieren que en la cinética de los espermatozoides de verraco se describen de tres a cuatro subpoblaciones definidas. En el trabajo de Ramón *et al.* (2013) se demostró que los machos que mostraban mayor capacidad fecundante presentaban espermatozoides con movimiento activo y lineal, coincidiendo con lo encontrado en el presente trabajo en la subpoblación 4 con un 34,74% del total de células. El estudio de las subpoblaciones espermáticas dentro del eyaculado es reciente y aún no se ha establecido una relación formal entre éstas y la fertilidad de los machos (Didion, 2008), por lo que es necesario continuar con el estudio de las subpoblaciones seminales y las características de fertilidad y eficiencia reproductiva.

## CONCLUSIONES

El volumen de eyaculado y el número total de espermatozoides presentaron variación en función del grupo racial. Los parámetros de movilidad total y progresiva presentaron diferencias entre los grupos raciales, pero no fueron concluyentes. Los parámetros cinéticos indicaron que los eyaculados de algunos grupos raciales tienden a presentar espermatozoides con una progresión lineal y mayores velocidades. Las subpoblaciones espermáticas se distribuyeron en función del movimiento y progresividad celular a la vez que confirman la idea de que el eyaculado no se puede considerar como una población y permiten abandonar el criterio de buscar el espermatozoide con mayor capacidad fecundante.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación para el Fomento y la Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria y el PITTA cerdos del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el apoyo recibido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamiak, A., Kondracki, S., & Wysokińska, A. (2010). Influence of season of the year on physical properties of ejaculates from Polish Large White and Polish Landrace boars. *Roczniki Naukowe Zootech.*, *37*, 159–167.
- Bompart, D., García-Molina, A., Valverde, A., Caldeira, C., Yániz, J., Núñez de Murga, M., & Soler, C. (2018). CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development*. *30*(6), 810-819. <https://doi.org/10.1071/rd17551>.
- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H., & Gadella, B. M. (2012). Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility1. *Journal of Animal Science*, *90*(3), 779–789. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>.
- Ciereszko, A., Ottobre, J. S., & Glogowski, J. (2000). Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science*, *64*(1–2), 89–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078969>.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vazquez, J. M., & Martínez, E. A. (2005). Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa. *Journal of Andrology*, *26*(5), 610–618. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05028>.
- Didion, B. A. (2008). Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology*, *70*(8), 1374–1376. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.014>
- Estrada, E., Rivera del Álamo, M. M., Rodríguez-Gil, J. E., & Yeste, M. (2017). The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, *78*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.002>
- Flores, E., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., & Rodríguez-Gil, J. E. (2009). The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*, *72*(6), 784–797. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.013>.
- Flowers, W. L. (1997). Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *52*, 67–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602720>.
- Gil, M. C., García-Herreros, M., Barón, F. J., Aparicio, I. M., Santos, A. J., & García-Marín, L. J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, *71*(2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.007>.
- Griablová, A., Pintus, E., & Ros-Santaella, J. L. (2017). Integrity of head and tail plasmalemma is associated with different kinetic variables in boar sperm. *Animal Reproduction Science*, *184*, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.07.020>.
- Holt, C., Holt, W. V., Moore, H., Reed, H., & Curnock, R. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, *18*,

312–323.

- Kawęcka, M., Pietruszka, A., Jacyno, E., Czarnecki, R., & Kamyczek, M. (2008). Quality of semen of young boars of the breeds Pietrain and Duroc and their reciprocal crosses. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, *51*(1), 42–54. Retrieved from <http://www.archanimbreed.com/pdf/2008/at08p042.pdf>.
- Knecht, D., Środoń, S., Szulc, K., & Duziński, K. (2013). The effect of photoperiod on selected parameters of boar semen. *Livestock Science*, *157*(1), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.06.027>.
- Kondracki, S., Iwanina, M., Wysokińska, A., & Huszno, M. (2012). Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. *Acta Veterinaria Brno*, *81*(2), 195–199. <https://doi.org/10.2754/avb201281020195>.
- Liu, D. Y., Clarke, G. N., & Baker, H. W. (1991). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *Journal of Andrology*, *12*(4), 231–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1917688>.
- López Rodríguez, A., Rijsselaere, T., Beek, J., Vyt, P., Van Soom, A., & Maes, D. (2013). Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *59*(1), 5–12. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.725120>.
- Martínez-Alborcia, M. J., Valverde, A., Parrilla, I., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., & Roca, J. (2012). Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from Boar Ejaculate. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>.
- Okere, C., Joseph, A., & Ezekwe, M. (2005). *Journal of animal and veterinary advances*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. Medwell Online. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012071422>.
- Ramón, M., Soler, A. J., Ortiz, J. A., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Roldan, E. R. S., & Garde, J. J. (2013). Sperm Population Structure and Male Fertility: An Intraspecific Study of Sperm Design and Velocity in Red Deer1. *Biology of Reproduction*, *89*(5), 110. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112110>.
- Robinson, J. A. B., & Buhr, M. M. (2005). Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology*, *63*(2), 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.040>.
- Savić, R., Petrović, M., Radojković, D., Radović, Č., & Parunović, N. (2013). The effect of breed, boar and season on some properties of sperm. *Biotechnol. Anim. Husb.*, *29*, 299–310.
- Sellés, E., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., & Ruiz, S. (2003). Analysis of *In vitro* Fertilizing Capacity to Evaluate the Freezing Procedures of Boar Semen and to Predict the Subsequent Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, *38*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00406.x>.
- Smital, J. (2009). Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*, *110*(3–4), 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.024>.
- Sonderman, J. P., & Luebke, J. J. (2008). Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology*, *70*(8), 1380–1383. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.009>.
- Tăpăloagă, P. R., Şonea, A., Iancu, A., & Mitrănescu, E. (2013). Researches regarding age, breed and collecting season influence in quality and quantity boars semen. *Sci. Pap. Ser. D. Anim. Sci.*, *56*, 161–165..
- Tardif, S., Laforest, J.-P., Cormier, N., & Bailey, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, *52*(3), 447–459. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00142-9).
- Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G., & Khalifa, T. A. (2010). Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *Journal of Veterinary Science*, *11*(2), 151–154. <https://doi.org/10.4142/JVS.2010.11.2.151>.
- Wolf, J., & Smital, J. (2009). Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J. Anim. Sci*, *87*, 1620–1627. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1373>.