

TESIS DOCTORAL

**Efecto del fotoperíodo sobre la calidad seminal de
verracos destinados a inseminación artificial**

M. Montserrat Rivera del Álamo

Juny 2003

AGRADECIMIENTOS

Hoy es una de esas noches en las que, como decían Celtas Cortos, el autobús del sueño no me viene a visitar. Tengo el cuerpo baldado, mi nariz parece un grifo y la cabeza está a punto de reventarme, pero soy incapaz de dormir. En este momento me pasan por la cabeza estos últimos días y casi no puedo creerme que por fin haya terminado. Ha sido un camino largo y, a veces, bastante duro, sobre todo al final. En estos momentos, miro hacia atrás, a todo lo que ha sido mi vida durante estos últimos años y lo que veo me hace reflexionar. No puedo evitar pensar en los momentos buenos y en los no tan buenos (no voy a decir malos) y en lo que han supuesto a cada paso del camino. Pienso en los momentos de alegría cuando encuentras algún resultado curioso. En los momentos de histerismo cuando la impresora se dedica a hacerte la vida imposible. En fin, tantas cosas que podría estar horas y horas.

Después de tanto tiempo, hoy he llegado a un punto y final en mi vida, pero también a un punto y seguido (o eso quiero pensar). He cerrado una puerta que llevaba abierta unos cuantos años, pero abro una nueva que no sé dónde me llevará. No tengo ni idea de qué me traerá el mañana, pero estoy deseando que llegue para averiguarlo. Es en este momento, al llegar al final del camino, cuando sientes la obligación moral de acordarte de todos aquéllos que, de un modo u otro, han estado contigo, dándote apoyo, consejo y, a veces, consuelo. Todas y cada una de esas personas han puesto su granito de arena para que una montaña inmensa de datos se haya convertido en algo con sentido “científico” (?????).

En primer lugar quiero dar las gracias a los “jefes”, Joan Enric y Teresa. Tengo que darles las gracias por infinidad de cosas, pero lo que quizás deba agradecerles primero es la santa paciencia que han tenido conmigo y con mi histerismo (ciertamente no soy nerviosa, sino histérica). He aprendido mucho con ellos, tanto a nivel laboral como a nivel personal. Han conseguido que llegara a culminar este trabajo incluso cuando a veces he tenido ganas de tirarlo todo por la borda, y todo ello con muchas dosis de buen humor (ha caído alguna que otra bronca, pero de aquéllas que no te

acuerdas al cabo de 10 minutos). He aprendido que un resultado negativo es siempre un resultado y que “lo que no puede ser no puede ser, y además es imposible”. De todo corazón, gracias por todo lo que me habéis dado.

Tampoco puedo olvidar a los demás compañeros del grupo “reproductor” (suena un poco raro, pero qué la vamos a hacer). Tengo que dar las gracias a muchos de ellos por infinidad de cosas. A Teresa Mogas, gracias por ser la primera en abrirme la puerta del mundo de la ciencia. A Jordi Miró, por los momentos ecográficos y de palpación rectal (de yeguas, por supuesto). A Armando por todas sus “cuestiones” estadísticas. A Joan, por las soluciones informáticas cuando la puñetera impresora se niega a obedecer, aún a riesgo de salir disparada por la ventana más próxima. A Xus, por darle al callo también en este estudio. Al resto de becarios de la unidad, Jose Luis, Fanny, Antonio, Claudia, Laura y Erika. Unos nos conocemos más y otros quizá menos, pero ahí estamos todos en el mismo barco.

Al tito Alex, por darme todo tipo de soluciones, la 14, la 15, la 16 y también las que van sin numerar, por esos ratos de cháchara (son pocos, eh!) y tus consejillos. Un besote Alex.

Quiero dar las gracias también a todos esos amigos que, sin ser gente de ciencia, han llenado mi vida con momentos imprescindibles para cualquier persona. A Eulàlia, por todos esos ratos que hemos pasado desde que empezamos en la facultad, los viajes, las fiestas, las borracheras (queda poco serio, pero no sería ético decir mentiras), las alegrías, las lágrimas, en fin, todo aquello que hemos compartido y lo que compartiremos. A Paula, por esas tazas de té eternas a medianoche y las conversaciones filosóficas para intentar arreglar el mundo. A Ana, por nuestros paseos en bici los domingos por la mañana con chafardeo incluido de todo lo que pasa en Lliçà y por soportar mis rollos sentimentales. También quiero acordarme de aquellos amigos de adolescencia, Rai, Ramón y Gus, con los que he compartido momentos inolvidables de juergas, confesiones, sentimientos y rascucias (estoy quedando fatal!!! No parezco nada seria). A todos vosotros, amigos, gracias por aguantar mis buenos y malos (esta vez sí) momentos y por seguir a mi lado a pesar de todo (al final me voy a emocionar, sniff, sniff). No puedo olvidarme de Anxo (Ángel según su DNI) por regalarme el cerdito.

Quiero dar las gracias también a mi “stand by” (hoy en día les llaman compañeros sentimentales), Joan Andreu, por estar ahí y aguantar el chaparrón de mi histerismo (insisto en que no soy nerviosa, sino totalmente histérica) cuando las cosas

no me salían bien, mis neuras hormonales y mi cabezonería (quizá debería añadir también mi tozudez y mi mala leche. Viene todo de familia).

En último lugar, pero no por ello menos importante (no soy muy creyente, pero alguien dijo que los últimos serán los primeros y así es para mí en este caso), quiero dar las gracias a mi familia. En primer lugar a mis padres, gracias por haberme hecho tal como soy, por vuestro apoyo siempre incondicional, por soportar mis desplantes y mis malas contestaciones cuando tenía un día asqueroso, por creer que podía conseguirlo y, sobretodo, gracias por sentiros tan orgullosos de mí. A mi hermana mediana, Isabel, por acordarte de mí aunque estés a más de 3.000 km de distancia y por darme consejo cuando lo he necesitado. Mirando lo que tú has conseguido me doy cuenta que después de una caída, siempre hay que levantarse porque si te quedas en el suelo te pierdes lo que está por llegar. A mi hermana pequeña, Esther, por aguantar, junto con mis padres, mis neuras de los últimos meses, sobretodo las del domingo por la tarde cuando la dichosa impresora sigue dando la murga y pienso en colgarme de la ducha con el maldito cartucho de tinta que decide acabarse en ese preciso instante. Para acabar quiero acordarme de mi tía Esperanza y mi tía Isabel. Gracias por sentiros tan orgullosas de mí (un día no cabrán por la puerta de anchas que se ponen).

¡¡Gracias a todos!!



DISCUSIÓN

Efecto de la luz natural sobre el semen fresco

La calidad seminal en el verraco puede verse afectada por numerosos factores. Uno de ellos es el fotoperíodo. Sin embargo, este efecto, como ya se ha indicado, no está claramente establecido. Diversos autores lo consideran uno de los factores con más capacidad para alterar la función reproductora del verraco (Mauget, 1982; Claus y Weiler, 1985a,b). Sin embargo, nuestros resultados indican lo contrario. Así, dentro del análisis seminal sólo se observaron diferencias significativas en el porcentaje de anomalías de cabeza en los meses de noviembre, diciembre y febrero. Estas variaciones podrían no deberse al fotoperíodo en sí, puesto que todos los porcentajes de anomalías morfológicas aumentan con el paso del tiempo. Si estos incrementos se debieran exclusivamente al efecto de la luz, los meses de febrero inicial y el de febrero final deberían presentar porcentajes similares de anomalías morfológicas, lo cual no ocurre. Por lo tanto, podemos asumir que en realidad los cambios que sufre la luz a lo largo de las estaciones no tienen ningún efecto apreciable sobre los porcentajes de viabilidad y de anomalías morfológicas.

Una posible causa para el aumento temporal en los porcentajes de las anomalías morfológicas podría ser el incremento de edad de los verracos. A este respecto, Bach *et al* (1982) mostraron que el porcentaje de anomalías aumenta gradualmente con la edad desde la pubertad en adelante, aunque, otros estudios afirman lo contrario (Greenberg y Mahone, 1981). Dado que en nuestro estudio la edad inicial de los verracos fue de 10-14 meses de edad, sería factible asumir que el aumento en los porcentajes de anomalías morfológicas es debido más a la edad que al efecto del fotoperíodo. Además, con el

tiempo, los animales se ven sometidos a más situaciones de estrés y problemas médicos que pueden afectar la calidad seminal.

En referencia a la motilidad, solamente se observaron diferencias significativas en el análisis de las subpoblaciones espermáticas. A este respecto, cabe indicar que nuestro estudio mostró la existencia de cuatro subpoblaciones espermáticas. La subpoblación uno se caracterizó por presentar un movimiento rápido y muy oscilante. La subpoblación dos se caracterizó por presentar un movimiento lento de baja oscilación. La subpoblación tres se caracterizó por presentar un movimiento lento y oscilante. Por último, la subpoblación cuatro se caracterizó por un movimiento muy rápido y muy oscilante. Estudios previos (Abaigar *et al.*, 1999) mostraron la existencia de tres, y no de cuatro, subpoblaciones espermáticas. Abaigar *et al* (1999) observaron que, en su caso, la subpoblación uno mostró un movimiento rápido con una elevada capacidad progresiva, la subpoblación dos mostró un movimiento también rápido pero de poca capacidad progresiva y finalmente, la subpoblación tres presentó un movimiento lento, correspondiendo, posiblemente, a células en estado de degeneración. Las razones de la diferencia entre nuestros resultados y los de Abaigar *et al* pueden ser varias: el número de machos utilizados, el número de espermatozoides analizados, el tipo de análisis estadístico, el sistema de análisis de motilidad, la toma de muestras, la raza de los verracos y el individuo. Así, el trabajo llevado a cabo por Abaigar *et al* utilizó un total de cuatro machos, pertenecientes tres de ellos a la raza Large White y uno a la raza Landrace. De cada uno de estos animales se realizó una única extracción seminal. El número total de espermatozoides analizados fue de 3.208. La motilidad se analizó con un Hobson Sperm Tracker utilizando una cámara Mackler. De todos los parámetros analizados por el software sólo se estudiaron la VCL, la VSL, la BCF y la ALH. El paquete estadístico utilizado fue el PATN. El análisis estadístico contempló, en primer lugar, una clasificación no jerárquica de los valores espermáticos mediante un algoritmo ALOC que asignó los espermatozoides en diferentes grupos según las magnitudes descritas. A continuación se realizó una combinación jerárquica conglomerativa secuencial que permitió reducir el número de grupos, en este caso subpoblaciones espermáticas. Por último, se realizó un análisis de coordenadas principales para reducir el número de variables. Una vez obtenidas las variables a estudiar, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y χ^2 para determinar las diferencias estadísticas.

En nuestro estudio, en cambio, se utilizaron un total de 30 verracos pertenecientes a tres híbridos comerciales distintos. De cada uno de los animales se obtuvieron 12 eyaculados, lo que hace un total de 360 eyaculados. El número total de espermatozoides analizados fue 51.886. La motilidad se analizó mediante un Sperm Class Analyzer con el tratamiento de las muestras descrito anteriormente en el apartado de Material y Métodos. Las variables analizadas fueron la VAP, el WOB, la ALHmed, la BCF, la HLO y la HBS. Las pruebas estadísticas realizadas fueron las mismas llevadas a cabo por Abaigar y colaboradores, con la diferencia que las variables fueron seleccionadas previamente a la determinación de las diferentes subpoblaciones espermáticas mediante un análisis jerárquico de conglomerados por correlaciones sucesivas.

Así, vemos que existen numerosos parámetros que difieren entre el trabajo de Abaigar *et al* y el nuestro. Gran parte de estos parámetros afectan directamente al propio análisis estadístico y, por tanto, a la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Éstos son el número de verracos utilizados, el número de espermatozoides analizados y el propio tipo de análisis estadístico. Por lo tanto, sería necesario estandarizar los parámetros que afectan al estudio estadístico de la motilidad. De este modo se conseguiría homogeneizar los resultados y permitiría la realización de estudios comparativos entre distintos grupos de investigación. En la actualidad esto es imposible de realizar debido a las distintas metodologías de análisis y da lugar a resultados tan diferentes como lo mostrado.

Respecto al factor raza, está claramente establecido que ésta afecta de forma directa las características reproductivas del verraco, tanto en la entrada en pubertad (Bazer *et al.*, 1988), como en las características del semen (Swierstra, 1973; Koh *et al.*, 1976; Conlon y Kennedy, 1978; Jonson *et al.*, 1980; Kennedy y Wilkins, 1984). Del mismo modo, también el efecto individuo aporta variaciones en las características seminales. Todo ello hace que las variaciones en la estructura de subpoblaciones puedan ser altas dependiendo de la raza y el individuo.

Otro factor probablemente de gran importancia es el manejo de las muestras de semen. Las muestras seminales del estudio realizado por Abaigar *et al* se analizaron después de 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente. El semen estaba diluido en Beltsville Thawing Solution (BTS). Este diluyente está compuesto por dextrosa, citrato sódico deshidrogenado, bicarbonato sódico, tetraacetato etilendiamino

disódico (EDTA) y cloruro potásico (Pursel y Johnson, 1975). Previamente al análisis, los espermatozoides se trataron mediante la técnica de lavado con Percoll descrita por Harrison *et al* (1993). Las muestras se incubaron a 39° C durante 10 minutos y a continuación se realizó la toma de imágenes. En nuestro estudio, tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, el semen se analizó el mismo día de la extracción. La temperatura de las muestras, una vez diluidas en SP, se mantuvo a 16° C y la incubación se realizó a 37° C durante 10 minutos. Así, observamos tres factores que pueden afectar las características del semen, como son el diluyente utilizado, el tiempo transcurrido desde la extracción hasta el análisis y la temperatura a la que se mantuvieron durante su conservación y a la que se realizó el análisis.

Dentro del análisis de las características de motilidad de las diferentes subpoblaciones espermáticas, sólo se observaron diferencias significativas importantes en los porcentajes de distribución de dichas subpoblaciones espermáticas. Las subpoblaciones espermáticas parecen tener su origen en las variaciones del desarrollo de los espermatozoides durante la espermatogénesis y espermiogénesis y al distinto estado de maduración y edad a la que entran en el epidídimo (Abaigar *et al*, 1999). También se ha observado que alteraciones en el semen pueden provocar que las subpoblaciones espermáticas actúen de diferente modo entre ellas (Holt, 1996). Por lo tanto, la razón de las variaciones en los porcentajes poblacionales podría basarse en actuaciones sobre cualquiera de estos puntos.

Bajo nuestro punto de vista, una de las explicaciones sería que los cambios de luz actuaran de algún modo a nivel de epidídimo. Es en esta estructura dónde los espermatozoides finalizan su maduración. Por lo tanto sería lógico pensar que los cambios observados en la motilidad puedan tener un origen epididimario y producirse durante el proceso de maduración. La función epididimaria está afectada por numerosos factores testiculares. Uno de los más importantes son los andrógenos (Danzo *et al.*, 1977; Fawcett y Joffer, 1979; Nicander *et al.*, 1983; Robaire y Viger, 1995). Así, estudios realizados con cultivos celulares de epitelio epididimario establecieron la necesidad de la presencia de testosterona y dihidrotestosterona en los medios de cultivo para mantener la función epitelial de los cultivos (Orgebin-Crist *et al.*, 1975; Vázquez *et al.*, 1986). Sin duda, existen otros factores que regulan la síntesis y secreción de las proteínas epididimarias, pero su efecto sobre el epidídimo es controvertido, ya que los estudios se han realizado siempre en células en cultivo, lo que altera las relaciones paracrinas entre epitelio, espermatozoides y conjuntivo que se establecen “*in vivo*”

(Brooks, 1979; Brooks, 1983; Sujarit *et al.*, 1990; Holland *et al.*, 1992; Lan *et al.*, 1998). A pesar de los numerosos estudios realizados, aún no está establecido a ciencia cierta si estas substancias influyen específicamente sobre el desarrollo de la motilidad espermática o simplemente benefician de algún modo la viabilidad espermática (Moore *et al.*, 1998).

Los andrógenos se sintetizan mayoritariamente en las células de Leydig, presentes en el tejido intersticial testicular. Parece lógico suponer que, puesto que la función epididimaria depende de estos andrógenos, la luz afecte indirectamente al epidídimo mediante una acción sobre las células de Leydig. Se ha de tener en cuenta a este respecto que la secreción de andrógenos por parte de las células de Leydig está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. El hipotálamo secreta hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que actúa sobre la adenohipófisis. Ésta, a su vez, libera LH que actúa sobre las células de Leydig, activando la síntesis y secreción de testosterona por parte de estas células. La LH se une específicamente a la membrana de las células de Leydig y activa el cAMP. Éste inicia la activación de proteinquinas que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares y la movilización de precursores de esteroides, principalmente la conversión de colesterol en pregnenolona. A partir de la pregnenolona se sintetizan el resto de esteroides implicados en la reproducción, incluyendo la testosterona (Stabenfeldt y Edqvist, 1984).

La testosterona producida por las células de Leydig es liberada en los túbulos seminíferos por difusión, simple o facilitada, y metabolizada en estrógenos y dihidrotestosterona. Los estrógenos son liberados al torrente sanguíneo, mientras que la dihidrotestosterona es liberada de nuevo a los túbulos seminíferos (Johnson y Everitt, 1984) Así, podríamos afirmar que cualquier situación que alterara alguna de las fases de dicho eje podría llegar a afectar la secreción de andrógenos y, con ello, el proceso de maduración de los espermatozoides.

De hecho, existe abundante bibliografía en diversas especies sobre el efecto de la luz en las células de Leydig. Así, en especies estacionales de día corto, como el jabalí, se ha observado que durante la época reproductiva la luz produce un incremento en la frecuencia de secreción de la GnRH. Este incremento de GnRH produce a su vez un incremento en la secreción de LH que, por lo tanto, originará una síntesis y secreción más elevada de testosterona. Durante la temporada no reproductiva, la producción de testosterona es inferior porque la frecuencia de secreción de LH es baja y las células de

Leydig no responden tanto a la acción de la LH. Además, se ha observado que la función epididimaria depende de la presencia de testosterona adluminal, puesto que la falta de esta hormona provoca una degeneración del epidídimo (Stabenfeldt y Edqvist, 1984). Por lo tanto, sería lógico que cambios en los niveles de andrógenos epididimarios se reflejaran de algún modo en la calidad espermática. De ser cierta esta hipótesis en el caso del verraco, tendríamos que asumir que los cambios en los niveles de testosterona en el epidídimo pueden ser los responsables de que los espermatozoides adquieran unas características de motilidad u otras.

Sin embargo, los andrógenos no son el único factor importante en la regulación epididimaria. Así, otra sustancia importante en esta regulación es la proteína de unión a andrógenos (androgen binding protein, ABP). Esta proteína es secretada por las células de Sertoli, siendo su síntesis y secreción reguladas por la acción de la FSH. La ABP se une a la testosterona y la transporta hasta el epidídimo, regulando así la función de la hormona (Stabenfeldt y Edqvist, 1984). No hemos encontrado en la bibliografía estudios que determinen si los cambios lumínicos afectan o no la producción de ABP, pero podría ser así. De esta manera los cambios observados podrían ser debidos a una modificación de la síntesis y/o secreción de la ABP o de su capacidad para ligar y transportar la testosterona hasta el epidídimo.

Sin embargo, los cambios en la motilidad espermática podrían deberse también a una acción de la luz sobre la espermatogénesis del verraco, de tal manera que el fotoperíodo podría inducir cambios estructurales sutiles que modificarán en última instancia la motilidad. Así, la luz induce la secreción de melatonina en la glándula pineal. Esta melatonina actúa, por un lado, sobre los melanóforos que son los encargados de la coloración de la piel y, por otro, sobre los melanocitos. Éstos a su vez regulan la secreción de la GnRH, lo que, como ya se ha indicado, afecta la secreción de testosterona en las células de Leydig. La testosterona es importante no sólo para la regulación de la función epididimaria y la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, si no también para el mantenimiento de la espermatogénesis, sobretodo en la fase de meiosis. Se ha observado que la FSH es necesaria para iniciar el proceso de espermatogénesis. Sin embargo, una vez que el proceso se pone en marcha al inicio de la pubertad, la secreción de FSH parece que no es tan esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis, sino que es la testosterona la que adquiere mayor importancia (Stabenfeldt y Edqvist, 1984). Así, una supresión de la secreción de testosterona inhibe la conversión de las espermátidas en estadio 7 a espermátidas en

estadío 8. Del mismo modo, cuando se restaura la secreción de testosterona, esta conversión vuelve a establecerse. Por otro lado, parece ser que la supresión de la testosterona provoca cambios en la adhesión de las espermátidas a las células de Sertoli, modificando así la espermiogénesis (Zirkin *et al.*, 1998). También se ha observado que una supresión en la secreción de testosterona provoca un incremento de la apoptosis celular durante la espermatogénesis de manera que se podría pensar que la testosterona actúa como factor de supervivencia, protegiendo a las células germinales de una muerte apoptótica. Por último, la importancia de la testosterona en la espermatogénesis queda patente en un estudio llevado a cabo por Zirkin y col. (1998) en ratas macho adultas. En este estudio se observó una correlación positiva entre el número de espermatozoides y la concentración de testosterona en el fluido de los túbulos seminíferos. Esta correlación positiva alcanzaba una meseta y se mantenía constante cuando la concentración de testosterona era igual o superior a 20 ng/mL.

Según se desprende de lo anterior, los cambios de luz producirían modificaciones en la espermatogénesis que se reflejarían en alguno de los parámetros seminales analizados. De ser cierta esta hipótesis, sería necesario asumir que los cambios en el nivel de testosterona intratesticular conferirán, al menos en parte, sus características mótils al espermatozoide. Partiendo de la base que las subpoblaciones espermáticas parecen originarse durante la espermatogénesis, la variabilidad en las subpoblaciones espermáticas reflejaría las diferencias funcionales y adaptativas del semen a las variaciones hormonales intra y extratesticulares (Abaigar *et al.*, 1999). Esta hipótesis parece estar sostenida por diversos estudios llevados a cabo en ratones, donde se ha observado un empeoramiento de la motilidad de algunos, aunque no todos, los espermatozoides debido a mutaciones específicas que los afectan de manera individual (Olds-Clarke y Wivell, 1992; Olds-Clarke y Segó, 1992). Así, podría ser que la melatonina produjera algún cambio sutil a nivel de la espermatogénesis, dando lugar a alteraciones en los porcentajes poblacionales.

Hasta este momento hemos asumido que los ligeros cambios observados en este estudio en el semen de verraco serían atribuibles a las variaciones producidas en la luz y, por consiguiente, a los cambios que ésta produce en la secreción de melatonina. Sin embargo, el efecto que tiene la luz sobre la secreción de melatonina no está bien establecido en el cerdo. En el caso de las especies estacionales con celo en día corto, como sería el caso del verraco, la melatonina parece estimular el eje hipotálamo-

hipófisis-gónadas, siendo su secreción más alta durante los períodos de oscuridad o escotofase (Karsh *et al.*, 1994; Aleandri *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos en diversos estudios realizados en el verraco difieren entre ellos. Así, algunos autores niegan la existencia de incrementos en la secreción de melatonina durante la escotofase tanto en fotoperíodos de día largo (McConell y Ellendorff, 1987; Minton *et al.*, 1989) como en aquéllos de día corto (Brandt *et al.*, 1985). Tampoco se han descrito cambios apreciables en la concentración de melatonina en la glándula pineal durante períodos de día largo o corto (Reiter *et al.*, 1987). De hecho, sólo se observaron incrementos de secreción nocturna en fotoperíodos ecuatoriales y únicamente en la mitad de los verracos estudiados (McConell y Ellendorff, 1987; Minton y Cash, 1990). Sin embargo, Andersson *et al.* (1998) observaron que cambios súbitos en el régimen de luz provocaban variaciones temporales en la actividad espermatogénica.

Quizás estas divergencias se deban al hecho de que la acción de la luz se deba no sólo al tiempo que actúa, sino también a su intensidad. En este sentido, un estudio llevado a cabo por Griffith y Minton (1992) mostró que los niveles séricos de melatonina en el verraco aumentaban durante la escotofase únicamente si durante la fotofase la intensidad lumínica era alta (1,783 lux en dicho estudio). En cambio, si la intensidad lumínica de la fotofase era baja (113 lux) no existían diferencias en la secreción de melatonina entre la fotofase y la escotofase. Otro estudio, en cambio, afirma que la intensidad lumínica durante la fotofase no hace variar en absoluto la secreción de melatonina durante la escotofase (Tast *et al.*, 2001). Del mismo modo, establece que la intensidad lumínica mínima para que el cerdo sea capaz de diferenciar entre día y noche es de 40 lx o menos y no de 113 lx como establecieron Griffith y Minton previamente. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias en la secreción de melatonina entre estaciones (Tast *et al.*, 2001). En resumen, parece ser que la intensidad lumínica de la fotofase ha de superar un umbral mínimo para activar el ritmo circadiano de la melatonina.

Estos estudios parecen indicar que quizás la melatonina no actuaría en realidad en el verraco como estimuladora/inhibidora del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, sino como reguladora de los cambios lumínicos. Esta hipótesis explicaría porqué no se observan cambios significativos en las características de calidad del semen. Los sucesivos cambios en la intensidad y en la duración de la luz natural, al ser graduales a lo largo del año, permitirían que las variaciones en la secreción de melatonina fueran también graduales y no se produjeran alteraciones en el semen. De ser cierta esta

hipótesis, podríamos asumir que el fotoperíodo natural no tiene un efecto destacable sobre las características del semen. Así, la pérdida de calidad en el semen después de los meses de verano observada en las explotaciones comerciales sería debida a otros factores, como las altas temperaturas ambientales combinadas con la excesiva humedad reinante en los recintos.

Un problema asociado a la apreciación de variaciones en la calidad seminal es el valor relativo de los parámetros de calidad seminal utilizados. Algunos autores coinciden en afirmar que no existe relación alguna entre los parámetros de calidad seminal y los de fertilidad (Hammerstedt, 1996; Johnson *et al.*, 2000; Gadea, *et al.*, 2001). En un estudio llevado a cabo por Gadea *et al.* (2001) se observó que los porcentajes de motilidad total y motilidad progresiva, estado del acrosoma e integridad de la membrana no presentaban correlación alguna con la fertilidad y el tamaño de la camada. Así, según estos resultados, el análisis seminal sería útil para detectar los eyaculados de baja calidad, pero no nos ofrecería información sobre su capacidad fertilizante. Otros autores, en cambio, aseguran que algunas pruebas funcionales permiten predecir determinados parámetros de fertilidad. En nuestro estudio se utilizaron dos de estas pruebas funcionales. Una de ellas fue el ritmo de producción de L-lactato. Estudios llevados a cabo por Rigau *et al.* (1996) demostraron la existencia de una correlación elevada entre la producción de L-lactato y el cociente entre el número de partos y el número de inseminaciones. Según esto, y dado que en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la producción de L-lactato, la luz no afectaría a estos parámetros reproductivos en modo alguno.

La otra prueba funcional utilizada fue el ORT. Schilling *et al.* (1986) observaron una elevada correlación del porcentaje de ORT con el porcentaje de gestaciones y la prolificidad. En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ORT. Por lo tanto, la luz no afectaría, según nuestros resultados, al porcentaje de gestaciones y a la prolificidad. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros autores. En estudios anteriores se observó que la temperatura y el fotoperíodo pueden afectar a la capacidad de resistencia de la membrana acrosómica a los cambios osmóticos del medio o del diluyente. Estos cambios en la resistencia de membrana parecen estar asociados a variaciones en la composición proteica de dicha membrana (Trudeau y Sandford, 1986b; Zamboni, 1992). En relación con estos estudios, otros autores también han observado variaciones de la ORT a lo

largo del año, alcanzándose valores más altos durante los meses de otoño (Ciereszko *et al.*, 2000; Pérez-Llano *et al.*, 2001). Estos cambios pueden ser debidos a variaciones en el proceso de diferenciación durante la fase de espermiogénesis que dan lugar a variaciones en la composición proteínica de las membranas plasmática y acrosómica del espermatozoide (Zamboni, 1992; Ciereszko *et al.*, 2000). Así, dado que en nuestros resultados no hemos observado ninguna diferencia significativa en los porcentajes de ORT, podríamos asumir que la luz no está afectando, en nuestras condiciones experimentales, al proceso de espermiogénesis. De este modo, la hipótesis propuesta anteriormente según la cual la luz produce cambios a nivel testicular pierde fuerza frente a un efecto del fotoperíodo sobre la maduración a nivel de epidídimo. Por otro lado, Abaigar *et al.* (1999) postularon que las subpoblaciones espermáticas se producen durante la espermatogénesis, de manera que cualquier situación que la altere es susceptible de provocar alteraciones en las subpoblaciones espermáticas. Ahora bien, estas alteraciones provocan cambios a nivel genotípico, por lo que se trataría fundamentalmente de mutaciones genéticas en los espermatozoides. Por lo tanto, estos estudios parecen dar más soporte a la hipótesis de que los cambios de luz producirían alteraciones en los niveles de testosterona y que estas variaciones modificarían de algún modo la maduración de los espermatozoides a nivel de epidídimo. De hecho, Park y Yi (2002) han observado variaciones en los niveles séricos de testosterona en el verraco a lo largo del año. Los niveles más altos se observaron durante los meses de primavera y los más bajos durante el verano. Durante el otoño y el invierno los valores son intermedios. Ahora bien, sería necesario determinar si la disminución de los niveles séricos de testosterona se refleja también a nivel testicular y/o epididimario para confirmar o no esta hipótesis.

Efecto de la luz artificial sobre el semen fresco

El efecto de la luz sobre la reproducción se ha estudiado tanto en regímenes de luz natural como en aquéllos de luz artificial. Los únicos resultados que hemos podido recoger en la bibliografía relativos el efecto del régimen lumínico artificial sobre el sistema reproductor del verraco han estudiado sólo alteraciones hormonales, sin determinaciones de la calidad seminal. Además, estos estudios presentaron resultados contradictorios. En el caso de la LH, algunos estudios observaron incrementos en su concentración sérica en machos suplementados lumínicamente (Lee *et al.*, 1987), mientras que otros autores no observaron variación alguna (Hoagland i Diekman, 1982;

Brandt y Diekman, 1985). En lo que respecta a la concentración sérica de testosterona, sucede lo mismo que con la LH, algunos autores han observado incrementos en su valor cuando se suplementa con luz a los machos (Lee *et al.*, 1987), mientras que otros no (Minton *et al.*, 1980).

En nuestro estudio se observaron algunas diferencias significativas entre el grupo de luz artificial de 9 horas y el de luz artificial de 16 horas. Así, en el caso de las anomalías morfológicas, los porcentajes de las anomalías de cabeza y de las anomalías totales mostraron diferencias significativas. Cuando se analizaron estos datos en más profundidad se observó que estas diferencias aparecían en los últimos meses de estudio, que correspondían en su totalidad al grupo de 16 horas. Así, podríamos pensar que realmente la duración de la luz tiene algún tipo de efecto sobre la morfología del semen. Sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, cuando se analizaron las anomalías morfológicas en el grupo de luz natural, se observó el mismo fenómeno. Por lo tanto, y del mismo modo que en el grupo de luz natural, parece más lógico pensar que este incremento en los porcentajes de anomalías es debido a la edad del verraco más que al efecto de la luz.

Respecto a los parámetros medios de motilidad, observamos que todos ellos, a excepción de la WOB, presentaron valores superiores en el grupo de luz artificial de 16 horas. Sin embargo, únicamente la ALHmed, la BCF y la HBS presentaron diferencias significativas entre los dos grupos de luz artificial. Así, podríamos afirmar que el número de horas de luz afecta de algún modo a las características de motilidad del semen, aunque no de una manera importante. En el análisis de la evolución de los parámetros medios se observaron pocas diferencias significativas de los diferentes puntos de estudio respecto al punto de referencia (febrero en el caso del grupo de luz artificial de 9 horas, septiembre en el caso del grupo de luz artificial de 16 horas). Además, también se observó que éstos tienden a estabilizarse con el paso del tiempo. En el caso del grupo de luz artificial de 9 horas, observamos que la ALHmed presenta diferencias significativas respecto al punto de referencia (febrero) a lo largo del tiempo. Sin embargo, estas diferencias desaparecen cuando se toma como punto de referencia el segundo mes de estudio (marzo). Los verracos del grupo de luz artificial fueron introducidos en el programa lumínico a mediados de enero. Teniendo en cuenta que la espermatogénesis requiere un total de al menos 6 semanas para completarse (Colenbrander y Kemp, 1990), las posibles variaciones del semen serían observables a

partir del segundo mes de estudio. Así, si tomamos como punto de referencia el mes de marzo, observamos que las diferencias entre los puntos de estudio en realidad no son tales, puesto que desaparecen. En el caso del grupo de luz artificial de 16 horas sucede lo mismo, ya que las diferencias observadas en la HLO desaparecen cuando se toma como referencia el mes de octubre en vez del mes de septiembre.

En el caso de la evolución de las subpoblaciones espermáticas, observamos el mismo fenómeno. La mayoría de los parámetros analizados presentan diferencias significativas en alguno de los puntos de estudio respecto a los puntos de referencia. Estas diferencias desaparecen si se toma como punto de referencia el segundo mes de estudio en cada uno de los grupos de luz artificial. Así, pues, también en las subpoblaciones espermáticas se observa la tendencia a estabilizarse con el paso del tiempo.

Por lo tanto, podemos decir que la duración de la fotofase, con una intensidad constante, sí parece tener algún tipo de efecto sobre la motilidad espermática. Ahora bien, también es cierto que el verraco parece disponer de algún mecanismo capaz de regular estos cambios y estabilizar las características del semen, conservando una buena calidad seminal. Este mecanismo, tal y como se ha dicho en apartado de luz natural, podría estar regulado por la melatonina. Estos resultados parecen corroborar la hipótesis propuesta previamente según la cual, la melatonina actuaría más como reguladora del eje hipotálamo-hipófisis-testículo que como hormona simplemente estimuladora/inhibidora sobre dicho eje.

En el caso de la luz artificial, tal y como sucede en el caso del grupo de luz natural, existen estudios que dan mayor peso a la teoría de que la luz produce cambios en los niveles de testosterona y éstos, a su vez, provocan cambios a nivel de maduración. Andersson *et al* (1998) observaron que los niveles séricos de testosterona eran superiores en los animales que disponían de un fotoperíodo artificial de 9 horas comparado con los animales que disponían de 16 horas de luz. Así, si retomamos los resultados obtenidos en los grupos de luz natural, observamos que los valores de motilidad varían significativamente en la VAP, la ALHmed, la BCF, la HLO y la HBS. A la vista de estos resultados y de los obtenidos por Andersson *et al* (1998) podríamos afirmar que los diferentes períodos de luz artificial producen variaciones en los niveles séricos de testosterona, alterando consecuentemente las características mótils de los espermatozoides. La pregunta que se plantea a continuación es por qué no se observan estas variaciones en el grupo de luz natural. El planteamiento más lógico sería pensar

que, dado que los cambios lumínicos en el fotoperíodo natural son progresivos, el verraco se adapta de manera también progresiva y no refleja cambios bruscos en las características mótils del semen.

Respecto a las pruebas funcionales realizadas, ORT y ritmo de producción de L-lactato, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Por lo tanto, podríamos asumir que las variaciones observadas en las características de motilidad no afectarían a los parámetros reproductivos relacionados con estas dos pruebas, como son el porcentaje de gestaciones y fertilidad en el caso de la ORT (Schilling *et al.*, 1986), y el cociente entre el número de partos y el número de inseminaciones en el caso del ritmo de producción de L-lactato (Rigau *et al.*, 1996). En definitiva, podemos asumir que los regímenes de luz artificial usados en este estudio provocan solamente pequeños y graduales cambios en la calidad seminal de los verracos, los cuales, además, seguramente no afectarán la capacidad fertilizante de estos animales “*in vivo*”.

Efecto de la luz sobre la conservación de semen a 16°C

Cuando se analizaron las características de las muestras seminales al cabo de 72 horas de conservación a 16° C se observaron muy pocas diferencias significativas entre los parámetros de calidad seminal estudiados. Además, las diferencias detectadas fueron siempre puntuales, tanto en el grupo de luz natural como en el grupo de luz artificial. Así, podríamos afirmar que la luz no ejerce ningún efecto importante sobre la capacidad de conservación del semen en general. Por otra parte, uno de los factores que pueden tener más importancia en la modulación de la capacidad de conservación del semen refrigerado es el propio diluyente utilizado. Un estudio llevado a cabo por Kuster y Althouse (1999) muestra la capacidad del diluyente para alterar la capacidad fertilizante del semen a lo largo del tiempo de conservación, afectando concretamente a la tasa de partos y al número de lechones. En dicho estudio se compararon dos diluyentes comerciales y se observó que la tasa de partos y el número de lechones variaba entre ambos a lo largo del tiempo, siendo inferiores en uno de ellos. En otro estudio, Kommisrud *et al* (2002) observaron que los porcentajes de motilidad total y acrosomas intactos en el semen de verraco disminuían progresivamente después de cinco días de conservación en BTS a 16°C. Estos resultados difieren totalmente de los nuestros, que no presentaron diferencias significativas en estos parámetros. Así, podríamos afirmar

que el diluyente condiciona la capacidad del semen para conservarse, siendo el diluyente utilizado en nuestro estudio, el SP, más adecuado que el BTS para conservar el semen durante 3 o 4 días.

Es interesante destacar un hecho que se produce en los porcentajes poblacionales y que se observa tanto en el grupo de luz natural como en los de luz artificial. Este hecho es el incremento que sufre la subpoblación 2 en detrimento, básicamente, de la subpoblación 1. Curiosamente, esta subpoblación 2 es la que presenta valores de VAP y WOB bajos. Sería lógico pensar que esta subpoblación es la que tiene menos capacidad fecundante, o por lo menos, la que tendrá menos posibilidades de fecundar el ovocito o, incluso, ser los espermatozoides que se están muriendo. La disminución en la subpoblación 1 también podría ser debida, por otra parte, al contenido de EDTA del diluyente. El EDTA es un conocido quelante de calcio, de manera que disminuirá la capacidad de movimiento de los espermatozoides, puesto que este ión es fundamental en numerosos procesos espermáticos, desde el control de la motilidad espermática hasta el desencadenamiento de la reacción acrosómica, la fusión espermatozoide-ovocito y la activación del ovocito (Yanagimachi, 1982; Suárez *et al.*, 1993; Suárez y Dai, 1995). La importancia del calcio en la regulación de la motilidad queda evidenciada también por estudios realizados con cafeína. Esta sustancia libera el calcio intracelular de los espermatozoides y activa su motilidad (Zuchhi y Ronca-Testoni, 1997). Asimismo, también se ha observado que la cafeína es capaz de activar canales permeables al calcio (Guerrero *et al.*, 1994; Schoppe *et al.*, 1997). Por lo tanto, si el diluyente utilizado para la conservación del semen contiene EDTA y éste tiene la capacidad de quelar el calcio, es lógico que la motilidad espermática se vea disminuida, lo cual redundaría en la observada disminución en el porcentaje de las subpoblaciones más rápidas y activas a favor de las más lentas. Por lo tanto, durante el proceso de conservación, el cambio entre los porcentajes de subpoblaciones se debería a la conjunción de dos factores. Uno, la muerte progresiva de los espermatozoides más débiles. El otro, el enlentecimiento general provocado por sustancias del diluyente que modulan la motilidad, como el EDTA. En definitiva, podríamos concluir que, según nuestros resultados, la luz en sí no altera la capacidad de conservación del semen y que las variaciones que se observan son debidas a la acción conjunta de estos dos factores.

CONCLUSIONES

1. La luz, sea natural o artificial, no ejerce ningún efecto significativo sobre las anomalías morfológicas del semen.
2. La edad presenta un efecto negativo sobre los porcentajes de anomalías morfológicas. A más edad, mayor es el porcentaje de anomalías observado.
3. Los cambios progresivos de intensidad y duración de la luz natural no alteran las características de motilidad de los espermatozoides de verraco.
4. La estructura de los espermatozoides móviles en un eyaculado de verraco, según nuestros resultados, en cuatro subpoblaciones espermáticas. La primera de ellas se caracteriza por presentar una VAP intermedia con un elevado WOB. La segunda presenta una VAP baja con un WOB intermedio. La tercera presenta una VAP baja con un elevado WOB. Por último, la cuarta presenta una VAP y un WOB elevados.
5. La luz natural de creciente provoca un incremento significativo de la subpoblación dos en detrimento de las subpoblaciones restantes.
6. La luz artificial provoca cambios en las características de motilidad del semen de verraco. Sin embargo, estas variaciones se estabilizan a partir del segundo mes de estudio. Así, podemos afirmar que el sistema endocrino del verraco es capaz de adaptarse a los cambios de luz.
7. La luz no ejerce ningún efecto sobre la capacidad de conservación del semen.

Conclusiones

8. La conservación del semen de verraco en diluyente SPSS a 16°C durante 72 horas no provoca alteraciones significativas en las características de calidad seminal. Únicamente produce un incremento de la subpoblación dos, la cual podría estar constituida por los espermatozoides de menor vitalidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abaigar, T.; Holt, W.V.; Harrison, R.; del Barrio, G.; 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessment. *Biology of Reproduction*, 60, 32-41.
2. Aleandri, V.; Spina, V.; Morini, A.; 1996. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update*, 2, 225-235.
3. Allrich, R.D.; Christenson, R.K.; Ford, J.J., Zimmerman, .R.; 1983. Pubertal development of the boar; age-related changes in testicular morphology and in vitro production of testosterone and estradiol-17 β . *Biology of Reproduction*, 28, 902-909.
4. Andersson, H.; Wallgren, M.; Rydhmer, L.; Lundström, K.; Anderson, K.; Forsberg, M.; 1998. Photoperiodic effects on pubertal maturation of spermatogenesis, pituitary responsiveness to exogenous GnRH, and expression of boar taint in crossbred boars. *Animal Reproduction Science*, 54; 121-137.
5. Aumüller, R.; Willeke, H.; 1988. Computer controlled analysis of boar semen with the "cell soft system". *Proceedings 11th International Congress of Animal Reproduction and A.I.*, 3, 227.
6. Bach, S.; Neundorf, P.; Stemmler, K.H.; Mudra, K.; Ueckert, H.; 1982. Hoehe und Bewertung des Anteiles anormales Spermien beim Eber. *Mh. Vet Med*, 37, 38-44.
7. Bartle, J.L.; Senger, P.L.; Hillers, J.K.; 1980. Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. *Biology of Reproduction*, 23, 1007-1013.
8. Bazer, F.W.; Thatcher, W.W.; Martinat-Botte, F.; Terqui, M.; 1988. Sexual maturation and morphological development of the reproductive tract in Large

- White and prolific Chinese Mieshan pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 723-728.
9. Berger, T.; Mahone, J.P.; Svoboda, K.W.; Clegg, E.D.; 1980. Sexual maturation of boars and growth of swine exposed to extended photoperiod during decreasing natural photoperiod. *Journal of Animal Science*, 51, 3, 672-678.
 10. Borg, K.E.; Lunstra, D.D.; Christenson, R.K.; 1993. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan and minzhu boars. *Biology of Reproduction*, 49, 515-521.
 11. Bradford, M.; 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-256.
 12. Brandt, K.E.; Diekman, M.A.; 1985. Influence of supplemental lighting on serum LH, testosterone and semen quality in prepubertal and postpubertal boars. *Animal Reproduction and Fertility Supplement*, 40, 117-131.
 13. Brooks, D.E.; 1979. Influence of androgens on the weight of the male accessory reproductive organs and on the activities of mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. *Journal of Endocrinology*, 82, 293-303.
 14. Brooks, D.E.; 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian Journal of Biology Science*, 36, 205-221.
 15. Bryan, H.D.; Akruk, S.R.; 1977. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. 52, 47-51.
 16. Buchanan-Smith, J.G.; Nelson, E.C.; Osburn, B.I.; Wells, M.E.; Tillman, A.D.; 1969. Effects of vitamin E and selenium deficiencies in sheep fed a purified diet during growth and reproduction. *Journal of Animal Science*, 29, 808-815.
 17. Budworth, P.R.; Amann, R.P.; Chapman, P.L.; 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology*, 9, 41-54.
 18. Cameron, R.D.A.; 1985. Factors influencing semen characteristics in boars. *Australian Veterinary Journal*, 62, 293-297.
 19. Christenson, R.K.; Teague, H.S.; Grifo, a.P.; Roller, W.L.; 1972. The effect of high environmental temperature on the boar. *Ohio Swine Research and Information Report. Research summary 61*, Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster.
 20. 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, 89-96.

21. Claus, R.; Weiler, U.; Wagner, H.G.; 1985a. Photoperiodic influences on reproduction of domestic boars. II. Light influences on semen characteristics and libido. *Zentbl. VetMed. A*, 32, 99-109.
22. Claus, R.; Weiler, U.; 1985b. Influence of light and photoperiodicity on pig prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 33, 185-197.
23. Colenbrander, B.; Kemp, B.; 1990. Factors influencing semen quality pigs, *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 40, 105-115.
24. Conlon, P.D.; Kennedy, B.W.; 1978. A comparison of crossbred and purebred boars for semen and reproductive characteristics. *Canadian Journal of Animal Science*, 58, 63-70.
25. Danzo, B.J.; Cooper, T.G.; Orgebin-Crist, M.C.; 1977. Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymidis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes. *Biology of Reproduction*, 17, 64-77.
26. Davis, R.O.; Kats, D.F.; 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, 13, 81-86.
27. Davis, R.O.; Katz, D.F.; 1993. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, 14, 385-394.
28. Davis, R.O.; Rothman, S.A.; Overstreet, J.W.; 1992. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertility and Sterility*, 57, 648-653.
29. Davis, R.O.; Siemers, R.J.; 1995. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 857-869.
30. Dutt, R.H.; Barnhart, C.E.; 1959. Effect of plane of nutrition upon reproductive performance of boars. *Journal of Animal Science*, 18, 3.
31. Ellis, W.A.; McParland, P.J.; Bryson, D.G.; Cassells, J.A.; 1986. Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. *Veterinary Record*, 118, 563-566.
32. Fawcett, D.W.; Hoffer, A.P.; 1979. Failure of exogenous androgen to prevent regression of the initial segments of the rat epididymis after efferent duct ligation or orchietomy. *Biology of Reproduction*, 20, 162-181.
33. Feitsma, H.; Grooten, H.J.; M Bryson, D.G.; Cassells, J.A.; 1992. The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (P.E.A.R.S) on sperm production. *Proceedings of 12th International Congress on Animal Reproduction*. The Hague, Netherlands, 4, 1710-1712.
34. Fent, R.W.; Wettemann, R.P.; Johnson, R.K.; 1983. Breed and heterosis effects on testicular development and endocrine function of puberal boars. *Journal of Animal Science*, 57, 425-432.

35. FlorCruz, S.V.; Lapwood, K.R.; 1987. A longitudinal study of pubertal development in boars. *Int. Journal of Andrology*, 1, 317.
36. Forman, A.J.; Lenghaus, C.; Hogg, G.C.; Hale, C.J.; 1977. Association of a parvo virus with an outbreak of foetal death and mummification in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 53, 326-329.
37. Gadea, J.; Sellés, E.; Tomás, P.; Ruiz, S.; 2001. El valor del análisis seminal porcino en las condiciones de explotación comercial. *ITEA, IX Jornadas sobre producción animal*, 22, 829-831.
38. Gadella, B.M.; Colenbrander, B.; Van Golde, L.M.G.; Lopez-Cardoso, M.; 1992. Characterization of three arylsulfatases in semen: seminolipid sulhydrolyase activity is present in seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1128, 155-162.
39. Gill, H.S.; VanArsdalen, K.; Hypolite, J.; Levin, R.M.; Ruzich, J.V.; 1988. Comparative study of two computerized semen motility analyzers. *Andrology*, 20, 433-440.
40. Grabner, R.; Elze, K.; Molzahn, E.; 1986. Untersuchungen zum einfluss von jahreszeit und durchschnittlicher aussentemperatur auf produktivitaet und spermaqualitaet von besamungsebern. *Mh. VetMed.*, 41, 737-741.
41. Gradil, C.M.; Harding, M.-J.; Molitor, T.W.; Crabo, B.; 1991. Boar semen: transmission and detection of viruses. *Reproduction in Domestic Animals Supplement*, 1, 273-285.
42. Grant, S.A.; Long, S.E.; Parkinson, T.J.; 1994. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 477-483.
43. Greenberg, L.G.; Mahone, J.P.; 1981. The effect of a 15-h photoperiod on reproductive function in boars at 2, 3, 4 or 5 months of age. *Canadian Journal of Animal Science*, 61, 925-934.
44. Griffith, M.H.; Minton, J.E.; 1992. Effect of light intensity on circadian profiles of melatonin, prolactin, ACTH, and cortisol in pigs. *Journal of Animal Science*, 79, 492-498.
45. Guerrero, A.; Fay, F.S.; Singer, J.J.; 1994. Caffeine activates a Ca^{2+} permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.*, 104, 375-394.
46. Hammerstedt, R.H.; 1996. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Animal Reproduction Science*, 42, 77-87.
47. Hare, W.C.D.; 1985. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. In *Office International des Epizooties Tehcnical Series*, nº 4. Paris.

48. Harrison, R.A.P.; Mairet, B.; Miller, N.G.A.; 1993. Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. *Molecular Reproduction Development*, 35, 197-208.
49. Hemsworth, P.H.; 1982. Social environment and reproduction. In *Control of Pig Reproduction*, pp. 585-601. Eds D.J.A. Cole & G.R. Foxcroft. Butterworth, London.
50. Hemsworth, P.H.; Beilharz, R.G.; Galloway, D.B.; 1977. Influence of social conditions during rearing on the sexual behaviour of the domestic boar. *Animal Production*, 24, 245-251.
51. Hemsworth, P.H.; Findlay, J.K.; Beilharz, R.G.; 1978. The importance of physical contact with other pigs during rearing on the sexual behaviour of the male domestic pig. *Animal Production*, 27, 201-207.
52. Hemsworth, P.H.; Galloway, D.B.; 1979. The effect of sexual stimulation on the sperm output of domestic boar. *Animal Reproduction Science*, 10, 601.
53. Hemsworth, P.H.; Winfield, C.G.; Chamley, W.A.; 1981. The influence of the presence of the female on the sexual behaviour and plasma testosterone levels of the mature male pig. *Animal Production*, 32, 61-65.
54. Hemsworth, P.H.; Winfield, C.G.; Hansen, C.; Makin, A.W.; 1983. The influence of isolation from females and mating frequency on the sexual behaviour and semen quality of young post-pubertal boars. *Animal Production*, 37, 49-52.
55. Henson, M.C.; Kattesh, H.G.; Hitchcock, J.P.; Kincaid, S.A.; 1983. The effects of dietary selenium on growth and selected reproductive parameters in young boars. *Animal Production*, 37, 401-407.
56. Hoagland, T.A.; Diekman, M.A.; 1982. Influence of supplemental lighting during increasing daylength on libido and reproductive hormones in prepubertal boars. *Journal of Animal Science*, 55, 6, 1483-1489.
57. Holland, M.K.; Vreeburg, J.T.M.; Orgebin-Crist, M.C.; 1992. Testicular regulation of epididymal protein secretion. *Journal of Andrology*, 13, 266-273.
58. Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, D.M.; 1996. Choice of operating conditions to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis. *Journal of Andrology*, 17, 587-596.
59. Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, H.; Reed, H.; Curnock, R.M.; 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, 18, 3, 312-323.
60. Holt, W.V.; 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reproduction of Domestic Animals*, 31, 17-24.
61. Holt, W.V.; Watson, P.; Curry, M.; Holt, C.; 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems in a practical workshop. *Fertility and Sterility*, 62, 1277-1282.

62. Huang, Y.; Johnson, R.K.; 1996. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *Journal of Animal Science*, 74, 750-760.
63. Huhges, P.; Varley, K.; 1984. Fertilidad en el macho. En: *Reproducción del cerdo*. Editorial Acribia, Capítulo 12, pp. 200-205.
64. Johnson, L.A.; Aalners, J.G.; Willems, C.M.T.; Rademaker, J.H.M.; 1980. Fertility of boar semen stored in BL-1 and Kiev extenders at 18°C for three days. *Proc. Congr. Int. Pig Ve. Soc.*, Copenhagen, p. 33, abstr.
65. Johnson, M.; Everitt, B.; 1984. Testicular function. En: *Essential Reproduction*, 2nd edition. Editores Johnson, M.; Everitt, B.; London, pp. 70-73.
66. Johnson, L.A.; Gerrits, R.J.; Young, E.P.; 1969. Quantitative analysis of porcine spermatozoa and seminal plasma phospholipids as affected by frequency of ejaculation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 19, 95-102.
67. Johnson, L.A.; Pursel, V.G.; Gerrits, R.J.; 1972. Total phospholipid and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluids of boars. *Journal of Animal Science*, 35, 398-403.
68. Johnson, L.A.; Weitza, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C.; 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 143-172.
69. Kato, S.; Harayama, H.; 1990. Sexual maturation of Meishan boars. *Proceedings Chinese Pig Symposium*; Toulouse, France, 36.
70. Keel, B.A.; 1990. The semen analysis. En: *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Editores Keel B.A.; Webster, B.W.; Boca Ratón, pp.27-70.
71. Kemp, B.; Bakker, G.C.M.; den Hartog, L.A.; Verstegen, M.W.A; 1991. The effect of semen collection frequency and food intake on semen production in breeding boars. *Br. Soc. Anim. Prod.*, 52, 355.
72. Kemp, B.; den Hartog, L.A.; Grooten, H.J.G.; 1989. The effect of feeding level on semen quantity and quality of breeding boars. *Animal Reproduction Science*, 22, 245.
73. Kennedy, B.W.; Wilkins, J.N.; 1984. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Canadian Journal of Animal Science*, 64, 833.
74. Kluge, J-P.; Mare, C.J.; 1974. Swine pseudorabies: abortion, clinical disease and lesions in pregnant sows infected with pseudorabies virus (Aujeszky's disease) *American Journal of Veterinary Research*, 35, 911-915.
75. Koh, t.J.; Crabo, B.G.; Tsou, H.L.; Graham, E.F.; 1976. Fertility of liquid boar semen as influenced by breed and season. *Journal of Animal Science*, 42, 138-144.

76. Komarek, R.J.; Pickett, B.W.; Gibson, E.W.; Jensen, T.G.; 1965. Lipids of porcine spermatozoa, seminal plasma and gel. *Journal of Reproduction and Fertility*, 9, 131-136.
77. Kommisrud, E.; Paulenz, H.; Sehested, E.; Grevle, I.S.; 2002. Influence of boar and semen semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43 (1), 49-55.
78. Kuster, C.E.; Althouse, G.C.; 1999. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology*, 52, 365-376.
79. Lan, Z.J.; Labus, J.C.; Hinton, B.T.; 1998. Regulation of gammaglutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic fibroblast growth factor. *Biology of Reproduction*, 58, 197-206.
80. Lawrence, J.A.; Turman, E.J.; Rich, T.; Sharp, A.; Hillier, J.C.; 1970. A study of seasonal changes in boar semen. *Okla. agric. exp. Sta. Bull. MP-84*, 77.
81. Lee, K.H.; Diekman, M.A.; Brandt, K.E.; Grieger, D.M.; Allrich, R.D.; 1987. Hormonal patterns of boars exposed to natural or supplementl lighting during pubertal development. *Journal of Animal Science*, 64, 1110-1116.
82. Leman, A.D.; Rodeffer, H.E.; 1976. Boar management. *Veterinary Record*, 98, 457-459.
83. Levis, D.G.; 1999. Mejora de la fertilidad del verraco. *Anaporc*, 193, 32-46.
84. Lingwood, C.A.; Quinn, P.A.; Wilansky, S.; Nutikka, A.; Ruhnke, H.L.; Miller, R.B.; 1990. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biology of Reproduction*, 35, 694-697.
85. Liu, C.H.; Chen, Y.M.; Zhang, J.Z.; Huang, M.Y.; Su, Q.; Lu, Z.H.; Yin, R.X.; Shao, G.Z.; Feng, D.; Zheng, P.L.; 1982. Preliminary studies on influence of selenium deficiency to the developments of genital organs and spermatogenesis of infancy boars. *Acta Vet. Zootech. Sin.*, 13, 73-77.
86. Louis, G.F.; Lewis, A.J.; Weldon, W.C.; Miller, P.S.; Kittok, R.J.; Stroup, W.W.; 1994a. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *Journal of Animal Science*, 72, 2038-2050.
87. Louis, G.F.; Lewis, A.J.; Weldon, W.C.; Miller, P.S.; Kittok, R.J.; Stroup, W.W.; 1994b. The effect of energy and protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *Journal of Animal Science*, 72, 2051-2060.
88. Lubritz, D.; Johnson, B.; Robinson, O.W.; 1991. Genetic parameters for testosterone production in boars. *Journal of Animal Science*, 69, 3220-3224.
89. Lunstra, D.D.; Borg, K.E.; Klindt, J.; 1992. Characterization of pubertal development in the Meixhan Chinese boar. *Journal of Animal Science*, 70, 267.

90. Lunstra, D.D.; Ford, J.J.; Christenson, R.K.; Allrich, R.D.; 1986. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development of the boar. *Biology of Reproduction*, 34, 145-158.
91. Mahone, J.P.; Berger, T.; Clegg, E.D.; Singleton, W.L.; 1979. Photoinduction of puberty in boars during naturally occurring short daylengths. *Journal of Animal Science*, 48, 1159-1164.
92. Mauget, R.; 1982. Seasonality of reproduction in the wild boar. En: *Control of Pig Reproduction*. Colo and Foxcroft Eds., Butterworths, London.
93. Marín-Guzmán, J.; Mahan, D.C.; Chung, Y.K.; Pate, J.L.; Pope, W.F.; 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *Journal of Animal Science*, 75 (11), 2994-3003.
94. Mazzari, G.; DuMesnil du Buisson, R.; Ortavant, R.; 1969. Action de la température et de la lumière sur la spermatogenèse, la production et le pouvoir fécondant du sperme chez le verroat. *Journée de Rech. Porc. France*, 37, 109.
95. McConell, S.J.; Ellendorf, F.; 1987. Absence of nocturnal plasma melatonin surge under long and short artificial photoperiods in the domestic sow. *Journal of Pineal Research*, 4, 201.
96. McNitt, J.I.; First, N.L.; 1970. Effect of 72-hour heat stress on semen quality in bors. *Int. J. Biometeor.*, 14, 373-380.
97. Medveczky, I.; Szavo, I.; 1981. Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungarica*, 29, 29-35.
98. Minton, J.E.; Cash, W.C.; 1990. Effect of cranial sympathectomy on circadian rhythms of cortisol, adenocorticotropic hormone and melatonin in boars. *Journal of Animal Science*, 68, 4277-4284.
99. Minton, J.E.; Davis, D.L.; Stevenson, J.S.; 1989. Contribution of the photoperiod to circadian variations in serum cortisol and melatonin in boars. *Domestic Animals Endocrinology*, 6, 177-181.
100. Minton, J.E.; Fent, R.W.; Wettemann, R.P.; 1980. Influence of photoperiod on reproductive development of boars. *Domestic Animals Endocrinology*, 2, 53.
101. Moore, H.D.M.; Samayawardhena, L.A.; Brewis, I.A.; 1998. Sperm maturation *in vitro*: co-culture of spermatozoa and epididymal epithelium. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 53, 23-31.
102. Mortimer, D.; Aitken R.J.; Mortimer, S.T.; Pacey, A.A.; 1995. Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus, *Reproduction Fertility Development*, 7, 951-959.
103. Mortimer, D.; Serres, C.; Mortimer, S.T.; Jouannet, P.; 1988. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Research*, 20, 313-327.

104. Nelssen, J.L.; Davis, D.L.; Craig, J.V.; Hiunes, R.H.; 1982. Reproductive development in young boars exposed to sexually mature, nonpregnant sows and gilts. *Theriogenology*, 17, 545-550.
105. Neuwinger, J.; Behre, H.M.; Nieschlag, E.; 1990. Computerized semen analysis with sperm tail detection. *Human Reproduction*, 5, 719-723.
106. Nicander, L.; Osman, D.I.; Ploen, L.; Bugge, H.P.; Kvisgaard, K.N.; 1983. Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *International Journal of Andrology*, 6, 91-102.
107. Noll, F.; 1984. L-lactate. En: H.U. Bergmeyer (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol, VI. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 582-588.
108. Ogasa, A.; Yokoki, Y.; Fujisaka, Y.; Murakami, Y.; 1978. Reproductive disorders in boars infected experimentally with porcine parvovirus. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 24, 73-76.
109. Ohlinger, V.F.; 1992. The porcine reproductive and respiratory syndrome and its significance for artificial insemination in pigs. In *Proceedings of 4th International Meeting of AI Vets*, pp 1-4. Bonn, Germany.
110. Olds-Clarke, P.; Segó, R.; 1992. Calcium alters capacitation and progressive motility of uterine spermatozoa from +/+ and congenic tw32/+mice. *Biology of Reproduction*, 47, 629-635.
111. Olds-Clarke, P.; Wivell, W.; 1992. Impaired transport and fertilization in vivo of calcium-treated spermatozoa from +/+ or congenic tw32/+ mice. *Biology of Reproduction*, 47, 621-628.
112. Orgebin-Crist, M.C.; Danzo, B.J.; Davies, J.; 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. En: *Handbook of Physiology, Endocrinology V, section 7, Male Reproduction Tract*. Editores R. Greep y D. Hamilton. American Physiological Society, Washington pp 319-337.
113. Park, c.S.; Yi, Y.J.; 2002. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkschire boars during seasons. *Animal Reproduction Science*, 73, 53-61.
114. Pérez-Llano, B.; Lorenzo, J.L.; Yenes, P.; Trejo, A.; Carcía-Casado, P.; 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 52 (3), 387-398.
115. Peter, W.; Frank, C.; Mudra, K.; Uechert, H.; 1981. Der einfluss der aufzucht von jungebern in zentralen stationen auf besamungseignung und spermaproktionsvermoegen. *Terzucht*, 35, 92-95.
116. Poppe, S.; Huhn, U.; Kleemann, F.; Konig, I.; 1974. Untersuchungen zur nutritiven beeinflussung beim jung- und besamlungsebern. *Arch. Tierernaehr.*, 6, 499.

117. Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40, 99-102.
118. Rath, D.; Armbrrecht, S.; Schaap, P.; Weitze, K.F.; 1988. Experience with a computerized videomicrographic system for sperm analyses. *Proceedings 11th International Congress of Animal Reproduction and A.I.*, 3, 288.
119. Rathje, T.A.; Johnson, R.K.; Lunstra, D.D.; 1995. Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. *Journal of Animal Science*, 73, 2177-2185.
120. Reibenwein, K.; 1989. Computer-aided measurements of sperm motility in semen from AI boars. Munich: Ludwing-Maximilian-Universitat: PhD Thesis, 1989.
121. Reiter, R.J.; Britt, J.H.; Armstrong, J.D.; 1987. Absence of a nocturnal rise in either norepinephrine, N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase or melatonin in the pineal gland of the domestic pig kept under natural environment photoperiods. *Neuroscience Lett.*, 16, 171-176.
122. Renard, P.; Trimeche, A.; Le Picho, J.P.; Quero, J.C.; Griveau, J.F.; Chouteau, P.; Tainturier, D.; La Lannou, D.; 1996. Sperm motility and flagellar motion: a comparison between boar and other mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, 31, 249-250.
123. Rigau, T.; Piedrafita, J.; Reverter, A.; Canal, M.; Rodríguez-Gil, J.E.; 1996. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Animal Reproduction Science*, 43, 161-172.
124. Robaire, B.; Viger, R.S.; 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, 52, 226-236.
125. Rodríguez-Gil, J.E.; Rigau, T.; 1995. Effect of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *Animal Reproduction Science*, 39, 141-146.
126. Rooke, J.A., Shao, C.C.; Speake, B.K.; 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. *Reproduction*, 121, 315-322.
127. Sánchez, R.; 1991. Control de calidad espermática. *Anaporc*, 104, 27-33.
128. Schilling, E.; Vengust, M.; Bajt, G.; Tomcic, M.; 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. 9th IPVS Congress, Barcelona, p. 77.
129. Schoppe, J.; Hochstrate, P.; Schlue, W.R.; 1997. Caffeine mediates cation influx and intracellular Ca²⁺ release in leech P neurones. *Cell Calcium*, 22 385-397.
130. Segerson, E.C.; Getz, W.R.; Johnson, B.H.; 1981. Selenium and reproductive function in boars fed a low selenium diet. *Journal of Animal Science*, 53, 1360-1367.

131. Segerson, E.C.; Johnson, B.H.; 1980. Slenium and reproductive function in yearling Angus bulls. *Journal of Animal Science*, 51, 395-401.
132. Shinckel, A.P.; Johnson, R.K.; Kittok, R.K.; 1984. Testicular development and endocrine characterization of boars selected for either high or low testis size. *Journal of Animal Science*, 58, 675.
133. Slaweta. R.; Strzezek. J.; 1984. The season of year and biological properties of preserved boar's semen. *Med. Vet.*, 10, 619-622.
134. Smith, D.G.; Senger, P.L.; McCutchan, J.F.; Landa, C.A.; 1979. Selenium and glutathione peroxidase distribution in bovine semen and selenium-75 retention by the tissues of the reproductive tract in the bull. *Biology Reproduction*, 20, 377-383.
135. *Statiscal Analysis System – SAS User's Guide: Statics*. SAS Institute, Cary, NC, 1982.
136. Stabendeldt, G.; Edqvist, L.E.; 1984. Male Reproductive Processes. En: *Duke's Physiology of Domestic Animals*. Editor: Swenson, M.J. London, pp. 833-846.
137. Stemmler, K.H.; Bach, S.; Neuendorf, P.; Mudra, K.; Ueckert, H.; 1982. Der Einfluss von Sprmienanomalien auf die Befruchtungsleistung beim Eber. *Mh. VetMed*, 37, 467-470.
138. Stevermer, E.J.; Kovacs, M.F.; Hoekstra, W.G.; Self, H.L; 1961. Effect of feed intake on semen characteristcs and reproductive performance of mature boar. *Journal of Animal Science*, 20, 858.
139. Stone, B.A.; 1982. Heat induced infertility of boars: The inter-relationship between depressed sperm output and fertility and an estimation of the critical air temperature above which sperm ouput is impaired. *Animal Reproduction Science*, 4, 283-299.
140. Stone, B.A.; Seamark, R.F.; 1984. Effects of acute and chronic testicular hyperthermia on levels of testosterone and corticosteroids in plasma of boars. *Animal Reproduction Science*, 7, 391.
141. Suárez, S.S.; Dai, X.; 1995. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster cperm. *Mollecular Reproduction Development*, 42, 325-333.
142. Suárez, S.S.; Varosi, S.M.; Dai, X.; 1993. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the falgellar beat cycle. *Cell Biology*, 90; 4660-4664.
143. Sujarit, S.; Jones, R.C.; Setchell, B.P.; Chaturapanich, G.; Lin, M.; Clulow, J.; 1990. Stimulation of protein secretion in the initial segment of the rat epididymis by fluid from the ram rete testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88, 315-321.

144. Swierstra, E.E.; 1973. Influence of breed, age, and ejaculation frequency on boar semen composition. *Can. J. Anim Sci.*, 53, 43-53.
145. Swierstra, E.E.; 1974. A comparison of regular ejaculation with sexual rest on semen characteristics and reproductive organ weights in young boars. *Journal of Animal Science*, 39, 575-581.
146. Tast, A.; Love, R.J.; Evans, G.; Andersson, H.; Peltoniemi, O.A.T.; Kennaway, D.J.; 2001. The photophase light intensity does not affect the scotophase melatonin response in the domestic pig. *Animal Reproduction Science*, 65, 283-290.
147. Thibault, C.; Courot, M.; Martinet, L.; Mauleon, P.; Mesnil du Buisson, F.; Ortavant, R.; Pelletier, J.; Signoret, J.P.; 1966. Regulation of breeding season and estrous cycles by light and external stimuli in some mammals. *Supplement Journal of Animal Science*, 25, 119-142.
148. Thomas, H.R.; Kattesh, H.G.; Knight, J.W.; Gwazdauskas, F.C.; Meacham, T.N.; Kornegay, E.T.; 1979. Effects of housing and rearing on age at puberty and libido in boars. *Animal Production*, 28, 231-234.
149. Trudeau, V.; Sanford, L.M.; 1986a. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult landrace boar. *Journal of Animal Science*, 63, 1211-1219.
150. Trudeau, V.; Sanford, L.M.; 1986b. Season and social environment influence the membrane integrity of ejaculated boar spermatozoa as assessed by ouabain sensitivity. *Canadian Journal Physiol. Pharmacol.*, 64, 1407-1412.
151. Vandeplassche, M.; Spincemaille, J.; Bouters, R.; Dekeyser, P.; Bonte, P.; 1967. Grucella suis infection and infertility in swine. *Mededelingen Veeartsenijsschool Gent*, 11, 2.
152. Vantman, D.; Koukoulis, G.; Dennison, L.; Zinaman, M.; Sherins, R.J.; 1988. Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertility and Sterility*, 49, 510-515.
153. Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Blanco, O.; Lucas, X.; Matás, C.; 1997. Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. *IV simposium Internación de Reproducción e Inseminación Artificial*, 83-90.
154. Wang, R.S.; 1990. Reproductive characteristics of the Fengjing pigs. *Proceedings Chinese Pig Symposium, Toulouse, France*, 6-16.
155. Wensvoort, G.; Terpstra, C.; Pol, J.M.A.; ter Laad, E.A.; Bloemraad, M.; de Kluyver, E.P.; Kragten, C.; van Vuiten, L.; den Besten, A.; Wagenaar, F.; Broekuijzen, J.M.; Moonen, P.L.J.M.; Zetstra, T.; de Boer, E.A.; Tibben, H.J.; de Jong, M.F.; van't Veld, P.; Groenland, G.J.R.; van Gennep J.A.; Voets, M.T.; Verheijden, J.H.M.; Braamskamd, J.; 1991. Mystery swine disease in the

- Netherlands: the isolation of the Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 13, 121-134.
156. Wilson, E.R.; Johnson, R.K.; Wettemann, R.P.; 1977. Reproductive and testicular characteristics of purebred and crossbred boars. *Journal of Animal Science*, 44, 939-947.
 157. Xue, J.L.; Dial, G.D.; Marsh, W.E.; Davies, P.R.; 1994. Multiple manifestations of season on reproductive performance of commercial swine. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 204, 1486-1489.
 158. Yanagimachi, R.; 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Research*, 5, 323-344.
 159. Yen, H.Y.; Yu, I.T.; 1985. Influence of digestible energy and protein feeding on semen characteristics of breeding boars. In: *Efficient animal production for Asian welfare*. Proc. 3rd AAAP. Animal Science Congress, 2:610. Seoul, South Korea.
 160. Young, L.D.; Leymaster, K.A.; Lunstra, D.D.; 1986. Genetic variation in testicular development and its relationship to female reproductive traits in swine. *Journal of Animal Science*, 63, 17-26.
 161. Zamboni, L.; 1992. Sperm structure and its relevance to infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116, 325-344.
 162. Zaneveld, L.J.D.; Polakoski, K.L.; 1977. Collection and physical examination of the ejaculate, in *Techniques of Human Andrology*, Hafez, E.S. E.; Ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, chap. 6.
 163. Zirkin, B.R.; 1998. Hormonal control of spermatogenesis. En : *Encyclopedia of Reproduction*. Editores: Knobil, E.; Neill, J.D. San Diego, vol 4, pp. 556-562.
 164. Zucchi, R.; Ronca-Testoni, S.; 1997. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev*, 49, 1-51.